

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460490

研究課題名(和文)核内受容体による非アルコール性脂肪肝炎発症経路の解明と治療応用への基盤構築

研究課題名(英文)Analysis of the pathological mechanism of NASH by the nuclear receptors and establishment of the therapeutic application

研究代表者

井上 裕介 (Inoue, Yusuke)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：90304302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓HNF4<sup>-/-</sup>欠損マウス(KOマウス)はNASHを発症するが、PPAR<sup>-/-</sup>の欠損によりNASHが改善する。KOマウスでFATP1、CD36、CideAの発現増加が認められ、ダブルKOマウスで発現低下することが分かった。また、KOマウスではFATP1のプロモーターにおけるPPAR<sup>-/-</sup>のDNA結合活性と肝臓での脂肪酸量が増加していることが分かった。このため、内在性脂肪酸がPPAR<sup>-/-</sup>を活性化し、PGC1<sup>-/-</sup>によりPPAR<sup>-/-</sup>標的遺伝子が転写活性化され、NASHが誘導されると推測された。

研究成果の概要(英文)：Deletion of PPAR<sup>-/-</sup> in liver-specific HNF4<sup>-/-</sup> null mice (KO mice) improved NASH. Expression of FATP1, CD36, and CideA was increased in KO mice, but the expression of these genes were decreased in double KO mice. Also, DNA binding activity of PPAR<sup>-/-</sup> and the amount of hepatic fatty acid was increased in KO mice. These results indicate that ligand-activated PPAR<sup>-/-</sup>/PGC1<sup>-/-</sup> could transactivate the PPAR<sup>-/-</sup> target genes and might induce NASH in KO mice.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：NASH 核内受容体 HNF4 PPAR

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓の機能不全により生活習慣病などの多くの疾患が起こる。この一つとして、アルコール摂取が原因ではない非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の患者数が急増傾向である。NASH は放置すると脂肪肝から炎症や線維化を介して肝硬変、肝細胞癌へと進行する悪性の疾患であり、国内の患者数は約 200 万人と推測されている。NASH の原因は様々であり、その発症機構は解明されておらず、確立された薬物治療法も存在しない。

NASH の原因の一つとして、肝臓の転写因子群を起点とする遺伝子発現ネットワークの破綻が挙げられる。HNF4 $\alpha$ はこのネットワークの上流に存在する核内受容体であり、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$ 欠損マウス (H4-KO マウス) は NASH のモデル動物であるが、NASH 発症機構の詳細は不明である。

H4-KO マウスの肝臓では、核内受容体 PPAR $\alpha$ の標的遺伝子である脂肪酸酸化遺伝子群の顕著な発現増加が認められた。このため、H4-KO マウスと PPAR $\alpha$ 欠損マウスを交配してダブル KO マウスを作製したところ、脂肪肝の顕著な改善が見られた。以上の結果から、H4-KO マウスでは PPAR $\alpha$ を介した脂肪酸酸化遺伝子群の活性化が NASH 発症に関与することが示唆された。しかし、H4-KO マウスで PPAR $\alpha$ が直接的に脂肪酸酸化遺伝子群を転写活性化しているのかは不明である。一方、PPAR $\alpha$ 以外の因子による転写活性化の可能性もある。この候補因子として H4-KO マウスで発現上昇する PPAR $\gamma$ と、PPAR $\alpha$ と PPAR $\gamma$ の両方のコアクチベーターである PGC1 $\alpha$ が予想された。

## 2. 研究の目的

H4-KO マウスにおける脂肪酸酸化遺伝子の転写活性化因子に関与する因子とその他の脂肪肝発症に関する遺伝子を同定し、新規 NASH 発症経路を解明し、NASH 治療薬開発の基盤を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) H4-KO マウスにおける脂肪酸酸化遺伝子の転写活性化機構の解析

#### DNA 結合能の解析

H4-KO マウス肝臓における PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ の DNA 結合能を解析するために、クロマチン免疫沈降を行った。KO マウス肝臓で発現上昇する PPAR $\alpha$ 標的遺伝子であるペルオキシソーム $\beta$ 酸化酵素遺伝子 (BIEN)のプロモーター中に存在する PPAR 結合配列 (PPRE) を標的とし、H4-KO マウスとコントロールマウス肝臓および PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ 抗体を用いた。

#### PGC1 $\alpha$ の発現増加機構の解析

PGC1 $\alpha$ の発現が miRNA によって制御されているかどうかを、H4-KO マウスで発現低下している miRNA を HepG2 細胞に導入後、ウエスタンブロットにより解析した。

