

# 肝臓のオートファジー・リソソーム経路由来の 臓器間栄養代謝制御機構の解明

帝京大学医学部内科学講座

准教授 宇野 健司

(共同研究者)

帝京大学医学部内科学講座	主任教授	塚本 和久
帝京大学医学部内科学講座	助教	男澤 悠貴
帝京大学医学部内科学講座	助教	内野 卓也
帝京大学医学研究科	大学院生	佐山 遥平
帝京大学医学研究科	大学院生	鈴木 崇史

## はじめに

生物界では、哺乳動物の生命機能、特に代謝恒常性は体内から分泌される生理活性物質や、鋭敏な反応性をもつ自律神経系を介して、各臓器が連携することで維持される。しかし、飽食の時代、豊かな栄養下でのカロリー過剰摂取や運動不足に起因する肥満を背景として、この代謝の恒常性維持機構が破綻してしまい、糖尿病・メタボリックシンドロームの病態に繋がることが社会的・医療経済的に大きな問題となっている。

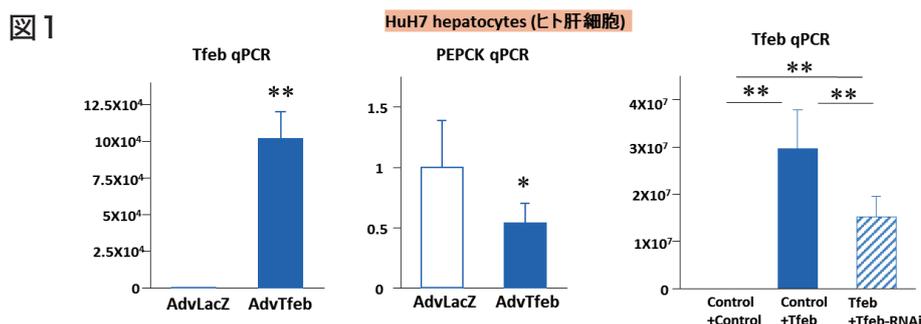
本研究代表者は、肝臓由来の自律神経シグナルにより構築された神経ネットワークが、全身各臓器の代謝を協調的に制御する臓器間代謝連携機構が体内には存在すること、そしてこのシステムが個体の代謝恒常性維持という生理機能と病態生理を有していることを明らかにしてきた<sup>(1, 2, 3, 4)</sup>。このように、臓器間神経ネットワークが、全身各臓器の代謝を協調的に制御する反面、病態にも関わる側面を有していることを踏まえると、この神経ネットワーク機構を何らかの方法でうまく制御することができれば、糖尿病・メタボリックシンドロームに対して包括的な治療を施すことに繋がると期待される。

本研究では、栄養素（糖・脂質・アミノ酸）の代謝経路の最終段階に位置するオートファジー・リソソーム経路に注目し、特に肝臓におけるこの経路が個体レベルでどのように栄養素代謝と関わるのか、肝臓以外の臓器との連携機構を解明する。既報において、リソソーム生合成を司る転写因子transcription factor EB (Tfeb) を肝臓でのみ欠損すると脂肪肝の増悪を来す一方、この因子を後天的に戻すと肝臓のみならず脂肪組織への遠隔作用をもたらすことが示されている<sup>(5)</sup>。そこで、肝臓のリソソーム制御を起点として、肝臓と脳、栄養素の供給源である脂肪組織や筋肉組織、腸管との間で機能する、新規臓器連携による栄養素調節機構と、肥満や加齢に伴っていかに変調を来し病態増悪に寄与するのか、その解明を目標とする。

## 結 果

### 1. ヒト肝細胞株を用いた研究

リソソーム生合成の転写因子Tfebに着目し、組換えアデノウイルス（過剰発現Tfebアデノ）、RNAiアデノウイルスを用いて、ヒト肝細胞（HuH7 hepatocytes）へ遺伝子導入を行った。過剰発現したTfebは、RNAiアデノウイルスを用いることで、そのTfeb発現は抑制された。過剰発現細胞では、特に、糖新生に関わる律速酵素PEPCKの発現が有意に低下しており、Tfebの制御が肝糖新生を調節する可能性が示唆された（図1）。

