

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591333

研究課題名(和文) 肝臓におけるコレステロールハンドリングと小胞体ストレス

研究課題名(英文) Modulation of endoplasmic reticulum stress by modification of cholesterol contents in liver.

研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)

福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：20251233

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)：肝臓内コレステロール含量を増加させる経路は3経路存在するが、どの経路で肝臓内コレステロールを増加させても、ERストレスは惹起されないことが判明した。さらに、どの経路を活性化させても血糖値低下をもたらすが、その機序は同一ではないことも判明した。また、薬剤によりERストレスを惹起あるいは軽減しても肝臓中性脂肪蓄積を認めており、肝臓におけるERストレスと糖・脂質代謝との関係は、複雑であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There are three pathways which increase hepatic cholesterol contents. In this study, these 3 pathways have been up-regulated by adenoviral gene transfer. All these pathways increased the hepatic cholesterol contents; however, none did induce the ER stress. On the other hand, all three pathways caused the amelioration of blood glucose level; however, the molecular mechanisms underlying the amelioration of blood glucose were different among the pathways. Both the pharmacological induction and inhibition of ER stress evoked the accumulation of hepatic triglycerides. These results suggest that the association between hepatic ER stress and glucose and lipid metabolism would not be straightforward.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：小胞体ストレス コレステロール 肝臓 糖代謝

### 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化巣構成細胞である内皮細胞やマクロファージにおいては、小胞体ストレス (ER ストレス) が動脈硬化形成・進展に重要であることが注目されている。

一方、肝臓においては、脂肪肝などの肝臓内中性脂肪蓄積性病態で ER ストレスが増強し、また肝細胞での ER ストレス増強がさらに中性脂肪を蓄積させて、インスリン抵抗性・メタボリックシンドロームを引き起こすこと、その結果 脂質異常症や糖尿病などがもたらされ、動脈硬化性疾患につながるものが提唱されている。このように中性脂肪の肝細胞における蓄積と ER ストレスとの関係はある程度解明されているのに対し、肝細胞におけるコレステロール蓄積の ER ストレスへの関与は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

肝細胞におけるコレステロールのハンドリング経路 (コレステロール合成経路、血中からのコレステロール取り込み経路、胆汁からのコレステロール再吸収経路) の ER ストレスへの影響を調べることにより、肝臓の ER ストレスに注目した望ましい脂質異常症改善方法を解明することを目的とする。

また、逆に肝細胞における ER ストレスを変化させることが、肝臓内コレステロール代謝、血液中のコレステロール代謝にどのような影響を与えるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

[1] *in vitro* におけるコレステロールと小胞体ストレスの関係の検討

肝細胞株である HepG2 細胞に cholesterol, sitosterol, campesterol を投与し、ER ストレスについて検討する。また、脂肪酸誘導 ER ストレスに対する cholesterol の影響を検討する。

[2] アデノウイルスを用いたコレステロールハンドリング蛋白と小胞体ストレスの関係の *in vivo* での検討

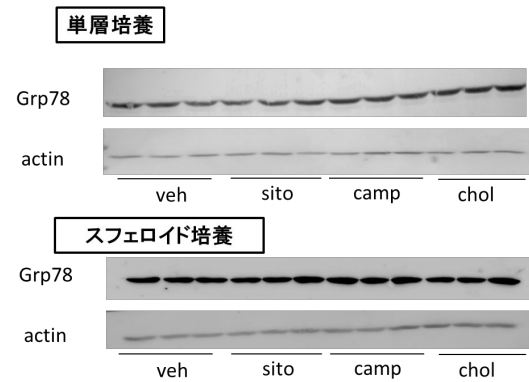
HMG-CoA reductase, Lanosterol synthase (コレステロール合成経路)、LDL 受容体 (血中からのコレステロール取り込み経路)、NPC1L1 (胆汁からのコレステロール再吸収経路) を発現させるアデノウイルスを作成し、マウス肝臓にこれらの蛋白を過剰発現させ、ER ストレス、肝臓脂質含量、糖代謝について検討する。