### (2) H4-KO マウス肝臓における脂肪酸の定量

H4-KO マウスおよびコントロールマウスの肝臓より脂質を抽出し、24 種類の脂肪酸量をガスクロマトグラフィーにより測定した。

### (3) 新規の NASH 誘導因子の探索と DNA 結合活性能解析

#### 新規の NASH 誘導因子の探索

脂肪酸酸化に関与する遺伝子以外の脂肪酸代謝に関与する約 30 種類の遺伝子についての発現変動を解析するために、H4-KO マウス、コントロールマウス、ダブル KO マウスの肝臓から全 RNA を抽出、逆転写後、リアルタイム PCR でこれらの遺伝子の発現定量を行った。

#### 新規同定遺伝子の転写活性化能の解析

で同定した遺伝子について HNF4 $\alpha$ 、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ による転写活性化に関与しているかどうかを解析するために、それぞれの遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、HEK293 細胞に導入後、ルシフェラーゼアッセイを行った。

#### DNA 結合活性能の解析

で同定した遺伝子について、プロモーター中の PPRE に PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ が結合するかどうかをクロマチン免疫沈降により解析した。

### (4) ヒト PPAR $\alpha$ タンパク質に対する DNA アプタマーのスクリーニング

ヒト PPAR $\alpha$ 遺伝子を、pET ベクターにクローニングし、大腸菌で発現させた後、His タグにより融合タンパク質を精製した。精製したタンパク質に結合する DNA アプタマーを SELEX 法によりスクリーニングした。

## 4. 研究成果

### (1) H4-KO マウスにおける脂肪酸酸化遺伝子の転写活性化機構の解析

#### DNA 結合能の解析

H4-KO マウス肝臓では、脂肪酸の $\beta$ 酸化に関与する BIEN 遺伝子の発現が上昇している。このため、BIEN 遺伝子のプロモーター中の PPRE に対する PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ の DNA 結合能をクロマチン免疫沈降により解析した。その結果、PPAR $\alpha$ に関してはコントロールマウスと比較して H4-KO マウスでの DNA 結合能の上昇傾向が認められたが、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ については変化が認められなかった。従って、H4-KO マウスでは PPAR $\alpha$ の発現は低下しているが、内在

性リガンドにより活性化していること、さらには PPAR 標的遺伝子を転写活性化しているのは PPAR $\alpha$ であることが示唆された。

#### PGC1 $\alpha$ の発現増加機構の解析

H4-KO マウス肝臓では PGC1 $\alpha$ の発現が増加している。また miRNA の網羅的発現解析により H4-KO マウス肝臓で発現変動している miRNA を既に同定済みである。以上より、H4-KO マウスでの PGC1 $\alpha$ の発現増加は発現低下している miRNA によるものと推測した。これらの miRNA を内在性 PGC1 $\alpha$ を発現する HepG2 細胞に導入して、PGC1 $\alpha$ の発現が低下するのかどうかをウエスタンブロットにより解析した。その結果、miR-194 により PGC1 $\alpha$ の発現が低下することが明らかになった。

#### (2) H4-KO マウス肝臓における脂肪酸の定量

PPAR は内在性の脂肪酸により活性化される。このため、H4-KO マウスにおける PPAR の活性化に特定の脂肪酸が関与しているのかどうかを解析するために、H4-KO マウス肝臓における 24 種類の脂肪酸を定量した。その結果、コントロールマウスと比較してすべての脂肪酸の比率に変化は認められなかった。一方、H4-KO マウス肝臓における全脂質量は有意に増加しているため、H4-KO マウスにおける PPAR $\alpha$ の活性化は、特定の脂肪酸によるものではなく、全体の脂肪酸量の増加によるものであることが示唆された。

#### (3) 新規の NASH 誘導因子の探索と DNA 結合活性能解析

##### 新規の NASH 誘導因子の探索

脂肪酸酸化以外の脂肪酸代謝に関する様々な遺伝子の発現解析を行った。その結果、脂肪酸取り込みに関与する FATP1 と CD36 の H4-KO マウス肝臓での顕著な発現増加が認められた。一方、FATP1 と CD36 の発現はダブル KO マウスで発現低下することが分かった。同様に、脂肪滴伸長に関与する CideA の H4-KO マウス肝臓での顕著な発現増加とダブル KO マウスでの発現低下も明らかになった。

##### 新規同定遺伝子の転写活性化能の解析

FATP1 と CD36 は PPAR の標的遺伝子であることは既知であり、FATP1 はプロモーター中の PPRE が同定されている。そこで、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ により転写活性に相違があるのかどうかをルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、FATP1 は PPRE 依存的に PPAR $\alpha$ により転写活性化され、リガンドと PGC1 $\alpha$ によりさらに転写活性化能が上昇することが分かった。PPAR $\gamma$ についても同様な傾向が認められたが、PPAR $\alpha$ よりも転写活性化能が低いことが明らかになった。また、PPAR $\beta$ については FATP1 を PPRE 依存的に転写活性化できないことが分かった。従って、H4-KO マウス肝臓における FATP1

