



Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport

川野, 佑輝

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2011-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5190

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005190>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



| | |
|------------|------------------|
| 氏 名 | 川野 佑輝 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（医学） |
| 学 位 記 番 号 | 博い第 5190 号 |
| 学位授与の 要 件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当 |
| 学位授与の 日 付 | 平成 23 年 3 月 25 日 |

【 学位論文題目 】

Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport (アリールハイドロカーボン受容体の活性化によって誘発される脂肪肝は脂肪酸の取り込みの亢進が原因である)

審 査 委 員

| | | |
|-----|-----|-------|
| 主 査 | 教 授 | 林 祥剛 |
| | 教 授 | 平田 健一 |
| | 教 授 | 匂坂 敏朗 |

(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport

アリールハイドロカーボン受容体の活性化によって誘発される脂肪肝は
脂肪酸の取り込みの亢進が原因である

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
消化器内科学
(指導教員：東健教授)

川野佑輝

アリールハイドロカーボン受容体 (AHR) は、helix-loop-helix/Per-ARNT-Simドメインをもつ転写因子である。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD)、ポリ塩化ビフェニル (PCB)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、3-メチルコラントレン (3MC) などの様々な生体外物質がAHRのリガンドとして作用し、細胞質内に存在するAHRを活性化する。活性化したAHRは核内に移行した後にAHR nuclear translocatorと結合し、dioxin responsive elementと呼ばれるDNA領域に結合することで、腫瘍形成促進や奇形、免疫異常を引き起こす。またAHRは肝内に多く発現しており、脂肪肝の発症と関連があることが知られている。Boverhof等は、C57BL/6JマウスにTCDDを7日間経口投与することで脂肪肝を発症すること、Korenaga等もまた、アカゲザルにTCDDを4年間皮下注射し続けることにより脂肪肝を発症することを報告している。しかし、AHRの活性化による脂肪肝発症のメカニズムは未だ明らかにされていない。この研究の目的は、脂肪肝発症におけるAHRの役割を解明することである。

3MCはAHRの主要なリガンドの一つである。人工的に合成された化合物で、BaPと同じ多環芳香族炭化水素に属する。多環芳香族炭化水素はタバコの煙に含まれていることが知られている。この3MCをC57BL/6Jマウス (雄) に腹腔内投与し (100 mg/kg 体重)、8時間後に肝臓を摘出して凍結切片を作成、オイルレッドO染色液で細胞内脂質を染色した結果、中心静脈周囲に小滴性の脂肪沈着を多数認めた。さらに摘出した肝臓内の中性脂肪量を定量的に測定し、肝重量1gあたりの中性脂肪量が3MC投与群では1.5倍に増加することを明らかにした ($p < 0.05$)。また肝組織中の脂肪酸をガスクロマトグラフ質量分析法 (GC-MS) を用いて相対定量して32種類の脂肪酸の存在を明らかにし、その中でパルミチン酸 (C16:0) と6種類の一価不飽和脂肪酸 (C14:1, C16:1, C18:1, trans-C18:1, C20:1, C22:1) が1.2 ~ 3.3倍に有意に増加していることを確認した。一方、採取した血液サンプルのアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値、総ビリルビン値、総コレステロール値、中性脂肪値、遊離脂肪酸値、血糖値に関しては、両群間に有意差を認めなかった。これは3MCの肝臓での代謝が非常に速いためだと考えられる。実際、Moorthy等は、3MCの腹腔内投与1日後には3MC自体は0.94%しか肝内に残存していないと報告している。Remillard等は、代謝の非常に遅いTCDDを投与すると耐糖能異常や脂質異常症が生じることを報告しており、3MCを頻回に投与すれば同様の症状が生じる可能性がある。脂肪肝発症の原因として、(1) 脂肪酸合成の亢進、(2) 脂肪酸の取り込みの亢進、(3) ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の抑制、(4) very low density lipoprotein (VLDL) の合成と排出の抑制が考えられる。そこで脂肪酸の合成に関わる fatty acid synthase (FAS)、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送とミトコンドリアへの取り込みに関わる liver fatty acid binding protein (L-FABP) と carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)、VLDLの合成と排出に関わる microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の肝内のメッセンジャーRNA (mRNA) を定量的リアルタイムPCR (qPCR) 法により測定した結果、対照群と比較して有意な差は認められなかったものの、3MC投与群ではFASは減少する傾向、L-FABP、CPT1とMTPは増加する傾向にあることが明らかになった。また肝細胞内への脂肪酸の取り込みを促進する因子である fatty acid translocase (FAT) の肝内におけるmRNAをqPCR