[3] 薬剤誘発小胞体ストレスの肝臓脂質、糖代謝への影響の検討

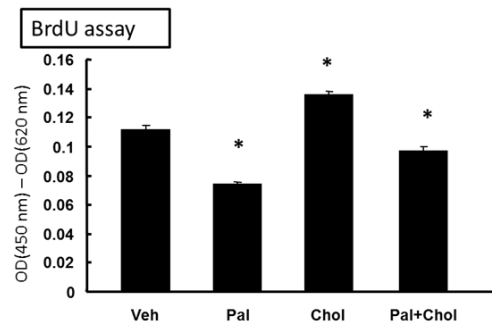
マウスに ER ストレス惹起薬剤である tunicamycin および thapsigargin を投与して、血中脂質レベル、肝臓脂質含量、血糖値について検討する。

### 4. 研究成果

[1] *in vitro* におけるコレステロールと小胞体ストレスの関係の検討



(図1) sterol の Grp78 発現への影響。



(図2) コレステロール(chol)はパルミチン酸(Pal)による細胞増殖阻害を軽減する。

単層培養 HepG2 細胞、スフェロイド培養 HepG2 細胞にステロール負荷をし、HPLCにてステロールが細胞内に取り込まれていることを確認した。これら細胞にて、eIF のリン酸化と GRP78 の発現量を指標に ER ストレスを検討したところ、単層培養 HepG2 細胞ではコレステロール負荷群のみに ER ストレスが惹起されたが、より分化した細胞となるスフェロイド培養では、各群間に相違は認めなかった(図 1)。

また、HepG2 細胞にパルミチン酸を負荷すると小胞体ストレスが惹起され、Akt のリン酸化の低下、インスリン受容体基質 IRS1/2 の発現低下、細胞増殖抑制を認めたが、コレステロールを同時に投与するとこれらの変化が部分的に軽減されることがわかった(図 2)。

[2] アデノウイルスを用いたコレステロールハンドリング蛋白と小胞体ストレスの関係の *in vivo* での検討

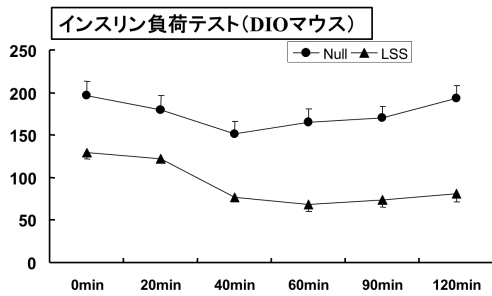
HMG-CoA reductase, Lanosterol synthase (LSS)、LDL 受容体(LDLr)、NPC1L1 をコードするアデノウイルスを作成したが、HMG-CoA reductase のウイルスでは *in vivo* での酵素発現を認めず、*de novo* 合成系としては LSS を用いた。

(2-1)LSS

LSS を通常食マウス、高脂肪食マウスに過剰発現させたところ、肝臓内でのコレステロー

ル含有量、中性脂肪含有量はともに増加した。しかし、小胞体ストレスマーカー（Grp78 の発現量および eIF のリン酸化）はいずれも変化を認めなかった。

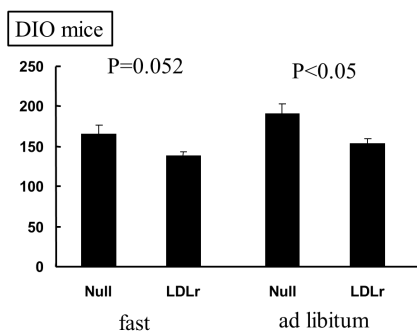
糖代謝については、通常食マウスでは有意な相違を認めなかったが、高脂肪食マウスでは、LSS の過剰発現によりインスリン抵抗性が改善されていた(図3)。また、IRS1/2 の蛋白量増加および Akt リン酸化増強を認めた。