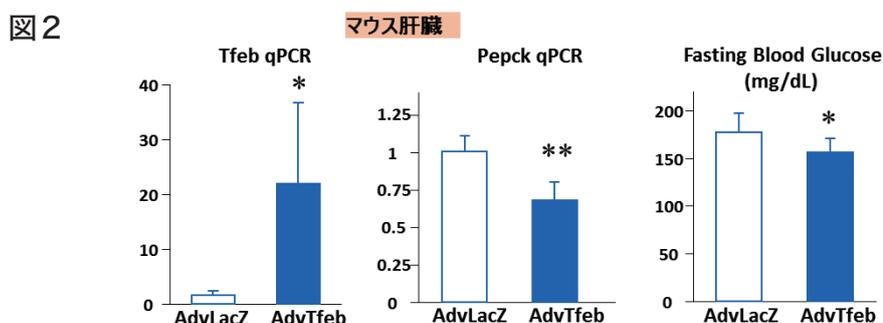


また、過剰発現細胞を用いて、マイクロアレイによる網羅的解析を施行した（結果未掲載）。この解析にて発現変化が見られた遺伝子群から、下流の候補遺伝子の絞り込みは、今後進める予定である。

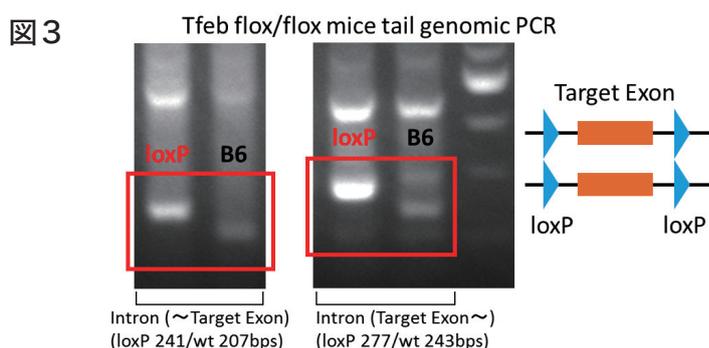
また、CRISPR/CAS9ゲノム編集技術を用いて、Tfeb遺伝子変異ヒト肝細胞株（HuH7 hepatocytes）の樹立を行った。今後、このCRISPR/CAS9による変異細胞株を基に、Tfeb遺伝子の発現抑制の程度を検討した上で、マイクロアレイによる網羅的解析を計画している。

### 2. モデルマウスを用いた研究

Tfebアデノウイルスをマウス尾静脈から注射することで、肝臓への遺伝子導入モデルマウス（Tfebマウス）構築を行った。このTfebマウスでは、肝臓への過剰発現はreal-time PCRで確認しており、特に、肝糖新生に関わる酵素Pepckの発現低下も認めた。さらに、空腹時血糖の低下を認めており（図2）、今後は糖代謝の詳細な解析を進める予定である。



また、共同研究機関とのcollaborationにて、CRISPR/CAS9ゲノム編集技術を用いたTfeb flox/floxマウス構築を遂行した。欠損すべき目的Exonを選定し、その両端にloxP配列(34塩基)を挿入するようにsingle strand ODNのconstructを設計した。このssODN、crRNA、tracrRNA、およびCAS9ヌクレアーゼ蛋白をマウス胚へinjectionし、ゲノム編集を行ったマウスを獲得した。マウスgenome PCRを行い、実際に目的Exonの両端にloxP配列が挿入されていることを検討した。図3のように、対照のC57BL/6 (B6) マウスに比べ、loxPの34塩基配列分の上昇が見られたバンドを確認した。以上から、CRISPR/CAS9システムにより、両方のgenomeにloxP配列が挿入された目的マウス (Tfeb flox/floxマウス) が得られた (図3)。



このマウスと、既に作製済みの肝臓Cre recombinase発現マウスとを交配し、Cre/loxPシステムにより肝臓でTfeb遺伝子欠損モデルマウス構築を進めている。現時点では、Cre/wt ; Tfeb flox/wtのマウスまで得られており、今後、目的のCre/wt ; Tfeb flox/floxマウス作製を目指している。

