

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590370

研究課題名(和文)低酸素応答システムを介した臓器代謝制御の分子基盤とその破綻による病態の解明

研究課題名(英文) Analysis of pathological roles of hypoxic responses in the regulation of organ metabolism in fatty liver diseases

研究代表者

合田 亘人 (Goda, Nobuhito)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：00245549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、過剰なアルコールや高脂肪食の摂取により生じる脂肪性肝疾患の発症・進展機構における低酸素ストレス応答の機能解析を行った。この応答システムの中心分子である低酸素誘導性転写制御因子HIF1が、病態特異的な標的遺伝子の発現調節を行うことで肝脂肪蓄積に対する防御因子として機能していることを明らかにした。一方、HIF1は肝線維化に対して増悪因子として機能することを見出した。この成果は、未だ有効な治療法がない肝硬変や肝がんの基盤病態である脂肪肝の発症・進行を食い止めるために、低酸素ストレス応答の制御が新しい治療法の開発の標的になり得る可能性を示した重要な成果と言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate roles of hypoxic responses in the development and progression of fatty liver diseases evoked by excessive alcohol and high-fat diets. We found that hypoxia inducible factor1 (HIF1), a master regulator of hypoxic responses, serves as a protective mechanism against aberrant lipid accumulation in both alcoholic and non-alcoholic fatty liver in mice, whereas it promotes liver fibrosis in the latter stage of the disease. These results provide an important evidence that successful regulations of hypoxic response by targeting HIF1 can control the development of fatty liver and its related diseases such as liver cirrhosis and cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：脂質代謝 低酸素応答 脂肪肝 HIF

1. 研究開始当初の背景

近年、ウイルス性肝炎に対して、インターフェロン療法が高い有効性を示すことが明らかになり、肝硬変や肝がんなどより重篤な病態への進行が食い止められるようになってきた。一方、高脂肪食やアルコールの過剰摂取、また運動不足などの生活習慣の悪化を背景として発症する脂肪肝に、慢性的な炎症が加わった病態の脂肪性肝炎の罹患率が急速に増加し、将来における肝硬変や肝がんなどのさらに重篤な肝疾患の原因として重要視され始めている。これまでに、脂肪性肝炎の形成・進展に係わる分子メカニズムに、インスリン抵抗性、酸化ストレスや脂肪組織からのアディポサイトカインの分泌異常などが関与していることが数多く報告されているが、多様な原因が複雑に係わっているため、生活習慣の改善以外に脂肪性肝疾患に対する未だ効果的な治療法は確立されていない。

低酸素は、酸素の消費と供給のアンバランスにより生じる細胞や臓器のストレス環境である。研究代表者らはこれまでに、この低酸素ストレスに対する低酸素誘導性転写制御因子 HIF(hypoxia inducible factor)を介した応答システムが、臓器発生、細胞増殖、造血や炎症などのさまざまな生理的および病態下の生物応答において重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。また特に、肝臓におけるこの応答システムの病態機能解明に取り組み、再生肝や食事誘導性脂肪肝において、再生や病態の進行に伴って肝臓内低酸素領域が形成されることやこの低酸素ストレス環境により活性化された HIF が肝臓の糖代謝制御機構にかかわっていることを報告してきた。さらに、本研究課題申請時に、過剰なアルコールやコリン欠乏食の慢性摂取により生じる脂肪肝や脂肪性肝炎においても、同様な低酸素ストレス応答が稼働している可能性を見出し、HIF を介した低酸素応答が様々な原因によって誘導される脂肪性肝疾患の共通した機構として機能していると仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの予備的検討において明らかになってきた、過剰なアルコールやコリン欠乏食の慢性投与により誘導される脂肪肝とさらに進行した脂肪性肝炎で認められる病的低酸素環境の発生機序を明らかにする。さらに、低酸素ストレスに対する応答システムを介した病態の形成や進展に係わる分子メカニズムを解明し、未だ有効な治療法が存在しないこれらの脂肪性肝疾患に対する低酸素を標的とした新たな治療法への開発に繋がる研究基盤の確立を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、あらゆる細胞における低酸素ストレス応答の中心分子である低酸素誘導

性転写制御因子 HIF1 に着目して解析を行う。この解析のために、Cre-loxP システムを用いて、肝細胞特異的に HIF1 の転写活性化能を規定する HIF1 α 遺伝子を欠損させたマウス(HIFK0)を作製した。コントロールマウスとして、Cre トランスジェニックマウスと交配しない HIF1 α 遺伝子に loxP 配列を挿入したマウスを用いた。

