

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23790799

研究課題名（和文） 新規脂肪肝関連分子Vanin-1の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of vanin-1 in non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

吉崎 隆之（YOSHIZAKI TAKAYUKI）

鹿児島大学・産学官連携推進センター・特任講師

研究者番号：70515189

研究成果の概要（和文）：本研究では高脂肪食を与えたマウス肝臓および培養液に遊離脂肪酸を添加したヒト肝癌由来細胞株のVanin-1 mRNA発現量変化を調べ、そのメカニズムを考察した。動物実験ではVanin-1 mRNAは高脂肪食に替えて僅か1日後には発現が亢進した。培養細胞を使った実験では脂肪滴の形成しない低オレイン酸濃度でもVanin-1 mRNAの発現が亢進した。様々な脂肪酸を用いて検討した結果、肝臓に脂肪滴を作りやすいオレイン酸、リノール酸でVanin-1が発現誘導されることが分かった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the expression of hepatic vanin-1 mRNA following the administration of a high-fat diet in mice as well as free fatty acids in hepatocyte cultures and speculated its possible mechanism. Vanin-1 mRNA levels in the livers of mice were upregulated within a day of the high-fat diet. An in vitro analysis using HuH-7 cells revealed a significant upregulation of vanin-1 mRNA by low oleic acid concentration; however, lipid accumulation in hepatocytes was not affected at this concentration. As a result of examining with various free fatty acids, it was shown that vanin-1 mRNA was upregulated by the oleic acid and the linoleic acid that makes the lipid droplet easily in the hepatocyte.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学・肝臓学

キーワード：脂肪肝，脂肪滴，脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪摂取量の増大や身体活動量の低下などによって肥満、糖尿病、高脂血症といった生活習慣病が増加し、それに伴い脂肪肝を示す人が増えている。従来良性疾病と考えられてきた脂肪肝であるが、その内10%程度に非アルコール性脂肪性肝炎の発症が認められ、さらにこの病態は10年間で約2割が肝硬変へと進展し肝不全や肝細胞癌まで発症しうるということが明らかとなってきた。非アルコール性脂肪性肝炎の治療法は食事・運動療法を主体とした生活習慣の改善が中心であ

り、薬物療法に関してはインスリン抵抗性や脂質異常症などを分子標的とした治療が試みられているものの、効果は限定的で十分に確立しているとは言い難い。

このため私たちの研究グループでは脂肪肝形成を阻止する新たな分子標的の探索を目的とし、その分子メカニズムの解明を試みてきた。その中で、高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスにおいてパンテテイナーゼVanin-1の発現が顕著に亢進していることを新たに見出し、Vanin-1と脂肪肝との関係に注目するに至った。

2. 研究の目的

本研究はパンテイナーゼ Vanin-1 が肝臓中の脂肪蓄積に直接あるいは間接的に関与するとの仮説を検証すること目的とした。これまでの研究で、Vanin-1 は組織学的に脂肪肝を呈するより前に発現亢進することなどが分かっており(図 1A)、本研究ではその詳細なメカニズムを明らかにするため、下記の点について詳細に検討を行った。

(1) Vanin-1 mRNA の発現亢進が高脂肪食の投与によるものか、あるいはそれによる肥満の結果起こるのかを調べた。

(2) ヒト肝癌由来細胞株を用いた脂肪滴形成モデルを用いて、遊離脂肪酸の種類による Vanin-1 発現量の違いを調べた。

3. 研究の方法

(1) Vanin-1 mRNA の発現亢進が高脂肪食によるものかどうかの検討

① 10 週齢の C57Bl/6N マウスに脂質カロリー比 80% の高脂肪食を与え、食餌性脂肪肝マウスを作成した。高脂肪食に替えて 2 週から 12 週の間については肝臓中 Vanin-1 の発現量がコントロール群に比べ 4 倍から 6 倍程度高くなるのがすでに分かっていたため、1 日後、3 日後、7 日後および 3 日後に通常食に戻しさらに 4 日後の肝臓中 Vanin-1 mRNA 発現量を調べた。

