

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860088

研究課題名(和文) 肝臓AhRによる脂肪毒性抑制作用の解明

研究課題名(英文) The role of AhR on HFD-induced hepatic lipotoxicity

研究代表者

和田 平 (WADA, Taira)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：20597398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：内臓脂肪型肥満を基盤とした非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、肝実質細胞の壊死、炎症、線維化などを伴い、肝がんへと進行する生活習慣病である。NASHの主たる基盤病態として肝臓への過剰な脂質蓄積が挙げられている。これまでに、我々はダイオキシン類の受容体(AhR)について研究を進めている。近年、AhRが異物代謝のみならずエネルギー代謝調節への関与が示唆されていることから、高脂肪食誘発性の脂肪毒性発現におけるAhRの機能解析を行った。AhRは脂肪毒性の発症を抑制的に制御していることが示された。AhRを介したNASH発症機構の解明は、様々な炎症性肝疾患の治療法の確立に繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcriptional factor regulating the expression of genes involved in xenobiotic response. Recent studies have suggested that AhR plays essential roles in not only xenobiotic detoxification but also energy metabolism. Thus, in this study, we studied the roles of AhR in lipid metabolism. Under high fat diet (HFD) challenge, liver-specific AhR-knockout (AhR LKO) mice exhibited severe steatosis, inflammation, and injury in the liver. Induction of suppressor of cytokine signal 3 (Socs3) expression by HFD was attenuated in the livers of AhR LKO mice. Rescue of the Socs3 gene in the liver of AhR LKO mice cancelled the HFD-induced hepatic lipotoxicities. These results indicated that AhR plays protective roles against HFD-induced hepatic steatosis and the subsequent lipotoxicity effects, such as inflammation, and that the mechanism of the protection involves the direct transcriptional regulation of Socs3 expression by AhR.

研究分野：内分泌・代謝

キーワード：AhR SOCS3 NASH

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン類は、発がん性、催奇形性などの毒性作用に加え、内分泌かく乱化学物質として生殖機能をはじめとする様々な生体機能の恒常性の破綻を引き起こす。ダイオキシン類は、細胞内に存在する受容体型転写因子 Aryl hydrocarbon receptor(AhR)に結合し、薬物代謝酵素の発現を誘導する。AhR は、その欠損マウスがダイオキシン類が示す毒性の全てではないにしろ、ほとんどにおいて耐性を示すことから、ダイオキシン類が示す毒性発現に深く関与していると考えられている。一方、AhR 欠損マウスは血管の線維化、生殖機能低下などを示すことから、AhR は、生体の恒常性維持に重要な役割を担っていることが示唆されている。しかしながら、AhR に関する検討はダイオキシン類などの環境汚染物質の毒性発現メカニズム解析の観点から行われてきたため、各組織における AhR の生理機能の詳細は未だ明らかにされていない。

我々は以前に、脂肪細胞分化過程において AhR がダイオキシンなどのリガンド依存的ならびに非依存的に脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした。(Shimba et al., 1998, Shimba, Wada, et al. 2001)。また、脂肪酸トランスポーターである CD36 ならびに NADPH oxidase 複合体サブユニット p40^{phox} 遺伝子のプロモーター解析より、2つの新規 AhR 標的遺伝子を同定し、ダイオキシンの毒性発現メカニズムの一端を明らかにした(Lee, Wada, et al. 2010, Wada et al., 2013)。

2. 研究の目的

ダイオキシン類の受容体として知られている Aryl hydrocarbon receptor (AhR)は、環境汚染物質などの外来異物の毒性発現を媒介するのみならず、各臓器の発生および生理機能の維持などに重要な生体内因子であることが明らかにされつつある。肝臓は、脂肪組織とともにダイオキシン類の蓄積であることに加え、

AhRが高発現している組織の一つである。しかしながら、肝臓AhRの生理機能については未だ不明な点が多い。本研究では、高脂肪食誘発性の炎症および肝障害などの脂肪毒性発現におけるAhRの役割およびその制御機構を明らかにすることで、ダイオキシン類などの環境汚染物質の生体影響の理解を深めることを目的とする。

3. 研究の方法

動物実験は日本大学薬学部実験動物倫理規定に基づいて行った。また、マウスは1ケージあたり4-5匹に分配し、温度23±1、相対湿度50±10%、明暗12時間周期の条件で飼育した。マウス飼料は通常食には固形NMFを用い、高脂肪食にはHigh fat diet 32 (HFD)を用いて自由摂取とした。肝臓特異的AhR欠損 (AhR LKO)マウスは、AhR^{flox/flox}マウスと肝臓特異的Creリコンビナーゼを発現するマウスを交配することにより作製した。また肝臓特異的SOCS3トランスジェニック(S3 Tg)マウスは、Albuminプロモーターの下流にSOCS3 cDNAをサブクローニングし、これをC57BL/6Jマウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより作製した。病理組織学的解析はヘマトキシリン・エオジン染色・免疫染色ならびに鏡検により行った。各組織および細胞における遺伝子の発現量については、RT-qPCR法により測定した。遺伝子上のプロモーター解析は、ルシフェラーゼアッセイおよびChromatin Immunoprecipitation (ChIP) アッセイを用いて行った。