(1) アルコール性脂肪肝モデル

8-10 週齢の マウスに、終濃度 6%のエタノールを含む液体飼料(Liber-deCarli liquid diet)またはその等カロリーをマルトースデキストランで置換した対照飼料を 4 週間自由摂取させた。

(2) コリン欠乏食誘導性脂肪肝および脂肪性肝炎モデル

8-10 週齢の マウスに、コリンのみを含まない飼料(CDD)を、脂肪肝モデル作成のために 4 週間、また肝炎モデル作成のために 12 週間自由摂取させた。

それぞれの病態形成用の特殊食を決まった期間投与後、一晚絶食させた翌朝に、サンプル(血液、肝臓、脂肪組織)の採取を行った。得られたサンプルを、組織学的、生化学的および分子生物学的手法を用いて、解析を行った。尚、本研究遂行にあたり、法令で定められている「組換え DNA 実験指針」と「動物実験ガイドライン」に沿って計画し、早稲田大学内に設置された各委員会に申請し承認を受けた。

4. 研究成果

(1) HIF1 はアルコール性脂肪肝の内因性抑制因子として作用する

4 週間のアルコール混餌食投与により、コントロールマウスにおいて、肝臓の中心静脈領域を中心とした中性脂肪(TG)の蓄積と血清 TG の上昇を認めた。また、肝内脂肪沈着領域に一致した低酸素領域の拡大と HIF1 α の発現上昇が認められた。さらに、HIF1 により低酸素下で活性化される vascular endothelial growth factor の遺伝子発現が、アルコール投与により誘導されることが分かった。以上の結果は、アルコール摂取により誘導される脂肪肝では、低酸素ストレス環境が中心静脈領域優位に形成され、その結果 HIF1 が活性化されることを示している。一方、HIFK0 マウスでは、コントロールマウスと比較して、アルコール誘導性脂肪肝がさらに増悪することが明らかになった。つまり、肝細胞の HIF1 は、アルコール摂取による脂肪肝の進展に対する内因性抑制因子として作用していると言える。この結果は、恒常的に HIF1 を過剰に発現させた肝臓で脂肪蓄積の増強を報告した過去の知見と併せて、HIF1 の適度な発現が肝臓の脂質代謝制御の恒常性維持に重要であることを示した重要な結果と言える。

(2) HIF1 によるアルコール性脂肪肝の増悪抑制には DEC1 を介した脂肪酸合成系の抑制が関与している

HIFKO マウスで認められたアルコール性脂肪肝増悪現象にかかわる分子メカニズムを解明するために、肝脂質代謝関連遺伝子の発現を定量的 PCR 法により解析した。その結果、HIFKO マウスの肝臓では、コントロールマウスと比較して、脂肪酸合成系のマスターレギュレーターである sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) とその下流の遺伝子で脂肪酸合成の律速反応を司る acetyl CoA carboxylase (ACC) の顕著な発現上昇が認められた。次に、HIF1 α 遺伝子欠損によるこの異常な SREBP1c の活性化メカニズムについて解明に取り組んだ。その結果、SREBP1c 制御にかかわることが報告されていたアディポネクチン-AMPK 系の関与は認められず、低酸素下で HIF1 の制御を受けることが報告されている転写抑制因子 differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) の発現が HIFKO マウスで有意に低下していることを見出した。この DEC1 発現低下が、HIFKO マウスで認められたアルコール性脂肪肝増悪現象の直接的な原因であることを調べるために、マウス DEC1 発現ベクターをハイドロダイナミック法で HIFKO マウスに投与し、DEC1 タンパク質を肝臓に強制的に発現させた。その結果、何も発現しない空ベクター投与群と比較して、DEC1 発現ベクターを投与した HIFKO マウスでは異常な肝脂肪蓄積が抑制され、また SREBP1c および ACC の発現低下も認められた。以上の結果より、HIF1 は DEC1 の発現誘導を介して、脂肪酸合成系にかかわる SREBP1c の発現を抑制することで、アルコール摂取による脂肪肝の進展に対して内因性の防御因子として作用すると結論づけた。

