Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-03-14

β-hydroxybutyrate protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress in a sirtuin 1-independent manner

Tagawa, Ryoma

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2019-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第7479号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007479

※ 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。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

ß-hydroxybutyrate protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress in a sirtuin 1-independent manner

肝細胞における小胞体ストレスはβヒドロキシ酪酸によって
サーチュイン１非依存的に抑制される

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
消化器内科学
（指導教員：児玉　裕三教授）

田川　亮真

【背景】

β-ヒドロキシ酪酸（BHB）は哺乳類の主要なケトン体のひとつであり、肝細胞において脂肪酸の酸化により生合成される。BHB は飢餓時においてグルコースに替わるエネルギー源としてだけでなく、生体内の情報伝達物質としての役割も担っている。これまで、BHB の免疫細胞における抗炎症作用や、心筋細胞や腎細胞における酸化ストレス抑制効果、脂肪組織における脂肪分解抑制効果などが報告されているものの、BHB が肝細胞に与える影響については、十分に解明されていない。肝細胞の機能障害の要因として、炎症、酸化ストレス、小胞体ストレスなどが挙げられ、例えば、これらの因子は、糖脂質代謝機能障害の原因としても有名である。これまでの研究で、BHB による抗炎症作用や抗酸化ストレス作用は報告されているものの、BHB が小胞体ストレスに与える作用に関する知見は少ない。そこで、本研究では、BHB が小胞体ストレスに与える影響を明らかにすることを目的とした。さらに、肝臓における小胞体ストレスは、肝細胞の核内に局在するサーチュイン１（SIRT1）遺伝子の活性化によって抑制されることが知られており、BHB が SIRT1 に及ぼす影響についても検討した。

【方法】

細胞実験

マウス肝がん由来細胞株 Hepalc1c7 細胞とヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞に BHB（0、10 mM）、あるいは、フェノフィブラート（0、50、100 μM）で 16 時間処理した後、ツニカマイシン（5 μg/mL）を加えることで、小胞体ストレスを誘導した。また、細胞内における BHB の産生を阻害するために、3-Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA Lyase（HMGCL）に対する siRNA を、また、その陰性対照として、対照 siRNA をそれぞれ、HepG2 細胞に導入した。導入 24 時間後に、無血清培地、あるいは、フェノフィブラート（0、100 μM）で 16 時間処理した後、ツニカマイシン（5 μg/mL）添加により、小胞体ストレスを誘導した。各種誘導後の細胞において、mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により、タンパク質発現量をウエスタンブロット法により、細胞生存率を Cell Counting Kit-8 により評価した。

動物実験

C57BL/6J マウス（8 週齢・雄）に BHB（3 mmol/kg・体重）を腹腔内投与し、投与 0、1、6、24 時間後に解剖して、血中 BHB 濃度を測定した。また、C57BL/6J マウス（8 週齢・雄）に BHB（3 mmol/kg・体重）あるいは、陰性対照としての PBS を腹腔内投与し、投与 2 時間後にツニカマイシン（0.5 g/kg・体重）を腹腔内投与することで、肝臓における小胞体ストレスを誘導した。投与 16、24 時間後に解剖して、肝臓を回収し、タンパク質発現量を解析した。

in vitro における SIRT1 活性測定

BHB が SIRT1 活性に及ぼす影響を評価するため、in vitro 実験を実施し、BHB（0、10 mM）存在下におけるリコンビナント SIRT1 の活性を SIRT1 活性測定キットにより測定した。