の発現上昇は PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、PGC1 $\alpha$ によるものであることが示唆された。

##### DNA 結合活性能の解析

FATP1 遺伝子のプロモーター中の PPRE に対する PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ の DNA 結合能をクロマチン免疫沈降により解析した。その結果、PPAR $\alpha$ に関してはコントロールマウスと比較して H4-KO マウスでの DNA 結合能の有意な上昇が認められたが、PPAR $\beta$ 、PPAR $\gamma$ については変化が認められなかった。従って、H4-KO マウスにおける FATP1 の発現上昇は活性化された PPAR $\alpha$ によることが示唆された。

#### (4) ヒト PPAR $\alpha$ タンパク質に対する DNA アプタマーのスクリーニング

ヒト PPAR $\alpha$  を大腸菌で発現させ、His-アフィニティークロマトグラフィーにより、PPAR $\alpha$ タンパク質を粗精製した。その後、SELEX 法により PPAR $\alpha$ に結合する DNA アプタマーをスクリーニングした。さらに、ゲルシフトアッセイにより、PPAR $\alpha$ の DNA 結合活性を阻害する DNA アプタマーを 11 種類取得した。

以上の結果から、H4-KO マウスが NASH を発症する機構を考察した。まず H4-KO マウスは低血糖であるため、おそらく脂肪酸酸化によりエネルギーを得ようとする。PPAR $\alpha$ は脂肪酸酸化を促進させるため、内在性の脂肪酸がリガンドとなり PPAR $\alpha$ が活性化される。そして PPAR $\alpha$ 標的遺伝子である FATP1 や CD36 により増加した細胞内の脂肪酸がさらに PPAR $\alpha$ を活性化し、標的遺伝子群の発現が上昇させると推測される。このとき、miR-194 の発現低下による PGC1 $\alpha$ の発現増加は PPAR $\alpha$ との結合を促進し、標的遺伝子を発現誘導する。FATP1 や CD36 の発現誘導は脂肪酸取り込みを促進し、脂肪酸により PPAR $\alpha$ がさらに活性化される。さらに、CideA の発現増加は脂肪滴の伸長を促進し、脂肪分解を抑制する。VLDL による脂質輸送の低下も加わり、脂肪肝形成が促進される。必要以上の脂肪酸酸化の亢進は活性酸素を発生させる。H4-KO マウスでは活性酸素を分解するカタラーゼや Sod1 などの発現低下による酸化ストレスの蓄積が示唆されており、これらが脂肪肝から NASH へのトリガーになると推測される。今後は H4-KO マウスにおける NASH 発症機構をさらに詳細に解析していく予定である。さらに、PPAR $\alpha$ タンパク質に対する特異的核酸アプタマーを取得し、動物実験により脂肪肝治療薬の開発を目指す。

#### 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 6 件)

Matsuo S, Ogawa M, Muckenthaler MU, Mizui Y, Sasaki S, Fujimura T, Takizawa M, Ariga N, Ozaki H, Sakaguchi M, Gonzalez FJ, and Inoue Y. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  controls iron metabolism and regulates transferrin receptor 2 in mouse liver. *J Biol Chem.* 290, 30855-30865 (2015) 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M115.694414.

Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto K, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, and Huh NH. DNAX-activating protein 10 (DAP10) membrane adaptor associates with receptor for advanced glycation end products (RAGE) and modulates the RAGE-triggered signaling pathway in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 289, 23389-23402 (2014) 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M114.573071.

Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Watanabe R, Saito K, Inoue Y, Yamamoto K, Nakata S, Kaihata M, Murata H, and Sakaguchi M. Extract of *Cordyceps militaris* inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth of human malignant melanoma cells. *Int J Oncol.* 45, 209-218 (2014) 査読有 DOI: 10.3892/ijo.2014.2397.

Sakaguchi M, Watanabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IM, Nasu Y, Kumon H, and Huh NH. Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene. *Mol Biotechnol.* 56, 621-630 (2014) 査読有 DOI: 10.1007/s12033-014-9738-0.

Safdar H, Cleuren AC, Cheung KL, Gonzalez FJ, Vos HL, Inoue Y, Reitsma PH, and van Vlijmen BJ. Regulation of the fl1, klkb1, cyp4v3 gene cluster in livers of metabolically challenged mice. *PLoS One*, 8, e74637 (2013) 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0074637.

Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, and Huh NH. DOCK7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep.* 29, 1073-1079 (2013) 査

読有 DOI: 10.3892/or.2012.2191.