(図3) LSS は DIO マウスでインスリン抵抗性を改善する：インスリン負荷テストによる血糖値の変化。

### (2-2) LDLr

LDLr を通常食マウス、高脂肪食マウスに過剰発現させたところ、肝臓内でのコレステロール含有量が増加した。しかし、小胞体ストレスマーカーはいずれも変化を認めなかった。糖代謝については、通常食マウス、高脂肪食マウスともに LDLr の過剰発現により血糖値が低下しており(図4)、LSS と同様に、IRS1/IRS2 の蛋白量増加と Akt のリン酸化増強を認めた。

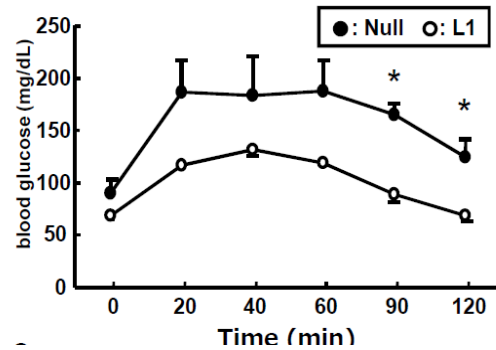


(図4) LDL 受容体過剰発現による血糖値変化

### (2-3) NPC1L1

NPC1L1 を通常食マウス、高脂肪食マウスに過剰発現させたところ、肝臓内でのコレステロール含有量は増加傾向であったが、小胞体ストレスマーカーは変化しなかった。糖代謝については、通常食マウス、高脂肪食

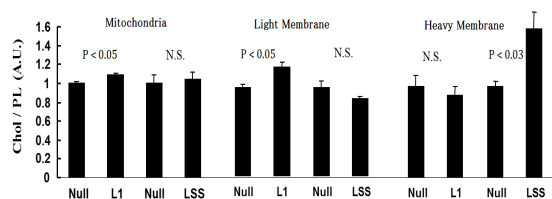
マウスともに空腹時の著明な血糖低下を認め、その機序は核内 FoxO1 蛋白量の低下に伴う糖新生の低下であることが判明した(図5)。



(図5) ピルビン酸負荷試験：NPC1L1 は糖新生を抑制する。

### (2-4) NPC1L1 と LSS 過剰発現による細胞内コレステロール分画の相違

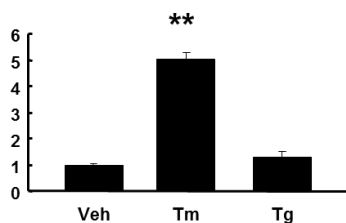
NPC1L1 過剰発現マウスの肝臓、LSS 過剰発現マウスの肝臓から、蔗糖密度勾配法を用いてミトコンドリア、Light Membrane (エンドソームなど)、Heavy Membrane (小胞体など) を分離して、それぞれの細胞分画のコレステロール含有量を測定したところ、NPC1L1 を発現させた群では、ミトコンドリア、Light Membrane でのコレステロール含有量が増加していたが、Heavy Membrane での増加は認めなかった。一方、LSS を発現させた群では Heavy Membrane でのコレステロール含有量の増加を認めた(図6)。



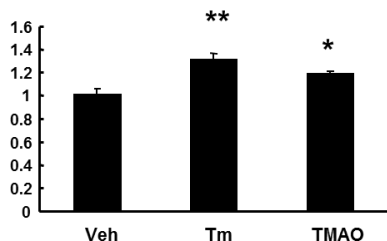
(図6) NPC1L1 と LSS 発現による、肝細胞内小器官への蓄積コレステロール分布の相違