【結果】

BHB は肝細胞の小胞体ストレスを抑制する

BHB が肝細胞の小胞体ストレスに与える影響を明らかにするため、Hepa1c1c7 細胞と HepG2 細胞を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンで処理し、BHB 処理群と非処理群における小胞体ストレス応答遺伝子の発現量を解析した。その結果、Hepa1c1c7 細胞において、BHB 処理群では、ツニカマイシン刺激 3 時間後の C/EBP homologous protein (CHOP) タンパク質発現量が、また、刺激 6 時間後の glucose-regulated protein 78 (GRP78) タンパク質発現量が減少した。HepG2 細胞において、BHB 処理群では、ツニカマイシン刺激 6 時間後の GRP78、spliced X-box binding protein-1 (XBP-1)、および、transcriptional CHOP-inducer activating transcription factor 4 (ATF4) の mRNA 発現量が減少、また、GRP78 と CHOP のタンパク質発現量も減少した。次に、in vivo において、BHB が肝臓の小胞体ストレスに与える影響について解析するため、C57BL/6J マウスに BHB を腹腔内投与し、その 2 時間後にツニカマイシンを腹腔内投与することで肝臓における小胞体ストレスを誘導した。その結果、ツニカマイシン投与 24 時間後の GRP78 タンパク質発現量は BHB 投与群で有意に減少したが、CHOP タンパク質発現量に関しては両群間で有意な差は見られなかった。また、C57BL/6J マウスに BHB を単回腹腔内投与し、血中 BHB 濃度の変化を測定した。その結果、投与後 1 時間で有意に上昇したが、投与後 6、ならびに、24 時間では有意差を認めなかった。

続いて、BHB が小胞体ストレス誘導性細胞障害に与える影響を解析するため、Hepa1c1c7 細胞をツニカマイシンで 24 時間処理し、BHB 処理群と非処理群における細胞生存率を比較した。BHB 非処理群では、ツニカマイシン処理により細胞生存率が 30%低下したが、BHB 処理群では細胞生存率の低下を認めなかった。また、BHB 処理群ではアポトーシスにより誘導される切断型 Poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1) と活性型 Caspase 3 遺伝子のタンパク質発現量が減少した。

BHB は SIRT1 非依存性に小胞体ストレスを抑制する

BHB による小胞体ストレス抑制機構を明らかにするため、小胞体ストレス抑制作用を有する SIRT1/AMP-activated protein kinase (AMPK) 経路に BHB が与える影響について解析した。Hepa1c1c7 細胞をツニカマイシンで処理し、BHB 処理群と非処理群における SIRT1 タンパク質発現量と AMPKα のリン酸化タンパク質発現量を測定したが、両群間で有意差を認めなかった。また、in vitro 実験において、BHB が SIRT1 酵素活性に与える影響を評価したものの、BHB による効果は見られなかった。

BHB 産生は小胞体ストレス応答を制御する

最後に、肝細胞内における BHB 産生をコントロールすることで、小胞体ストレスを制御できるか否かについて解析した。まず、HepG2 細胞において、BHB 産生を阻害するためにケトン体合成に必要な酵素である HMGCL を siRNA によりノックダウンし、続けて、ツニカマイシンを 6 時間処理して、小胞体ストレス応答遺伝子の mRNA とタンパク質発現量を解析した。その結果、対照群と比較すると、siHMGCL 導入群では GRP78 の mRNA とタンパク質発現量が有意に増加した。次に、BHB 産生を促進するために PPARα 作動薬であるフェノフィブラートで HepG2 細胞を処理し、続けて、ツニカマイシンにより小胞体ストレスを誘導した。対照群と比較した結果、フェノフィブラート処理群で GRP78 のタンパク質発現量が有意に減少した。しかし、siHMGCL で BHB 産生を阻害した場合には、フェノフィブラートで処理しても GRP78 のタンパク質発現を抑制できなかった。

【考察】

本研究により、肝細胞において BHB が小胞体ストレスを抑制すること、また、細胞内の BHB 産生をコントロールすることで小胞体ストレス応答を制御できる可能性を明らかにできた。