(3) HIF1 の人為的な活性化はアルコール性脂肪肝の進展を抑制する

上記の結果から、HIF1 の活性化がアルコール性脂肪肝の進展を抑制することが示されたので、次に HIF1 活性化を誘導する低分子化合物がアルコール摂取による脂肪肝の進展を止めることができるか否かについて検討を行った。HIF1 の活性化を誘導できる dimethylallylglycine を、アルコール投与 3 週目よりマウスに与えると、SREBP1c と ACC の発現抑制を伴った肝脂肪蓄積の低下が認められた。この結果は、アルコール性脂肪肝の進展を HIF1 の活性化により制御できる可能性を示唆しており、低酸素を標的としたアルコール性脂肪肝の新たな治療法の開発に繋がる可能性を提示していると言える。

以上、研究成果(1)~(3)は、項目5の雑誌論文の3番目に記載した論文にまとめ、報告を行った。

(4) HIFKO マウスでは脂肪酸酸化系の制

御破綻を誘導して非アルコール性脂肪肝がさらに増悪する

コリン欠乏食 CDD をマウスに投与すると、アルコール投与時とは異なる分子機構を介して、脂肪肝を呈することが報告されている。そこで、このモデルを用いて、非アルコール性脂肪肝の進展における HIF1 の機能解析を行った。コントロールマウスに 4 週間 CDD を投与すると、大脂肪滴性の脂肪沈着が門脈領域優位に認められた。この結果に一致して、肝臓中 TG は顕著に増加したが、血清 TG 値に大きな変化は認められなかった。一方、HIFKO マウスではこの脂肪肝がさらに増悪することが明らかになった。次に、この増悪現象を説明できる分子機構の解明のために、肝臓内脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、CDD 投与により、コントロールマウスおよび HIFKO マウスの両群において、肝臓からの脂肪放出系にかかわる Very low density lipoprotein (VLDL) 形成関連遺伝子と脂肪酸酸化系の遺伝子発現が顕著に低下していることが明らかになった。一方、アルコール性脂肪肝で活性化が認められた脂肪酸合成系の遺伝子発現は逆に低下していた。これらの結果より、コリン欠乏食誘導性脂肪肝の発症には、これまでの報告に一致して、VLDL 形成と脂肪酸酸化系の遺伝子発現抑制がかかわっていると考えられた。次に、HIFKO マウスにおける脂肪肝増悪現象の分子機構について検討を行った。VLDL 形成にかかわる遺伝子発現は両群間で有意な差は認められなかった。一方、脂肪酸酸化系、特にペルオキシゾームの脂肪酸酸化系酵素の発現が HIFKO ではさらに減少していることが明らかになった。以上の結果より、コリン欠乏により誘導される脂肪肝では、HIF1 はペルオキシゾームの脂肪酸酸化系酵素の遺伝子発現抑制を軽減することで、脂肪肝の進展に対して防御的に作用すると考えられた。また、この結果は、同じ脂肪肝と言う病態であっても、肝臓内の脂肪蓄積部位、つまり脂肪肝の原因により HIF1 の作用点が異なることを明らかにした非常に重要な成果だと言える。現在までに、HIFKO マウスで認められる CDD 投与による脂肪肝増悪現象にかかわるより詳細な分子機構の解明に取り組み、この現象にかかわる HIF1 標的分子として lipin1 を同定し、ChIP アッセイなどによる解析を通して HIF1 による lipin1 発現亢進がペルオキシゾームの脂肪酸酸化系律速酵素の AcylCoA oxidase や脂肪酸取り込みにかかわるトランスポーターなどの発現低下を軽減することで脂肪肝の増悪に歯止めを掛けていることを見出している。現在、これらの成果を論文としてまとめ、投稿の準備を行っている。

(5) コリン欠乏食誘導性脂肪性肝炎および肝線維化は HIFKO マウスで抑制される

コリン欠乏食の長期投与は、肝炎および肝線維化を誘導することが報告されている。そ

こで 12 週間に渡って CDD 処置を行った。1 その結果、HE 染色上肝臓への高度の炎症細胞浸潤が認められたが、その程度はコントロールマウスと HIFK0 マウスを比較すると同等だった。この結果に一致して、肝炎マーカーの血清 AST および ALT は CDD 投与により優位に上昇したものの、両群間で差は認められなかった。以上の結果より、肝細胞の HIF1 はコリン欠乏性脂肪性肝炎の発症に重要な役割を果たしていないと考えた。