② 通常食で飼育した C57Bl/6N マウスを 48 時間絶食、さらに再給餌後 12 時間の肝臓をそれぞれ採取し、Vanin-1 mRNA の発現量を比較した。

③ レプチン欠損により通常食飼育下で遺伝的肥満を呈する ob/ob マウスを用いて、14 週齢および 32 週齢の肝臓中 Vanin-1 mRNA の発現量を野生型マウスと比較した。またこの際、in situ hybridization を行い肝臓内における Vanin-1 mRNA の発現分布についても調べた。

(2) ヒト肝癌由来細胞株を用いた脂肪滴形成モデルを用いた、遊離脂肪酸添加による Vanin-1 mRNA 発現量の比較検討

① in vitro 解析として、ヒト肝癌由来細胞株 (HuH-7) 培養液中にオレイン酸を添加することにより細胞内への脂肪滴蓄積が起こるモデル系を用いて、Vanin-1 mRNA の発現量変化を調べた。

② 同じく HuH-7 細胞にオレイン酸を含む各種遊離脂肪酸を最終濃度 1 mM の濃度で添加し、Vanin-1 mRNA の発現量および脂肪滴形成への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) Vanin-1 mRNA の発現亢進が高脂肪食によるものかどうかの検討

① 通常食から高脂肪食に替え 1-7 日後のマウス肝臓中 Vanin-1 mRNA 発現量を測定した

結果、投与開始 1 日後には投与前と比べ約 8 倍発現上昇していることが分かった。また 3 日後に通常食に戻し、さらにその 4 日後には高脂肪食投与前と同等のレベルまで戻ることが分かった。

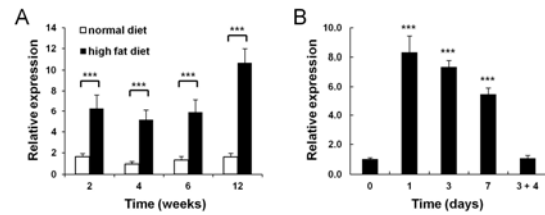


図 1 高脂肪食投与によるマウス肝臓中 Vanin-1 mRNA の発現

② 通常食飼育下における 48 時間絶食で肝臓中 Vanin-1 mRNA の発現は 10 倍近くに亢進し、さらに再給餌後 12 時間で元の 2 倍程度まで減少した。一方、同時に測定した中性脂肪合成を担う SREBP-1c mRNA は絶食により発現量が下がり、再給餌により上がることを確認した。

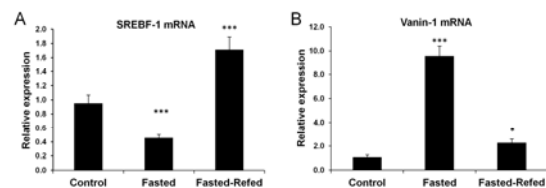


図 2 絶食、再給餌によるマウス肝臓中 SREBP-1c mRNA および Vanin-1 mRNA の発現

③ 通常食で脂肪肝を呈する ob/ob マウスにおいて、野生型マウスと比べ Vanin-1 mRNA の発現量が 6 倍程度高いことが分かった。さらには 14 週から 32 週で脂肪肝が進行する間、Vanin-1 mRNA の発現量はほとんど変化しないことが分かった。

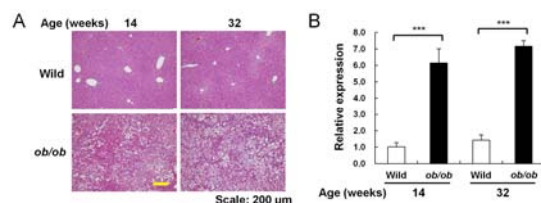


図 3 ob/ob マウス肝臓中の脂肪蓄積および Vanin-1 mRNA の発現

さらに in situ hybridization を行って肝臓組織内における Vanin-1 mRNA の発現分布を調べた結果、Vanin-1 mRNA は脂肪滴を多く有する肝細胞に多く分布していることが明らかとなった。

