

主論文の要旨

Hepatocyte-Specific Depletion of UBXD8 Induces Periportal Steatosis in Mice Fed a High-Fat Diet

〔 肝臓特異的 UBXD8 ノックアウトは VLDL 分泌を抑制し、
門脈域周囲に脂肪蓄積をもたらす 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：後藤 秀実 教授)

今井 則博

【背景】

肝細胞は very low density lipoprotein(以下 VLDL)の産生細胞であり、VLDL の形成に重要な因子が Apolipoprotein B-100(以下 ApoB)である。VLDL は合成された ApoB が Sec61 トランスロコンを通じて小胞体(以下 ER)内腔に入り、脂質付加を受けることで形成され、細胞外に分泌される。肝細胞を用いた研究から、1)細胞内蛋白質分解系(プロテアソーム系、オートファジー系)を阻害すると脂肪滴周囲にユビキチン化した ApoB が集積する構造 (ApoB-crescent)が出現すること(Ohsaki et al. Mol Biol Cell. 2006)、2)ApoB-crescent は脂肪滴と ER の接合構造であり、小胞体内腔に脂質付加を受けた ApoB が蓄積していること(Ohsaki et al. J Cell Sci. 2008)、3)脂肪滴上に存在する UBXD8 が、ApoB-crescent の脂肪滴/ER 接合部でレトロトランスロコンである Derlin-1 と複合体を形成し、ユビキチン化 ApoB のプロテアソーム分解に関与すること(Suzuki et al. Mol Biol Cell. 2012)が明らかになっている。

【目的】

これまでの研究結果は、UBXD8 が ApoB 分泌制御に関与することを示唆しているが、実験材料は肝癌由来の細胞株である Huh7 細胞であった。UBXD8 の生理的な機能を明らかにするためには動物個体を用いた検討が必要と考え、肝臓特異的 UBXD8 ノックアウトマウスを作出し、その表現型を解析した。

【方法】

loxP 配列で exon1 を挟んだ UBXD8 flox/flox マウスを作出し、アルブミンプロモーターで Cre を誘導するマウスと交配することで肝臓特異的 UBXD8 ノックアウトマウス(以下 UBXD8-LKO)を得た(Fig. 1)。また Cre を発現しない littermate をコントロール(以下 Control)マウスとして用いた。脂質代謝における UBXD8 の役割を明らかにするため、通常食飼育(4.6%fat)、高脂肪食飼育(14.4%fat)にて表現型の解析を行った。

【結果】

(1)UBXD8-LKO マウスはメンデルの法則に従い産出され、Control マウスと比較し生育上明らかな差を認めなかった。

(2)通常飼育の 30 週齢において UBXD8-LKO マウス肝組織像は Control マウスと比較し有意な差を認めず、明らかな脂肪肝や肝障害の像を認めなかった(Fig. 2-A)。

(3)高脂肪食飼育の 30 週齢において Control マウス、UBXD8-LKO マウスともに肝中心静脈周囲(zone3)に小滴性の脂肪沈着が生じたが、UBXD8-LKO マウスではそれに加えて雌 60%、雄 27%の個体に門脈周囲(zone1)に大滴性の脂肪沈着が認められた(Fig. 2-B)。

(4)通常食飼育において血中の中性脂肪値は両群に有意差を認めなかったが、高脂肪食

飼育において UBXD8-LKO マウス血中の中性脂肪値は Control マウスと比較し有意に低値であった(雌: 39 vs. 59 mg/dl, P=0.009, 雄: 44 vs. 65 mg/dl, P=0.005)。また高脂肪食飼育の UBXD8-LKO 雌マウス血中の AST 値, ALT 値, ALP 値は Control 雌マウスと比較し有意に高値であった。

(5)高脂肪食飼育における UBXD8-LKO マウス血中中性脂肪値の低下について、更に高速液体クロマトグラフィーを用いて血中リポプロテイン分画を検討した。高脂肪食飼育の UBXD8-LKO マウスにおいて Control マウスと比較し血中 VLDL 内の中性脂肪の顕著な減少を認めた(Fig. 3)。以上の結果より、UBXD8-LKO マウス肝細胞での ApoB への脂質付加の減少が示唆された。

(6)UBXD8-LKO マウス血中中性脂肪値の低下は肝臓よりの VLDL 分泌の低下を示唆していると考え、リポプロテインリパーゼ阻害薬である TRITON-WR1339 を投与した条件で血中中性脂肪値を経時的に測定し、肝臓よりの VLDL 分泌を比較検討した。雌雄共に UBXD8-LKO マウスにおいて Control マウスと比較し、TRITON-WR1339 投与後の血中中性脂肪値の低下を認め、UBXD8-LKO マウスでは肝臓よりの血中 VLDL 分泌が低下していると考えられた(Fig. 4)。

(7)肝細胞よりの ApoB 分泌について Control 及び UBXD8-LKO マウスより単離した初代肝細胞を用いて検討を行った。UBXD8-LKO マウスから得た肝細胞では Control マウスの肝細胞と比較し ApoB 分泌量が減少していることが確かめられた。また培地への 0.4 mM オレイン酸付加で VLDL 分泌を増加させた条件では、UBXD8-LKO マウス初代肝細胞の ApoB 分泌低下はさらに顕著であった(Fig. 5-A)。

(8) Control 及び UBXD8-LKO マウスより単離した初代肝細胞を用いて 1.2 mM オレイン酸を付加した条件で培養すると、UBXD8-LKO マウス初代肝細胞でのみ脂肪滴周囲の脂肪滴・ER 接合部に脂質付加後の ApoB が集積した構造(ApoB-crescent)の出現を認めた (Fig. 5-B)。

【考察】

VLDL 分泌の低下と脂肪肝を呈するマウスモデルは少なく、いずれもリポプロテイン合成の初期段階を障害するモデルである。UBXD8-LKO マウスは ApoB 翻訳後の細胞内分解の障害にて脂肪肝を呈する事を示した初めてのモデルである(Fig. 5-C)。

VLDL 分泌異常は高脂血症や動脈硬化などの病態につながる。VLDL の分泌量はおもに翻訳後の ApoB の細胞内分解によって調節されることが知られており、UBXD8 の主要な機能は ApoB 分解過程を制御することであると考えられる。今回の結果は UBXD8 が個体レベルでも VLDL 調節に関わることを示しており、UBXD8 は脂質代謝

異常の新たな治療ターゲットとなり得ると考えられる。

非アルコール性脂肪性肝疾患(以下 NAFLD)は肥満を背景として発症し、大滴性の脂肪沈着を zone 3 より呈する。その一部において進行性の非アルコール性脂肪性肝炎(以下 NASH)に発展し、肝硬変、肝癌を発症する。NAFLD/NASH が zone3 優位に病態の進展をするメカニズムはいまだに明らかではない。我々が見いだした UBXD8-LKO マウスの特異な病理像を解析し、その分子機構を解明することにより、NAFLD および NASH の発症原因についても新たな知見が得られる可能性が高い。

【結語】

従来の脂肪肝モデルは過食や ApoB 脂質付加障害によるものが多く中心静脈周囲に脂肪沈着を呈するが、UBXD8-LKO マウスは ApoB の細胞内分解過程の障害により脂肪肝を呈する事を初めて示したモデルであり、さらに従来と異なり門脈周囲の脂肪沈着を示した。今回の結果は、マウス個体内の正常肝細胞において UBXD8 が細胞内の ApoB 分解過程に関与し、VLDL 分泌制御に重要な役割を果たすことを示唆している。