4. 研究成果

脂肪毒性発現における肝臓 AhR の機能を明らかにするため、16週齢の AhR LKO 雄マウスおよび AhR^{flox/flox} 雄マウスに高脂肪食 (High fat diet(HFD))あるいは通常食 (Chow diet)を12週間給餌した。高脂肪食誘発性の体重増加および組織重量の変化において両群

間に違いは認められなかった。そこで AhR LKO マウスの肝臓切片を作製し、病理組織学的に解析したところ、大滴性の脂肪沈着が多く観察された(図 1)。それに付随して肝臓トリグリセリド含量(図 2)ならびに脂肪酸合成酵素の発現量の増加が認められた。

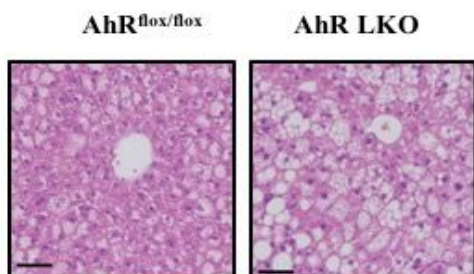


図1 肝臓組織切片像 (HFD)

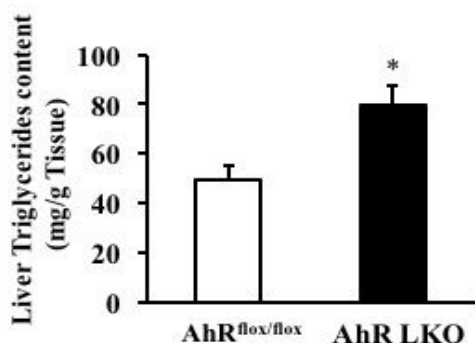


図2 肝臓トリグリセリド含量 (HFD)

また、AhR LKO マウスの肝臓において炎症性細胞の浸潤および炎症関連遺伝子の発現増加が見られた。さらに肝障害マーカーである血清 ALT および AST 活性の増加も認められた。その一方、高脂肪食誘発性の脂肪細胞の肥大化および脂肪組織におけるマクロファージの浸潤の程度に違いは認められなかった。

そこで、AhR LKO マウスにおける脂肪毒性発現メカニズムを明らかにするため、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、高脂肪食負荷は、肝臓において炎症を惹起すると同時にその鎮静を目的として炎症性サイトカインシグナル抑制因子 Suppressor of cytokine signal 3 (SOCS3)を誘導するが、AhR LKO マウスの肝臓ではこの SOCS3 の発現増加が著しく抑制されていた。また肝臓特異的 SOCS3

欠損マウスは、AhR LKO マウスと同様に高脂肪食誘発性の脂肪毒性を発症することが報告されている (Sachithanandan *et al.*, 2010)。

したがって、AhR LKO マウスにおける脂肪毒性の発現は SOCS3 発現量の低下に起因することが推察される。そこで肝臓特異的 SOCS3 トランスジェニックマウスを作製し、これとの交配により AhR LKO マウスの肝臓に SOCS3 を過剰発現させた AhR LKO/S3 Tg マウスを作製した。高脂肪食を負荷した AhR LKO マウスにおいて観察された大滴性の脂肪沈着やトリグリセリド含量の増加、炎症の増悪化および肝障害の亢進などの脂肪毒性は、SOCS3 発現量を回復させた AhR LKO/S3 Tg マウスにおいて AhR^{flox/flox} マウスのそれらとほぼ同程度にまで抑制された。

次いで、SOCS3 遺伝子発現調節における AhR の関与を検討した。AhR のリガンドである 3-メチルコランスレン(3MC)を投与して、AhR の活性化による肝臓での SOCS3 発現量を検討したところ、3MC を投与した AhR^{flox/flox} マウスの肝臓において SOCS3 遺伝子発現量は増加した。一方、AhR LKO マウスにおいてその増加は著しく抑制された。次に、SOCS3 遺伝子のプロモーター解析を行い、SOCS3 遺伝子のプロモーター領域に存在する AhR 結合サイト (XRE) への AhR の直接的な結合を ChIP assay により確認した。またこの XRE を含む SOCS3 リポーター遺伝子を用いて転写活性を検討したところ、AhR 依存的にプロモーター活性の増加が認められた。すなわち SOCS3 は AhR の新規の標的遺伝子であることが明らかとなった。以上の結果より、肝臓 AhR は SOCS3 の発現調節を介して脂肪毒性の発症を抑制的に制御していることが示された。AhR による SOCS3 を介した NASH 発症機構の解明は、サイトカインシグナルと関連が示唆されている様々な炎症性肝疾患の分子基盤および有用な治療法の確立に繋がる可能性を秘めている。