次に、肝線維化に対する肝細胞の HIF1 の作用について解析を行った。12 週間の CDD 処理により、コントロールマウスの肝臓では肝臓の線維化が生じていることを、シリウスレッド染色やヒドロキシプロリン定量にて確認した。一方、HIFK0 マウスでは、予想に反して、肝線維化が抑制されることが分かった。この結果に一致して、線維化に伴い発現上昇が認められる α -smooth muscle actin 発現が HIFK0 マウスの肝臓で有意に低下していた。さらに、この線維化抑制にかかわる分子機構を明らかにするために、線維化促進および線溶化因子の遺伝子発現解析を行った。その結果、platelet derived growth factor b や fibroblast growth factor 2 などの線維化促進因子の発現が HIFK0 マウスで有意に低下していた。また、驚いたことに、線溶系の matrix metalloprotease 9 やその阻害剤として機能する tissue inhibitor of metalloprotease 1 の発現も低下していた。以上の結果より、HIF1 は主に肝臓内の線維化促進因子の発現増強を介して、コリン欠乏誘導性脂肪性肝線維化を促進する因子として作用していると結論づけた。以上の結果より、コリン欠乏食誘導性脂肪肝および脂肪性肝線維症の病態進展に対して、HIF1 は前者においてはペルオキシゾーム脂肪酸酸化系の抑制を軽減することで抑制因子として、後者に対しては線維化促進因子の発現を誘導することで増悪因子として、病態時期特異的な複雑な機能を示すことが分かった。

本研究成果は、HIF1 は、病態特異的な標的遺伝子の発現制御を介して、アルコール性および非アルコール性脂肪肝に対して生体防衛的に働くことを明らかにした。一方、少なくとも非アルコール性脂肪性肝炎に対しては肝細胞の HIF1 は関与せず、肝線維化に対する促進因子として作用することを明らかにした。しかしながら、脂肪性肝疾患の発症・進展機構の理解には、これらの病態では肝臓を構成する肝実質細胞以外の免疫担当細胞、血管内皮細胞や星細胞なども低酸素ストレス環境に曝されることから、それぞれの細胞における、また細胞間相互作用に対する HIF1 の病態機能のさらなる解明が必要であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件 全て査読有)

1. Takubo K, Goda N, 他 11 名、7 番目 Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. **Cell Stem Cell**, 12(1), 49-61, 2013. DOI: 10.1016/j.stem.2012.10.011
2. Goda N, Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. **Int J Hematol**, 95, 457-463, 2012. DOI: 10.1007/s12185-012-1069-y
*Corresponding Author
3. Nishiyama Y, Goda N, 他 9 名、2 番目 HIF-1 α induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. **J Hepatol**, 56(2), 441-447, 2012. DOI:10.1016/j.jhep.2011.07.024
*Corresponding Author
4. Ochiai D, Goda N, 他 7 名、2 番目 Disruption of HIF-1 α in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. **Biochem Biophys Res Commun**, 415(3), 445-9, 2011. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.10.089
*Corresponding Author

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 合田 亘人, 低酸素応答システムによる代謝制御 第 50 回日本臨床分子医学会 東京 2013.4
2. Nobuhito Goda, HIF-1 Regulates Hepatic Lipid Metabolism in a Context-dependent Manner, 第 35 回日本分子生物学会年会 福岡 2012.12
3. 合田 亘人, 低酸素応答による肝代謝機能制御 第 19 回肝細胞研究会 札幌 2012.6
4. Nobuhito Goda, Role of HIF-1 in the regulation of hepatic lipid metabolism, The 33rd NAITO CONFERENCE ON OXYGEN BIOLOGY: HYPOXIA, OXIDATIVE STRESS AND DISEASES, SAPPORO, 2012.6
5. 合田 亘人, 肝代謝制御における低酸素応答の機能解析, 第 84 回日本生化学会総会, 京都, 2011.9

〔図書〕(計 10 件)

1. 合田 亘人, 加藤 早由華 医歯薬出版 医学のあゆみ 244(4): 286-291, 2013
2. 合田 亘人 生化学 84(11): 942-947, 2012
3. 合田 亘人, 長内 康太 メディカルレビュー社 血管医学 Vascular Biology & Medicine 13(4):377-383, 2012
4. 合田 亘人, 鈴木 智大, 金井 麻衣 羊土社 実験医学 30(8): 1258-1263, 2012
5. 合田 亘人, 金井 麻衣 羊土社 実験医学 29(13): 2096-2100, 2011
6. 合田 亘人 東洋出版 アルコールと医学生物学 30:7-10, 2011

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.waseda.jp/sem-godalab/>

6．研究組織

(1)研究代表者

合田 巨人 (Nobuhito Goda)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：00245549

(2)連携研究者

塚田 孝祐 (Kosuke Tsukada)
慶應義塾大学・理工学部・准教授
研究者番号：00351883

加部 泰明 (Yasuaki Kabe)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：20397037