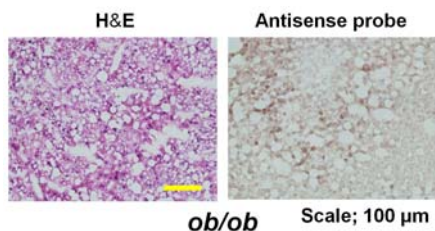


図4 ob/ob マウス肝臓における Vanin-1 mRNA の組織発現分布

(2) ヒト肝癌由来細胞株を用いた脂肪滴形成モデルを用いた、遊離脂肪酸添加による Vanin-1 mRNA 発現量の比較検討

①HuH-7 細胞にオレイン酸を添加した in vitro の系では、終濃度 1 mM 程度の濃度で脂肪滴が形成されるのが確認できた。

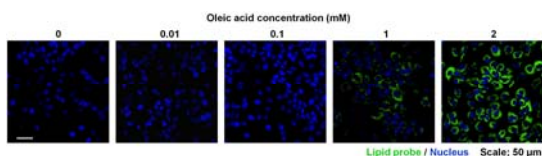


図5 オレイン酸添加により HuH-7 細胞中に形成した脂肪滴の脂質プローブによる蛍光染色

一方 Vanin-1 mRNA は PPAR α 依存的に非常に低濃度 (0.01 mM) から発現亢進することが分かった。また脂肪滴の形成に必要な ADRP については図5で観察された脂肪滴と同様、1 mM 程度で mRNA の発現が亢進していた。

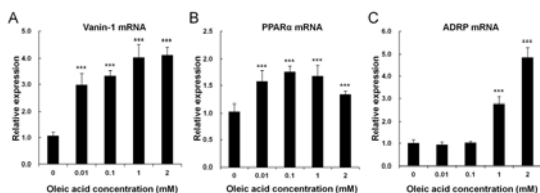


図6 HuH-7 細胞へのオレイン酸添加による遺伝子発現変化

②オレイン酸以外の様々な脂肪酸を添加したところ、終濃度 1 mM においては長鎖不飽和脂肪酸であるオレイン酸とリノール酸でのみ顕著な脂肪滴の形成が認められた。

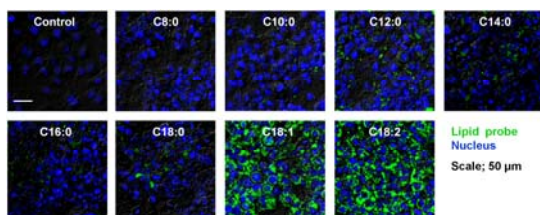


図7 各種脂肪酸添加により HuH-7 細胞中に形成した脂肪滴の脂質プローブによる蛍光染色

Vanin-1 mRNA の発現に関しては中鎖脂肪酸であるカプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸および長鎖不飽和脂肪酸において顕著に亢進していた一方、長鎖飽和脂肪酸であるミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸ではその差は僅かであった。また今回添加したすべての脂肪酸で PPAR α の発現が亢進していた。

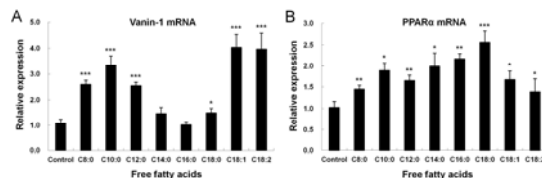


図8 HuH-7 細胞への各種脂肪酸添加による遺伝子発現変化

本研究では、高脂肪食の投与がマウス肝臓中 Vanin-1 mRNA の発現を亢進させること、また通常食であっても絶食時には脂肪組織由来の遊離脂肪酸によって亢進すること、あるいはレプチン欠損マウスでは常に発現が高くなっていることなどが分かった。