### [3] 薬剤誘発小胞体ストレスの肝臓脂質、糖代謝への影響の検討

通常食マウス、食事誘導肥満マウスに tunicamycin (Tm, 1.0 mg/kg BW) および thapsigargin (Tg, 0.2 mg/kg BW) を投与し、8 時間後に検討した。Tm では血糖は変わりなかったが、Tg では血糖の著明な上昇を認めた。脂質に関しては、Tm、Tg いずれも血液中の LDL コレステロールおよび HDL コレステロールを低下させ、Tm は中性脂肪も低下させた。また、肝臓脂質含量は Tm では肝臓中性脂肪(図7)、コレステロールともに増加した。



(図7) Tmは通常食マウスの肝臓中性脂肪を著明に蓄積させる。



(図8) Tm, TMAOをとともに高脂肪食負荷マウスの肝臓中性脂肪含量を増加させる。

一方、高脂肪食マウスに ER ストレス軽減剤である TMAO を投与しても、血糖値の改善は認めず、肝臓脂質含量に関しては、Tm と同様に中性脂肪が増加した (図8)。

#### [4] 総括

本研究より、いずれのコレステロールハンドリング経路により肝臓コレステロール含量を増加させても、小胞体ストレスを惹起させることはないことが判明した。このように ER ストレスに変化は認めなかったものの、NPC1L1 による胆汁からの再吸収による肝コレステロール増加は糖新生を抑制し、また LSS によるコレステロール新生および LDLr による血中からの取り込み増加による肝コレステロール増加は、インスリン抵抗性を改善させることにより、糖代謝を改善させる方向に働くことが示唆された。また、薬剤により小胞体ストレスを修飾すると、小胞体ストレスを惹起しても軽減しても肝臓中性脂肪蓄積は悪化していた。以上より、肝臓における小胞体ストレスと糖代謝および脂質代謝は、一元的な関連で結び付けられるものではなく、小胞体ストレスが代謝に対して良いとか悪いとかといえるような、単純なものではないことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Kurano M., Hara M., Tsuneyama K., Okamoto K., Iso-O N., Matsushima T., Koike K., Tsukamoto K. Modulation of

lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver. *Journal of Lipid Research* 53(11):2275-2285, 2012 DOI: 10.1194/jlr.M026575

Kurano M., Iso-O N., Hara M., Ishizaka N., Moriya K., Koike K., Tsukamoto K. LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL. *Lipids in Health and Disease* 10: 134, 2011

〔学会発表〕(計4件)

Kazuhisa Tsukamoto Postprandial hyperlipidemia. Importance of Factors affecting hepatic VLDL secretion. 4<sup>th</sup> International Symposium on Chylomicrons in Disease 2014年3月29日、東京

Makoto Kurano, Masumi Hara, Koichi Tsuneyama, Atsuko Takai, Kentaro Kikuchi, Nobukazu Ishizaka, Teruhiko Matsushima, Kazuhisa Tsukamoto Hepatic NPC1L1 overexpression ameliorated glucose metabolism in diabetic mice via suppression of FoxO1 mediated gluconeogenesis. 2013年7月18日、第45回日本動脈硬化学会総会、東京

Makoto Kurano, Masumi Hara, Kazuhisa Tsukamoto Hepatic NPC1L1 overexpression attenuated gluconeogenesis and VLDL-triglycerides secretion via the suppression of hepatic FoxO1 pathway. 2012年7月19日、第44回日本動脈硬化学会総会、福岡

Makoto Kurano, Masumi Hara, Koichi Tsuneyama, Nobukazu Ishizaka, Eisei Noiri, Naoyuki Iso-O, Teruhiko Matsushima, Takashi Kadowaki, Kazuhisa Tsukamoto Modulation of lipid metabolism with hepatic expression of NPC1L1 in mice. 2011年7月16日、第43回日本動脈硬化学会総会、札幌

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO, Kazuhisa)  
 福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授  
 研究者番号：2025123

(2)研究分担者

森屋 恭爾 (MORIYA, Kyoji)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：00272550

渡辺 毅 (WATANABE, Tsuyoshi)  
福島県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80158641

佐藤 博亮 (SATO, Hiroaki)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20323595

(3)連携研究者

蔵野 信 (KURANO, Makoto)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：60621745