これまでの研究で、肝細胞において PPARα を欠損させることで、小胞体ストレスが亢進することが報告されている。また、PPARα は脂肪酸酸化関連遺伝子の発現を制御でき、また、BHB は脂肪酸酸化を介して、肝細胞内で産生されることが知られている。本研究において、PPARα 作動薬であるフェノフィブラートが、肝細胞で小胞体ストレスを軽減できることも確認できた。これらの結果から、肝細胞において、PPARα は、脂肪酸酸化を介して BHB 産生を亢進し、その結果として小胞体ストレスが抑制される可能性が示され、肝細胞への BHB 処理は、この PPARα 経路を亢進した環境に類似し、この結果として、BHB による小胞体ストレスの抑制が確認できたのかもしれない。

さらに、本研究により、BHB は SIRT1 非依存的に小胞体ストレスを制御できることを明らかにできた。SIRT1 には、AMPK の活性化を介した小胞体ストレス抑制作用が存在することが知られていることから、BHB が SIRT1 活性に与える影響を検討したものの、有意な効果は確認できなかった。また、HepG2 細胞を用いたこれまでの研究で、BHB が AMPK の活性化を誘導できるという報告が存在するものの、本研究での Hepa1c1c7 細胞を用いた実験では、BHB 処理によるリン酸化 AMPKα レベルの有意な変動は認められなかった。これらの結果から、まだ、詳細な検証まではできていないものの、BHB は AMPKα 非依存的でも小胞体ストレスを抑制できるかもしれないということが示唆された。

本研究では、マウス実験においても、BHB が肝臓の GRP78 タンパク質の発現量を低下させ、小胞体ストレスを制御できる可能性を明らかにできた。その一方で、CHOP タンパク質の発現量は有意な変動は認められなかったことから、今後、体内 BHB レベルを如何にして高い状態に保つのかという検証が必要であるものの、本研究の成果は、BHB、あるいは、BHB 産生にかかわる因子を標的とした小胞体ストレス関連肝疾患に対する治療法開発の一助につながると考えられる。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第 2878 号	氏 名	田川 亮真
論文題目 Title of Dissertation	肝細胞における小胞体ストレスはβヒドロキシ酪酸によってサーチュイン1非依存的に抑制される β-hydroxybutyrate protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress in a sirtuin 1-independent manner		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 勝二郁夫 副 査 Vice-examiner 鈴木聡 副 査 Vice-examiner 西慎一		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【背景】

β-ヒドロキシ酪酸（BHB）は哺乳類の主要なケトン体のひとつであり、肝細胞において脂肪酸の酸化により生合成される。BHB は飢餓時においてグルコースに替わるエネルギー源や生体内の情報伝達物質としての役割を担う。肝細胞機能障害の要因として、炎症、酸化ストレス、小胞体ストレスが挙げられ、これらの因子は、糖脂質代謝機能障害の原因として有名である。本研究では、BHB が小胞体ストレスに与える影響の解明を目的とした。さらに、肝臓における小胞体ストレスは、肝細胞の核内に局在するサーチュイン 1（SIRT1）遺伝子の活性化により抑制されることが知られており、BHB が SIRT1 に及ぼす影響についても検討した。

【方法】

細胞実験

マウス肝がん由来細胞株 Hepa1c1c7 細胞とヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞に BHB (0、10 mM)、あるいは、フェノフィブラート（0、50、100 μM）で 16 時間処理し、ツニカマイシン（5 μg/mL）を加え、小胞体ストレスを誘導した。細胞内における BHB の産生を阻害するために、3-Hydroxymethyl-3-methylglutaryl-CoA Lyase（HMGCL）に対する siRNA、または、対照 siRNA をそれぞれ、HepG2 細胞に導入した。導入 24 時間後、無血清培地、あるいは、フェノフィブラート（0、100 μM）で 16 時間処理し、ツニカマイシン（5 μg/mL）添加により、小胞体ストレスを誘導した。各細胞において、mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により、タンパク質発現量をウエスタンブロット法により、細胞生存率を Cell Counting Kit-8 により評価した。