法により測定し、対照群と比較して 3MC 投与群では 2.1 倍に増加すること、タンパク質の発現も 1.9 倍に増加することをウェスタンブロット法で明らかにした ($p < 0.05$)。細胞内の脂質代謝を制御する核内受容体として liver X receptor (LXR) α 、retinoid X receptor (RXR) α 、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α が知られている。これらの肝内の mRNA を qPCR 法により測定したところ、PPAR α は対照群と比較して 3MC 投与群で有意に上昇していたが、LXR α と RXR α に関しては両群間に明らかな差を認めなかった。PPAR α は FAT の合成を促進することが知られており、3MC によって活性化された AHR が PPAR α を活性化し、FAT の合成を促進することが示唆された。今後 AHR と PPAR α の間の分子メカニズムを解明するには、さらに解析を進める必要がある。

3MC による FAT 発現促進作用が AHR を介するの否かを確認するため、AHR に対する siRNA をヒト肝がん由来細胞株である HepG2 細胞に移入して AHR の mRNA の発現を抑制し、その条件下で 3MC (10 μ M) 処理により FAT の発現がどのように変化するのかを検討した。HepG2 細胞を 3MC で処理し、その 4 時間後に RNA を、24 時間後にタンパク質を回収し、それぞれ qPCR 法とウェスタンブロット法により解析した結果、陰性対照 siRNA 処理群においては 3MC 非処理群と比較して 3MC 処理群で FAT の mRNA が有意に増加すること、さらにタンパク質の発現も増加することがわかった。一方、AHR siRNA 処理群では 3MC 非処理群と処理群との間に明らかな差を認めなかった。これらの結果から、3MC は AHR 依存的に FAT の発現を増加させることが明らかとなった。

以上より、AHR の活性化によって誘発される小滴性脂肪肝は、FAT の発現の促進によりパルミチン酸と 6 種類の一価不飽和脂肪酸の肝細胞内への取り込みが亢進して肝内の脂肪酸量が増加、それに伴って中性脂肪が蓄積することが原因と考えられた。非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の患者では、肝臓における FAT の mRNA の発現が増加していること、肝内の脂肪酸はパルミチン酸と一価不飽和脂肪酸が増加していることが報告されており、本研究の結果と一致する。NAFLD の効果的な治療法は未だ存在しないことから、NAFLD の病態解明と治療のための新たなターゲットの発見が急務である。本研究はその一助となるものとする。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|---|-----|-------|
| 受付番号 | 甲 第 2153 号 | 氏 名 | 川野 佑輝 |
| 論文題目 Title of Dissertation | Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces hepatic steatosis via the upregulation of fatty acid transport アリールハイドロカーボン受容体の活性化によって誘発される脂肪肝は脂肪酸の取り込みの亢進が原因である | | |
| 審査委員 Examiner | 主 査 林 祥 剛 Chief Examiner 副 査 平 田 健 一 Vice-examiner 副 査 勾 坂 敏 朗 Vice-examiner | | |
| 審査終了日 | 平成 23 年 2 月 18 日 | | |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