## 考 察

生体内の各臓器におけるオートファジー経路は、臓器の栄養代謝と密接な関わりを有しており、様々な作用を介してリソソームによる加水分解の最終過程にたどり着く。このリソソームの生合成を司る転写因子としては、Tfebの機能が重要であるとされており、本研究で着目しその調節を試みた。

これまでの報告<sup>(5)</sup>において、Tfebを肝臓でのみ欠損したモデルマウスの検討では、肝臓局所的には脂肪肝の増悪を来すことが示された。一方で、この転写因子Tfebを後天的に戻すことにより、肝臓局所の効果のみならず、脂肪組織への遠隔作用をもたらすことが示された。この報告により、肝臓のオートファジー・リソソーム経路の制御が、遠隔臓器、ひいては個体全体に対して臓器連携作用を有していることが推察された。

そこで、本研究において、上記の結果に記載のように、ヒト肝細胞株、モデルマウスを用いたTfeb遺伝子導入を行うことで、特に、肝臓の糖新生の制御という糖代謝に影響を及ぼすpreliminaryながら有望な結果が得られた。

今後の方向性として、肝臓への過剰発現モデルマウスと、Cre/loxPシステムを用いた肝臓特異的なTfeb欠損マウスを用いて、詳細な糖代謝の検討を行うことで、肝臓のリソソーム調節による新規の糖代謝制御機構と、糖尿病に与える病態意義の解明に繋がると考えられる。

## 要 約

生命では、各臓器の糖・脂質・アミノ酸代謝が連携し、個体の代謝恒常性が維持される。特に、肝臓の臓器内におけるオートファジー・リソソームの制御に着目し、ヒト細胞株およびモデルマウスを用いた研究を進めた。その中で、リソソームの生合成に関わる遺伝子Tfebを調節することで、肝臓の糖新生に関わる新規機序が存在することを示唆する結果が得られた。今後は、遺伝子組換えモデルマウスの構築を進めていき、個体の糖代謝を含む各栄養代謝に及ぼす生理的・病態的メカニズムを解明したい。

## 文 献

1. Kenji Uno, Hideki Katagiri, Tetsuya Yamada, Yasushi Ishigaki, Takehide Ogihara, Junta Imai, Yutaka Hasegawa, Junhong Gao, Keizo Kaneko, Hiroko Iwasaki, Hisamitsu Ishihara, Hironobu Sasano, Kouichi Inukai, Hiroyuki Mizuguchi, Tomoichiro Asano, Masakazu Shiota, Masamitsu Nakazato, and Yoshitomo Oka. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* 312:1656-9, 2006.
2. Kenji Uno, Tetsuya Yamada, Yasushi Ishigaki, Junta Imai, Yutaka Hasegawa, Junhong Gao, Keizo Kaneko, Kimihiko Matsusue, Tomomi Yamazaki, Yoshitomo Oka, and Hideki Katagiri. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  -fat-specific protein 27 pathway contributes to obesity-related hypertension via afferent vagal signals. *European Heart Journal* 33:1279-89, 2012.
3. Kenji Uno, Tetsuya Yamada, Yasushi Ishigaki, Junta Imai, Yutaka Hasegawa, Shojiro Sawada, Keizo Kaneko, Hiraku Ono, Tomoichiro Asano, Yoshitomo Oka, and Hideki Katagiri. A hepatic amino acid/mTOR/S6K-dependent signalling pathway modulates systemic lipid metabolism via neuronal signals. *Nature Communications* 6:7940 doi: 10.1038/ncomms8940, 2015.
4. Kenji Uno. Roles of the interorgan neuronal network in the development of metabolic syndrome. *Diabetology International*, doi: 10.1007/s13340-016-02777-8, 2016.
5. Carmine Settembre, Rossella De Cegli, Gelsomina Mansueto, Pradip K. Saha, Francesco Vetrini, Orane Visvikis, Tuong Huynh, Annamaria Carissimo, Donna Palmer, Tiemo Jürgen Klisch, Amanda C. Wollenberg, Diego Di Bernardo, Lawrence Chan, Javier E. Irazoqui & Andrea Ballabio. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nature Cell Biology* 15: 647-58, 2013.