動物実験

C57BL/6J マウス（8 週齢・雄）に BHB（3 mmol/kg・体重）を腹腔内投与し、投与 0、1、6、24 時間後に解剖し、血中 BHB 濃度を測定した。また、C57BL/6J マウス（8 週齢・雄）に BHB（3 mmol/kg・体重）あるいは、PBS を腹腔内投与、投与 2 時間後にツニカマイシン（0.5 g/kg・体重)を腹腔内投与し、肝臓における小胞体ストレスを誘導した。投与 16、24 時間後に解剖して、肝臓を回収、タンパク質発現量を解析した。

in vitro における SIRT1 活性測定

BHB が SIRT1 活性に及ぼす影響を評価するため、in vitro 実験を実施し、BHB（0、10 mM）存在下におけるリコンビナント SIRT1 の活性を SIRT1 活性測定キットにより測定した。

【結果】

BHB は肝細胞の小胞体ストレスを抑制する

Hepa1c1c7 細胞において、BHB 処理群では、ツニカマイシン刺激 3 時間後の C/EBP homologous protein（CHOP）タンパク質量、また、刺激 6 時間後の glucose-regulated protein 78 (GRP78)タンパク質量が減少した。HepG2 細胞において、BHB 処理群で、ツニカマイシン刺激 6 時間後の GRP78、spliced X-box binding protein-1（XBP-1）、および、transcriptional CHOP-inducer activating transcription factor 4（ATF4）の mRNA 発現量が減少、GRP78 と CHOP のタンパク質量も減少した。次に、in vivo で BHB が肝臓の小胞体ストレスに与える影響を解析するため、

C57BL/6J マウスに BHB を腹腔内投与し、その 2 時間後にツニカマイシンを腹腔内投与し、肝臓における小胞体ストレスを誘導した。その結果、ツニカマイシン投与 24 時間後の GRP78 タンパク質量は BHB 投与群で有意に減少したが、CHOP タンパク質量は両群間で有意な差は認めなかった。また、C57BL/6J マウスに BHB を単回腹腔内投与し、血中 BHB 濃度の変化を測定した。投与後 1 時間で有意に上昇したが、投与後 6、ならびに、24 時間では有意差を認めなかった。

BHB 非処理群では、ツニカマイシン処理により細胞生存率が 30%低下したが、BHB 処理群では細胞生存率の低下を認めなかった。また、BHB 処理群ではアポトーシスにより誘導される切断型 Poly ADP-ribose polymerase 1（PARP1）と活性型 Caspase 3 遺伝子のタンパク質発現量が減少した。

BHB は SIRT1 非依存性に小胞体ストレスを抑制する

Hepa1c1c7 細胞をツニカマイシンで処理し、BHB 処理群と非処理群における SIRT1 タンパク質発現量と AMPKα のリン酸化タンパク質発現量を測定したが、両群間で有意差を認めなかった。また、in vitro 実験において、BHB が SIRT1 酵素活性に与える影響を評価したものの、BHB による効果は見られなかった。

BHB 産生は小胞体ストレス応答を制御する

HepG2 細胞で BHB 産生を阻害するためケトン体合成に必要な酵素 HMGCL を siRNA によりノックダウンし、ツニカマイシンを 6 時間処理し、小胞体ストレス応答遺伝子の mRNA とタンパク質量を解析した。その結果、対照群と比較すると、siHMGCL 導入群では GRP78 の mRNA とタンパク質発現量が有意に増加した。次に、BHB 産生を促進するために PPARα 作動薬フェノフィブラートで HepG2 細胞を処理し、ツニカマイシンで小胞体ストレスを誘導した。フェノフィブラート処理群で GRP78 のタンパク質発現量が有意に減少した。しかし、siHMGCL で BHB 産生を阻害した場合、フェノフィブラートで処理しても GRP78 のタンパク質発現を抑制できなかった。

【結論】

本研究により、BHB が肝細胞において小胞体ストレスを抑制すること、また、細胞内の BHB 産生をコントロールすることで小胞体ストレス応答を制御できる可能性を示した。

従来明らかでなかった BHB の新たな機能について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。