

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670430

研究課題名(和文) 脂肪酸伸長酵素Elovl6によるインフラマソーム制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the inflammasome regulatory mechanism by fatty acid elongase Elovl6

研究代表者

松坂 賢 (Matsuzaka, Takashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70400679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生活習慣病の発症に重要な慢性炎症の制御機構の一つとして注目されているNLRP3インフラマソームにおける脂肪酸伸長酵素Elovl6の役割を解析した。Elovl6欠損マウスの肝細胞および腹腔マクロファージでは、飽和脂肪酸(パルミチン酸)によるNLRP3インフラマソームの活性化が抑制された。このとき、パルミチン酸刺激により活性化されるNLRP3インフラマソームの上流制御因子の一つが、Elovl6欠損マウスの細胞では抑制されることが明らかとなった。Elovl6の阻害が慢性炎症を抑制し、生活習慣病の改善にはたらく可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of fatty acid elongase Elovl6 in the regulation of NLRP3 inflammasome. Saturated fatty acid palmitate-induced NLRP3 inflammasome activation was suppressed in hepatocytes and macrophages of Elovl6KO mice as compared with those of wild-type mice. Moreover, we observed that one of the regulatory factors of NLRP3 inflammasome was suppressed in hepatocytes and macrophages of Elovl6KO mice. Our findings suggest that inhibition of Elovl6 could be a new therapeutic approach for ameliorating metabolic inflammation through suppression of NLRP3 inflammasome.

研究分野：代謝内分泌学

キーワード：脂肪酸 炎症 インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満とそれに伴う糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の基盤病態として、炎症の関与が注目されている。肥満が、脂肪組織、肝臓、膵β細胞といったエネルギー代謝組織において炎症反応を誘導し、この炎症と代謝性疾患が高度に結びついていることが多くの研究から明らかになった。しかしながら、各疾患においてどのような機序で慢性炎症が生じ、どのような炎症性物質が産生されることで、病態の発症や進展に関与しているかについては十分に理解されていない。

生活習慣病の発症と悪化において、脂肪酸の代謝異常が深く関わっている。過栄養や肥満による脂質過剰蓄積は、脂肪毒性により種々の細胞ストレスの活性化や非感染性の持続性炎症を引き起こし、肝臓や骨格筋におけるインスリン抵抗性、膵β細胞におけるインスリン分泌障害、血管内皮障害などの機能障害をもたらすと考えられている。さらに最近、脂肪酸の「量」のみならず、鎖長や不飽和度などの「質」の違いが、生活習慣病の病態形成に重要であることが明らかになってきた。

脂肪酸伸長酵素 Elongation of very long-chain fatty acids family member 6 (Elovl6)は炭素数 12~16 の飽和・モノ不飽和脂肪酸を基質とし、炭素数 18 以上の長鎖飽和・1価不飽和脂肪酸の生合成に重要なリポジェニック酵素である。我々は Elovl6 欠損マウスを作製、解析し、このマウスでは肝臓における脂肪酸組成が鎖長や不飽和度に応じて著しく変化するとともにエネルギー代謝関連遺伝子発現が変化し、肥満に伴うインスリン抵抗性の発症が抑制されることを明らかにした。さらに、生活習慣病の肝の表現型であり炎症を基盤病態とする非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症・進展が Elovl6 欠損マウスでは抑制されること、その分子機序として、Elovl6 欠損マウスの初代肝細胞では、飽和脂肪酸であるパルミチン酸(C16:0)により惹起される NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームの活性化とそれによる炎症が抑制されることを明らかにした。したがって、Elovl6 による脂肪酸の炭素数 16 から 18 への伸長が重要な炎症起点である可能性が示唆される。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、Elovl6 によるインフラマソームの制御機構を肝細胞およびマクロファージに着目して解析し、脂質蓄積病態において細胞内で量的・質的に変化し、インフラマソームを活性化または抑制する脂質の同定と、その脂質による炎症制御機序を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 解析対象の作製

肝細胞：野生型マウスおよび Elovl6 欠損

マウスから初代肝細胞を単離し、培地中にパルミチン酸を加えてインフラマソームを活性化させる。また、LPS (リポ多糖) の添加により TLR4 経路を活性化させる実験系と、パルミチン酸とともに LPS も添加し炎症を活性化させる系も準備する。