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 4 件)

1. Imai, T., Kosuge, Y., Saito, H., Uchiyama, T., Wada, T., Shimba, S., Ishige, K., Miyairi, S., Makishima, M., Ito, Y. Neuroprotective effect of S-allyl-L-cysteine derivatives against endoplasmic reticulum stress-induced cytotoxicity is independent of calpain inhibition. *J Pharmacol Sci.* 130:185-8. (2016) (査読有)
2. Wada, T., Sunaga, H., Miyata, K., Shirasaki, H., Uchiyama, Y., Shimba, S. Aryl hydrocarbon receptor plays protective roles against HFD-induced hepatic steatosis and the subsequent lipotoxicity via direct transcriptional regulation of Socs3 expression. *J. Biol. Chem.* **291**:7004-7016 (2016) (査読有)
3. Oikawa, N., Nobushi, Y., Wada, T., Sonoda, K., Okazaki, Y., Tsutsumi, S., Park, Y.K., Kurokawa, M., Shimba, S., Yasukawa, K. Inhibitory effects of compounds isolated from the dried branches and leaves of murta (*Myrceugenia euosma*) on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *J. Nat. Med.* 70:502-9 (2016) (査読有)
4. Ihunnah, C.A., Wada, T., Philips, B.J., Ravuri, S.K., Gibbs, R.B., Kirisci, L., Rubin, J.P., Marra, K.G., Xie, W. Estrogen sulfotransferase/SULT1E1 promotes human adipogenesis. *Mol. Cell Biol.* **34**:1682-1694 (2014) (査読有)

[学会発表](計 12 件)

1. 和田平、笠倉由貴、松原惇、榛葉繁紀 Ahレセプターは脂肪組織における肥満依存性の炎症誘発を介して糖尿病発症

に關与する 平成28年12月2日 第39回
日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜
(神奈川・横浜)

2. 和田平、山本普子、榛葉繁紀
アディポネクチンによる時間依存的な
らびに非依存的な糖・脂質代謝調節
平成28年12月2日 第39回日本分子生
物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川・
横浜)
3. 和田平、斎藤賢宏、榛葉繁紀 コレステ
ロール胆石形成における体内時計シス
テムの関与 平成28年9月11日 フォ
ーラム 2016: 衛生薬学・環境トキシコ
ロジー 昭和大学旗の台キャンパス(東
京・品川)
4. 柴田恵里、和田平、榛葉繁紀 体内時計
システムを介した脂肪組織—精巣間ク
ロストークによる血中エストロゲン量
の制御 平成28年8月20日 第21回
アディポサイエンス研究会シンポジウ
ム 千里ライフサイエンスセンター(大
阪・豊中)
5. 山本普子、和田平、榛葉繁紀
アディポネクチンは、体内時計システム
を介してコレステロール量の恒常性を
制御する 平成28年8月20日 第21回ア
ディポサイエンス研究会シンポジウム
千里ライフサイエンスセンター(大阪・
豊中)
6. 横田美咲、和田平、榛葉繁紀
体内時計調節薬(REV-ERBリガンド)に
よるレプチン量ならびに摂食量の調節
平成28年8月20日 第21回アディポサイ
エンス研究会シンポジウム 千里ライ
フサイエンスセンター(大阪・豊中)
7. 和田平 体内時計の機能低下に伴う代謝
性肝疾患の発症とその機構 平成28年3
月28日 日本薬学会第136年会(招待
講演)パシフィコ横浜(神奈川・横浜)

8. 大橋祥世、田中融、齋藤弘明、和田平、青山忠、小林俊亮 がん悪性を誘発する YB-1 タンパク質の核内蓄積に関わる因子の解析 平成 28 年 3 月 29 日 日本薬学会第 136 年会 パシフィコ横浜(神奈川・横浜)
9. 和田平 肝臓 BMAL1 による臓器連関を介した血糖値制御機構 平成 27 年 9 月 12 日 第 59 回日本薬学会 関東支部大会 (招待講演) 日本大学薬学部 (千葉・船橋)
10. 和田平、笠倉 由貴、榛葉繁紀 Ah(ダイオキシン)レセプターは脂肪組織における肥満依存性の炎症誘発を介して糖尿病発症に関与する 平成 27 年 3 月 27 日 日本薬学会第 135 年会 神戸学院大学 (兵庫・神戸)
11. 和田平 Aryl hydrocarbon receptor の機能解析を通じたダイオキシン類の毒性発現機構の解明 平成 26 年 9 月 19 日 フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー (招待講演) つくば国際会議場 (茨城・つくば)
12. 笠倉由貴、和田平、榛葉繁紀 脂肪組織の Ah (ダイオキシン) レセプターは肥満に依存した糖尿病発症の原因分子である 平成 26 年 9 月 19 日 フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー つくば国際会議場 (茨城・つくば)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.nihon-u.jp/eisei.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 平 (WADA Taira)

日本大学・薬学部・助教