またヒト肝癌由来細胞株では、長鎖不飽和脂肪酸であるオレイン酸およびリノール酸から脂肪滴、すなわち中性脂肪を合成する際に Vanin-1 mRNA が発現亢進することも明らかになった。

これらの実験結果から、いずれも血中脂肪酸の増加による肝臓への脂肪酸 (特にオレイン酸やリノール酸など) 取込量の増大に伴って Vanin-1 の発現が亢進され、それが肝臓での脂肪滴蓄積に関係することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Takahashi, N., Yoshizaki, T., Hiranaka, N., Suzuki, T., Yui, T., Akanuma, M., Kanazawa, K., Yoshida, M., Naito, S., Fujiya, M., Kohgo, Y. and Ieko, M. (2013) Endoplasmic reticulum stress suppresses lipin-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 431: 25-30. 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.112

(2) Motomura, W., Yoshizaki, T., Takahashi, N., Kumei, S., Mizukami, Y., Jang, S. and Kohgo, Y. (2012) Analysis of vanin-1 upregulation and lipid accumulation in hepatocytes in response to a high-fat diet and free fatty acids. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 53: 163-169.

査読有.

DOI: 10.3164/jcbrn.12-06

(3) Takahashi, N., Yoshizaki, T., Hiranaka, N., Suzuki, T., Yui, T., Akanuma, M., Oka, K., Kanazawa, K., Yoshida, M., Naito, S., Fujiya, M., Kohgo, Y. and Ieko, M. (2011) Suppression of lipin-1 expression increases monocyte chemoattractant protein-1 expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 415: 200-205.

査読有.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.060

[学会発表] (計 6 件)

① 高橋伸彦, 吉崎隆之, 吉田美香, 内藤澄悦, 高後裕, 家子正裕. 小胞体ストレスは 3T3-L1 脂肪細胞の lipin-1 発現を低下させる. 第 17 回アディポサイエンス研究会シンポジウム. 2012 年 8 月 25 日. 千里阪急ホテル (大阪府).

② 高橋伸彦, 吉崎隆之, 平中奈津弥, 吉田美香, 内藤澄悦, 高後裕, 家子正裕. 小胞体ストレスは 3T3-L1 脂肪細胞における lipin-1 発現を低下させる. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2012 年 5 月 17 日. パシフィコ横浜 (神奈川県).

③ 吉崎隆之, 本村亘, 高橋伸彦, 桑井志麻, 水上裕輔, 張成宰, 高後裕. 高脂肪食投与による脂肪肝形成に伴う肝細胞 Vanin-1 の発現亢進. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 2012 年 3 月 23 日. 京都女子大学 (京都府).

④ 高橋伸彦, 吉崎隆之, 高後裕, 家子正裕. 脂肪細胞における lipin-1 発現低下の意義. 第 16 回アディポサイエンス研究会シンポジウム. 2011 年 8 月 20 日. 千里阪急ホテル (大阪府).

⑤ 高橋伸彦, 吉崎隆之, 吉田美香, 内藤澄悦, 高後裕, 家子正裕. Suppression of lipin-1 expression by RNAi increases monocyte chemoattractant protein 1 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 16 日. ロイトン札幌 (北海道).

⑥ 高橋伸彦, 吉崎隆之, 高後裕, 家子正裕. 3T3-L1 脂肪細胞において lipin-1 遺伝子の knock down は MCP-1 遺伝子発現上昇を引き起こす. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011 年 5 月 21 日. 札幌プリンスホテル (北海道).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉崎 隆之 (YOSHIZAKI TAKAYUKI)
鹿児島大学・産学官連携推進センター・
特任講師
研究者番号: 70515189