〔学会発表〕(計 18 件)

守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、佐々木翔太、前田つかさ、阪口政清、行木信一、井上裕介 HNF4 $\alpha$  は miR-194/192 を介して肝細胞の脱分化を抑制する、第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 2 日、神戸国際会議場 (神戸市)

佐々木翔太、前田つかさ、浦部瑞穂、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J Gonzalez、井上裕介 HNF4 $\gamma$  の転写活性化能の解析と相互作用タンパク質の探索、第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 2 日、神戸国際会議場 (神戸市)

Morimoto A, Kannari M, Tsuchida Y, Matsuta T, Saito C, Sasaki S, Maeda T, Kakizaki S, Gonzalez FJ, and Inoue Y. Hepatic HNF4 $\alpha$  cascade through modulation of miR-194/192. 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation. 2015 年 12 月 8 日、群馬大学 (前橋市)

佐々木翔太、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J Gonzalez、井上裕介 HNF4 $\gamma$  の機能解析、第 38 回日本生化学関東支部例会、2015 年 6 月 20 日、新潟日報メディアシップ (新潟市)

Maeda T, Sasaki S, Suzuki J, Irie R, Gonzalez FJ, and Inoue Y. Investigation of hepatic HNF4 $\gamma$ . International symposium on homeostasis through development, life and diseases. 2014 年 11 月 7 日、群馬大学 (前橋市)

Morimoto A, Kannari M, Tsuchida Y, Matsuta T, Saito C, Sasaki S, Maeda T, Gonzalez FJ, and Inoue Y. Investigation of a novel HNF4 $\alpha$  network through miR-194/192. 1<sup>st</sup> International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6<sup>th</sup> International Conference on Advanced Micro-Device Engineering. 2014 年 12 月 5 日、桐生市市民文化会館 (桐生市)

守本葵、神成真名、土田雄一、齊藤千夏、松田強志、前田つかさ、佐々木翔太、行木信一、井上裕介 miR-194/192 を介した新規 HNF4 $\alpha$  ネットワークの解明、第 16 回日本 RNA 学会、2014 年 7 月 24 日、ウインクあいち (名古屋市)

佐々木翔太、前田つかさ、鈴木淳子、入

江亮太、阪口政清、Frank J Gonzalez、井上裕介 肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスにおける HNF4 $\gamma$  の機能解析、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（横浜市）

守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、前田つかさ、佐々木翔太、前田つかさ、井上裕介 miR-194/192 を介した新規 HNF4 $\alpha$  ネットワークの解明、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（横浜市）

有賀長透、齊藤千夏、瀧澤将行、行木信二、Frank J Gonzalez、井上裕介 PPAR $\alpha$  カスケードの活性化による脂肪肝の発症、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（横浜市）

神成真名、松田強志、齊藤千夏、土田雄一、前田つかさ、守本葵、行木信二、井上裕介 HNF4 $\alpha$  による miR-194/192 の発現制御機構の解析と標的遺伝子の同定、第 15 回日本 RNA 学会、2013 年 7 月 25 日、愛媛県県民文化会館（松山市）

小暮裕幸、半田佳宏、井上裕介、行木信二 ミトコンドリアにおける翻訳停滞解消因子 ICT1 および C12orf65 の機能解析、第 15 回日本 RNA 学会、2013 年 7 月 25 日、愛媛県県民文化会館（松山市）

小川正之、松尾峻介、藤村岳史、水井由美子、Frank J Gonzalez、井上裕介 2 型トランスフェリン受容体遺伝子の転写活性化機構の解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場（神戸市）

神成真名、守本葵、土田雄一、齊藤千夏、松田強志、前田つかさ、守本葵、行木信二、井上裕介 HNF4 $\alpha$  による miR-194/192 の発現制御機構の解析と標的遺伝子の同定、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場（神戸市）

大橋真衣子、横田聡美、坂本憲昭、Frank J Gonzalez、井上裕介 HNF4 $\alpha$  による補体遺伝子 C8 $\gamma$  の転写活性化機構の解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場（神戸市）

松田強志、神成真名、Frank J Gonzalez、井上裕介 肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスの血糖値低下機構の解明、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場（神戸市）

齊藤千夏、有賀長透、Frank J Gonzalez、

行木信二、井上裕介 PPAR $\alpha$  カスケードの活性化は肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスで脂肪肝を発症する、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際会議場（神戸市）

前田つかさ、佐々木翔太、鈴木淳子、江亮太、外丸靖浩、鈴木正則、太期健二、Frank J Gonzalez、阪口政清、行木信二、井上裕介 肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスにおける HNF4 $\gamma$  の機能解析、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸国際会議場（神戸市）

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 裕介 (INOUE, Yusuke)  
群馬大学・大学院理工学府・准教授  
研究者番号：90304302

### (2) 研究分担者

行木 信一 (NAMEKI, Nobukazu)  
群馬大学・大学院理工学府・准教授  
研究者番号：80302959

阪口 政清 (SAKAGUCHI, Mayakiyo)  
岡山大学・大学院医歯薬総合研究科・  
准教授  
研究者番号：70379840

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：