

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790709

研究課題名(和文) 飽和脂肪酸による肝細胞死を抑制する因子の解明

研究課題名(英文) Factors that inhibit hepatocyte lipoapoptosis

研究代表者

赤澤 祐子 (AKAZAWA, Yuko)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：80582113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脂肪酸による肝細胞死を抑制する因子を検索してきた。今回の検討で、抗アポトーシス蛋白cIAP-1が、脂肪酸によって減少し、アポトーシスが促進されることが判明した。今回の研究により、cIAP-1を体内で調整することが、非アルコール性脂肪肝炎の治療に有用である可能性が示唆された。現在我々は、フラボノイドの一種である、トロキセルチンの抗アポトーシス効果についても検討している。

研究成果の概要(英文)：Elevated serum free fatty acids and hepatocyte apoptosis are part of the features of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Cellular inhibitor of apoptosis (cIAP)-1 protein is an inhibitor of death receptor-mediated apoptosis. Aim of our study was to determine the role of cIAP-1 degradation during free fatty acid mediated hepatocyte apoptosis. bclAP-1 protein underwent degradation following treatment with palmitate in cultured HCC cells. SMAC mimetic JP1584, which induces rapid degradation of cIAP-1, significantly enhanced PA-mediated apoptosis in Mouse primary hepatocytes. However, JP 1584 did not sensitize primary hepatocytes from DR^{-/-} mouse to apoptosis. These results indicated that degradation of cIAP-1 by PA enhances death receptor mediated pathway of lipoapoptosis. We are currently investigating the role of Troxerutin, a flavonoid, in FFA-mediated apoptosis. Troxerutin attenuated PA-mediated lipoapoptosis. We are currently investigating the mechanism that leads to this effect.

研究分野：消化器内科学

キーワード：脂肪酸 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(Non-alcoholic fatty liver disease) NAFLD の病態はメタボリック症候群の象徴である肥満とインスリン抵抗性と深く関わっている (Malhi H et al, Semin Liver Dis, 2008)。本邦でも生活習慣の西洋化に伴い、NAFLD は増加傾向である。NAFLD の病態には遊離脂肪酸による肝細胞アポトーシスと肝細胞の脂肪沈着が大きく寄与している。脂肪酸は動物性脂肪を中心とする飽和脂肪酸と、オリーブオイルやナッツなどに多く含まれる不飽和脂肪酸が存在する。飽和脂肪酸、とくに体内の組成が多いパルミチン酸は、肝細胞にアポトーシスを誘導する。この現象が NAFLD の進展に関与している可能性が大きい。よって、飽和脂肪酸による肝細胞アポトーシスにかかわる因子や、抑制する因子を検討することにより、当疾患の病態へのより深い理解、将来的な治療につながる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

我々は脂肪酸による肝細胞死を抑制する因子の検討を行うこと、その物質が作用する機序の解明を目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

各種培養細胞を用い、飽和脂肪酸 (パルミチン酸) を用い刺激した。培養ヒト肝細胞癌株 Huh-7, HepG3, HepG2 を用い、100-800 μ M の飽和脂肪酸 (palmitate) または飽和脂肪酸で刺激した。アポトーシス抑制作用があると思われる物質とともに培養し細胞死抑制の有無を検討した。また、脂肪酸刺激により、減少するタンパクに、抗アポトーシスタンパクが含まれていることを想定し、目的タンパクをウェスタンブロットや PCR 法を用いて検討した。アポトーシスは DAPI 染色とカスパーゼ 3/7 活性によって確認された。

検討物質・蛋白は以下のとおりである。

cIAP-1, cIAP-2, XIAP, Bcl-xL, トヨカマイシン, トロキセルチン。

以下には有意な結果が得られたものを記載する。

4. 研究成果

cIAP-1, cIAP-2 は古くから抗アポトーシスタンパクとして知られていたが、飽和脂肪酸 (パルミチン酸) 刺激状態の肝臓における役割が不明であった。cIAP 蛋白をウェスタンブロットで、cIAP の mRNA 発現を real time PCR で検討した。

検討の結果 cIAP-1, cIAP-2 双方が、Huh-7, HepG3, HepG2 において脂肪酸による肝細胞刺激において減少していくことが判明した。脂肪酸は cIAP-1 あるいは cIAP-2、またその双方のデグラデーションを起こすことにより、

肝細胞アポトーシスを促進していくのではないかと推測した。そこで、cIAP-1, cIAP-2 の shRNA を用いてそれぞれの遺伝子をノックダウンし、脂肪酸に与える影響を検討した。その結果、cIAP-1 shRNA 細胞株では、脂肪酸による肝細胞アポトーシス感受性が上昇したのに対し、cIAP-2shRNA 細胞株ではそのような作用は見られなかった。よって、cIAP-1 の減少が脂肪酸による肝細胞アポトーシスに寄与していることが考えられた。この実験結果を裏付けるために、cIAP-1, cIAP-2 双方のデグラデーションを誘導する薬剤 (JP