マクロファージ：野生型マウスおよび Elovl6 欠損マウスから腹腔マクロファージを採取する。そのマクロファージに対して、肝細胞と同様にパルミチン酸刺激、LPS 刺激、パルミチンおよび LPS の共刺激を行う。

(2) インフラマソーム活性化の解析

上記条件で培養した初代肝細胞およびマクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソームの構成因子である NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β の発現をリアルタイム PCR で解析する。また、インフラマソーム誘導性の炎症性サイトカインである IL-1 β と IL-18 の培地中への分泌量を ELISA にて解析する。

(3) 遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

Elovl6 欠損細胞でインフラマソーム活性化に変化が認められた条件の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現パターンの網羅的プロファイリング、発現が増加あるいは減少している遺伝子のクラスタリングを行い、Elovl6 の欠損が最も強く反映されている代謝経路やシグナル伝達経路を抽出する。得られたデータはリアルタイム PCR 法にて確認検討し、インフラマソーム活性化との関連を解析する。

(4) 脂質遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

Elovl6 欠損細胞でインフラマソーム活性化および炎症に変化が認められた条件の細胞をサンプルに、脂肪酸組成の分析と、脂肪酸代謝物の包括的な脂質メタボローム解析を行い、Elovl6 の欠損による脂肪酸組成の変化とインフラマソーム活性の変化が強く反映されている脂肪酸代謝物の候補を抽出する。

4. 研究成果

初代培養肝細胞における検討から、野生型マウスと比較して Elovl6 欠損マウスの肝細胞では、パルミチン酸の刺激に応じた脂質酸化および中性脂肪合成が異なることが明らかとなった。また、インフラマソームに加えて小胞体ストレス応答も異なることが明らかとなった。さらに、パルミチン酸刺激により活性化される NLRP3 インフラマソームの上流制御因子の 1 つが、Elovl6 欠損マウスの初代肝細胞では抑制されることが明らかとなった。

腹腔マクロファージにおける検討では、Elovl6 欠損マウスの腹腔マクロファージは野生型マウスのマクロファージに比べて、パルミチン酸や LPS の刺激がない状態での炎症性サイトカイン分泌が低い傾向が認められた。また、Elovl6 欠損マクロファージでもパルミチン酸による NLRP3 インフラマソームの

活性化が抑制される傾向が認められたが、実験間のばらつきが大きく、さらなる追加実験と実験材料および実験条件の検討が必要である。

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 5 件)

(1) Nakagawa Y, Satoh A, Yabe S, Furusawa M, Tokushige N, Tezuka H, Mikami M, Iwata W, Shingyouchi A, Matsuzaka T, Kiwata S, Fujimoto Y, Shimizu H, Danno H, Yamamoto T, Ishii K, Karasawa T, Takeuchi Y, Iwasaki H, Shimada M, Kawakami Y, Urayama O, Sone H, Takekoshi K, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Hepatic CREB3L3 Controls Whole-Body Energy Homeostasis and Improves Obesity and Diabetes. *Endocrinology*. 155(12):4706-19, 2014. 査読有

(2) Nie T, Matsuzaka T, Suzuki M, Nakano Y, Hui Z, Yokoo T, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Okajima Y, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Shimada M, Nakagawa Y, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Ablation of Elovl6 protects pancreatic islets from high-fat diet-induced impairment of insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 450(1):318-23, 2014. 査読有

(3) Sunaga H, Matsui H, Ueno M, Maeno T, Iso T, Syamsunarno MR, Anjo S, Matsuzaka T, Shimano H, Yokoyama T, Kurabayashi M. Deranged fatty acid composition causes pulmonary fibrosis in Elovl6-deficient mice. *Nature communications* 4:2563, 2013.

(4) Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Nishi M, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Kubota M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Iizuka Y, Itaka K, Kataoka K, Shioda S, Nijima A, Yamada T, Katagiri H, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nature Communications*. 4:2316, 2013. 査読有

(5) Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, Okuda K, Shingyouchi A, Naka A, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yahagi N, Shimada M, Yatoh S, Suzuki H, Yogosawa S, Izumi T, Sone H, Urayama O, Yamada N, Shimano H. TFE3 Controls Lipid Metabolism in Adipose Tissue of Male Mice by Suppressing Lipolysis and Thermogenesis. *Endocrinology*. 154(10):3577-88, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

(1) 大野博、松坂賢、吉田恵里子、伏見友希、所司慶太、島野仁、「高次脳機能における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜、神奈川。