アリールハイドロカーボン受容体 (AHR) は、helix-loop-helix/Per-ARNT-Simドメインをもつ転写因子である。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (TCDD)、ポリ塩化ビフェニル (PCB)、ベンゾ[a]ピレン (BaP)、3-メチルコラントレン (3MC) などの様々な生体外物質がAHRのリガンドとして作用し、細胞質内に存在するAHRを活性化する。活性化したAHRは核内に移行した後にAHR nuclear translocatorと結合し、dioxin responsive elementと呼ばれるDNA領域に結合することで、腫瘍形成促進や奇形、免疫異常を引き起こす。またAHRは肝内に多く発現しており、脂肪肝の発症と関連があることが知られているが、AHRの活性化による脂肪肝発症のメカニズムは未だ明らかにされていない。脂肪肝発症の原因として、(1) 脂肪酸合成の亢進、(2) 脂肪酸の取り込みの亢進、(3) ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の抑制、(4) very low density lipoprotein (VLDL) の合成と排出の抑制が考えられる。そこで脂肪酸の合成に関わるfatty acid synthase (FAS)、脂肪酸のミトコンドリアへの輸送とミトコンドリアへの取り込みに関わる liver fatty acid binding protein (L-FABP) とcarnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)、VLDLの合成と排出に関わるmicrosomal triglyceride transfer protein (MTP)の肝内のメッセンジャーRNA (mRNA) を定量的リアルタイムPCR (qPCR)法により測定した結果、対照群と比較して有意な差は認められなかったものの、3MC投与群ではFASは減少する傾向、L-FABP、CPT1とMTPは増加する傾向にあることが明らかになった。また肝細胞内への脂肪酸の取り込みを促進する因子であるfatty acid translocase (FAT) の肝内におけるmRNAをqPCR法により測定し、対照群と比較して3MC投与群では2.1倍に増加すること、タンパク質の発現も1.9倍に増加することをウェスタンブロット法で明らかにした ($p < 0.05$)。細胞内の脂質代謝を制御する核内受容体としてliver X receptor (LXR) α 、retinoid X receptor (RXR) α 、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α が知られている。これらの肝内のmRNAをqPCR法により測定したところ、PPAR α は対照群と比較して3MC投与群で有意に上昇していたが、LXR α とRXR α に関しては両群間に明らかな差を認めなかった。PPAR α はFATの合成を促進することが知られており、3MCによって活性化されたAHRがPPAR α を活性化し、FATの合成を促進することが示唆された。今後AHRとPPAR α の間の分子メカニズムを解明するには、さらに解析を進める必要がある。3MCによるFAT発現促進作用がAHRを介するの否かを確認するため、AHRに対するsiRNAをヒト肝がん由来細胞株であるHepG2細胞に移入してAHRのmRNAの発現を抑制し、その条件下で3MC ($10 \mu\text{M}$) 処理によりFATの発現がどのように変化するかを検討した。HepG2細胞を3MCで処理し、その4時間後にRNAを、24時間後にタンパク質を回収し、それぞれqPCR法とウェスタンブロット法により解析した結果、陰性対照siRNA処理群においては3MC非処理群と比較して3MC処理群でFATのmRNAが有意に増加すること、さらにタンパク質の発現も増加することがわかった。一方、AHR siRNA処理群では3MC非処理群と処理

群との間に明らかな差を認めなかった。これらの結果から、3MCはAHR依存的にFATの発現を増加させることが明らかとなった。本研究は、AHRと脂肪肝の関係についての解析であり、従来明らかではなかったAHRの活性化によって誘発される小滴性脂肪肝は、FATの発現の促進によりパルミチン酸と6種類の一価不飽和脂肪酸の肝細胞内への取り込みが亢進して肝内の脂肪酸量が増加、それに伴って中性脂肪が蓄積することが原因であることを明らかにした。非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の患者では、肝臓におけるFATのmRNAの発現が増加していること、肝内の脂肪酸はパルミチン酸と一価不飽和脂肪酸が増加していることが報告されており、本研究の結果と一致する。重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。