次に cIAP の減少へのメカニズムについて検討した、mRNA についてはパルミチン酸の刺激で有意な変化は見られなかった。したがって cIAP のデグラデーションは Post translational modification によるものと考えられた。事実、パルミチン酸による cIAP の減少はプロテオソーム阻害剤である MG132 (10 μ M) により抑制された。一方で、cIAP の減少はカスパーゼ阻害剤 (QVD-OPH, 5 μ M) では抑制されなかった。これらのことからプロテオソームによる cIAP-1 の減少が飽和脂肪酸によるアポトーシスに寄与していると考えられた。プロテオソーム経路でのデグラデーションは、E3 ubiquitin ligase が必要である、と以前に報告されていた。よって我々は、次に、cIAP の減少が cIAP-1 の E3 ubiquitin ligase activity を司る RING domain に point mutation を導入したプラスミドを Huh 細胞に transfection したところ、PA による cIAP の減少とアポトーシスは有意に抑制された。これらのことより cIAP の脂肪酸刺激による減少は、自身の RING ドメインの存在が必須であり、脂肪酸によりプロテアソーム系を介したデグラデーションが惹起されていたことが解明された。また脂肪酸による cIAP のデグラデーションは Death receptor 5 (DR5) 依存性であり、DR5 をノックアウトした肝細胞では、cIAP のデグラデーションは惹起されなかった。ヒト NAFLD 肝検体においても cIAP は正常検体とくらべ減少しており、cIAP の体内濃度を変化させることで NAFLD が抑制される可能性が考えられた。

また植物性フラボノイドであるトロキセルチンや XBP-1 阻害剤であるトヨカマイシンにも、脂肪酸によるアポトーシス抑制効果が存在することが明らかになった。トロキセルチンは、フラボノイドの一種であり、抗酸化作用などが現在までに知られている。トロキセルチンは濃度依存性にパルミチン酸刺激によるアポトーシスを抑制し、NAFLD の治療にも有用となる可能性があると考えられた。またトヨカマイシンは小胞体ストレスを介したアポトーシスを抑制することが判明し、

lipogenic gene の mRNA 発現抑制を介して肝臓細胞内の脂肪滴沈着も抑制することが判明した。小胞体ストレスの軽減が、NAFLD の治療に有用である可能性が高いと考えられた。現在はマウスを用いて、上記の効果を検討しているところであり、より臨床応用に近い研究にも着手していく予定である、

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 2 件)

1. Endoplasmic reticulum stress contributes to Helicobacter pylori VacA-induced apoptosis. Akazawa Y, et al. PLoS One. 2013 Dec 13;8(12):e82322. (査読あり)
2. Akazawa Y, et al. **Degradation of cIAPs contributes to hepatocyte lipoapoptosis.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2013 Nov;305(9) (査読あり)

[学会発表](計 7 件)

1. Troxerutin attenuates free fatty acid-induced hepatocyte lipotoxicity by inhibiting endoplasmic stress and death receptor expression. Akazawa Y, et al. Asian Pacific Association for The Study of the Liver (APASL) Brisbane, 12 – 15 March 2014
2. RING-domain Dependent Degradation of cIAP-1 Contributes to Hepatocyte Lipoapoptosis. Akazawa Y, et al. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (第 64 回米国肝臓学会): Jules Levin : Washington, USA : 2013.11.1-11.5 : ポスター(Distinct poster award 受賞)
3. Helicobacter pylori Toxin vacA Induces Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. Akazawa Y, et al. Digestive Disease Week DDW2013 : Richard M. Peek (MD AGAF) : Orlando, FL, U.S.A : 2013.5.18-5.21 : ポスター (Distinct poster award 受賞)
4. HCV infection increases JNK **phosphorylation** and accentuates

hepatocyte lipoapoptosis, Hiroko Takaki, Akazawa Y, et al. AASLD 2014. 11.7 ~ 11

5. XBP-1 inhibitor Toyocamycin attenuates palmitate-induced hepatocyte apoptosis and steatosis, Ikuko Takahara, Akazawa Y, et al. DDW 2014.5.3 ~ 6
6. Palmitoleate は飽和脂肪酸による JNK リン酸化と小胞体ストレスを抑制する. 赤澤 祐子, 中尾 一彦 第 16 回 日本肝臓学会大会 : 佐田 通夫 : 神戸 : 2012.10.10-10.11 : シンポジウム
7. Hepatocyte Lipoapoptosis における cIAP 蛋白 Degradation の役割. 赤澤祐子, 他. 第 48 回日本肝臓病総会 2012 年 6 月 7 日 ~ 8 日. 金沢

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/gastro/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤澤 祐子 (AKAZAWA, Yuko)
長崎大学診療情報管理室 助教
研究者番号 : 80582113

(2)研究分担者

該当なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者

該当なし

()

研究者番号 :