(2) 吉田恵里子、松坂賢、大野博、伏見友希、所司慶太、島野仁、「脳神経系の形成と発達における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜、神奈川。

(3) 伏見友希、松坂賢、大野博、吉田恵里子、藤万里子、飯田薫子、中川嘉、矢作直也、島野仁、「アストロサイトの代謝および機能における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜、神奈川。

(4) 松坂賢、中野雄太、趙会、唐寧、鈴木真璃衣、中川嘉、嶋田昌子、武内謙憲、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、高橋昭光、矢作直也、鈴木浩明、山田信博、島野仁。第 35 回日本肥満学会「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の欠損は db/db マウスの 2 型糖尿病の発症・進展を抑制する」2014 年 10 月 25 日、フェニックスシーガイアリゾート コンベンションセンター、宮崎

(5) Takashi Matsuzaka, Yuta Nakano, Zhao Hui, Marii Suzuki, Tang Nie, Yoshimi Nakagawa, Naoya Yahagi, Nobuhiro Yamada, Hitoshi Shimano. "Deletion of Elovl6 ameliorates hyperglycemia in db/db mice." 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, September 13, 2014. Kyoto International Conference Center, Kyoto.

(6) 松坂賢、日本内分泌学会 第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 による脂肪酸組成制御と生活習慣病」2014 年 7 月 10 日～12 日、富士レークホテル、山梨。

(7) 大野博、松坂賢、唐ネ、中川嘉、矢作直也、山田信博、島野仁。第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、「脂質合成転写因子 SREBP-1a トランスジェニックマウスは ob/ob マウスの肥満を抑制する」2014 年 7 月 11 日、京王プラザホテル、東京。

(8) 大野博、松坂賢、唐ネ、中川嘉、嶋田昌子、岩崎仁、小林和人、高橋昭光、矢藤繁、矢作直也、鈴木浩明、山田信博、島野仁。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会『脂質合成制御転写因子 SREBP-1a トランスジェニックマウスの脂肪萎縮機序とそのエネルギー代謝におよぼす影響』(口頭発表)、2014 年 5 月 23 日、大阪国際会議場

(9) 松坂賢、中野雄太、趙会、唐寧、鈴木真璃衣、中川嘉、嶋田昌子、武内謙憲、岩崎仁、小林和人、高橋昭光、矢藤繁、矢作直也、鈴木浩明、山田信博、島野仁。第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会、「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の欠損は db/db マウスの糖尿病の発

症・進展を抑制する」2014年5月22日、大阪国際会議場、大阪。

(10) 煙山(鈴木)紀子、松坂賢、所司慶太、加藤淳子、唐ネ、久芳素子、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、石井清明、中川嘉、嶋田昌子、矢作直也、鈴木浩明、山田信博、島野仁
第34回日本肥満学会、「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 欠損マウスにおける食餌嗜好性への影響」2013年10月12日、東京国際フォーラム、東京。

(11) 松坂賢、渥美綾香、唐寧、煙山紀子、久芳素子、中川嘉、嶋田昌子、小林和人、矢藤繁、高橋昭光、曾根博仁、矢作直也、鈴木浩明、中牟田誠、山田信博、島野仁。第34回日本肥満学会、「非アルコール性脂肪性肝炎における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」2013年10月11日、東京国際フォーラム、東京。

(12) 煙山(鈴木)紀子、松坂賢、所司慶太、加藤淳子、唐ネ、久芳素子、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、石井清明、中川嘉、嶋田昌子、矢作直也、鈴木浩明、山田信博、島野仁
第86回日本内分泌学会学術総会「脂肪酸伸長酵素 Elovl6 欠損マウスはショ糖嗜好性が亢進する」2013年4月25日、仙台国際センター、宮城。

(13) 唐ネ、松坂賢、鈴木真璃衣、中野雄太、煙山(鈴木)紀子、久芳素子、岩崎仁、小林和人、矢藤繁、石井清明、中川嘉、嶋田昌子、矢作直也、鈴木浩明、山田信博、島野仁
第86回日本内分泌学会学術総会「膵β細胞における脂肪酸伸長酵素 Elovl6 の役割」2013年4月26日、仙台国際センター、宮城。

〔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.u-tsubu-endocrinology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松坂 賢 (MATSUZAKA TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70400679

(2) 研究分担者

高橋 昭光 (TAKAHASHI AKIMITSU)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70344893