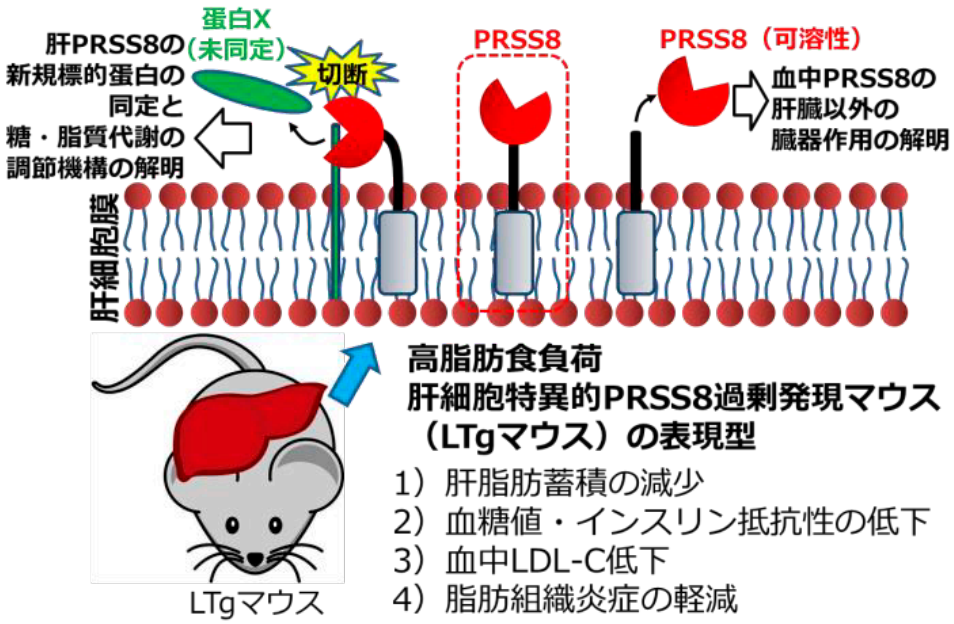
63　肝プロスタシンによる糖脂質代謝機構の解明と医学応用	土屋　恭一郎

【目的】プロスタシン（prostasin：PRSS8）は分子量 40 kDa の細胞膜に局在するセリンプロテアーゼであり、膜蛋白の切断を介した機能調節を担う。本研究では、肝細胞特異的 PRSS8 過剰発現マウス（LTg マウス）およびテトラサイクリン発現誘導性 PRSS8 過剰発現 HepG2 細胞株（ヒト肝癌由来細胞株）を用いて肝 PRSS8 の基質の網羅的解析を行い、新規基質蛋白を同定する。加えて、新規に同定した基質蛋白やその下流分子・メカニズムについて *in vitro*、*in vivo* における検討で明らかにし、肝臓における新たな糖・脂質代謝調節機構の解明を目指す。

【方法】高脂肪食給餌野生型及び LTg マウスの体重、摂餌量、随時血糖値を経時的に測定し、糖、インスリンおよびピルビン酸負荷試験を施行した。高脂肪食給餌 8 週目の絶食後に血液、肝臓、白色・褐色脂肪組織、骨格筋を採取した。また、テトラサイクリン発現誘導性 PRSS8 過剰発現 HepG2 細胞株を樹立した。

【結果】LTg マウスにおいて高脂肪食負荷にて体重非依存的にインスリン抵抗性が軽減し、血清 LDL-コレステロール値及び肝中性脂肪蓄積が減少していた。また、LTg マウスの肝臓では脂肪酸トランスポーターCD36 の蛋白発現が減少しており、HepG2 細胞株に PRSS8 を過剰発現させることにより CD36 の蛋白発現が同様に減少した。加えて、LTg マウスの血清において可溶性 PRSS8 濃度が増加していた。今後、LTg マウス由来初代培養肝細胞の培養上清と細胞をショットガン解析に供するとともに、テトラサイクリン発現誘導性 PRSS8 過剰発現 HepG2 細胞株を用いた SILAC（Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture）法による定量比較により蛋白レベルでの網羅的解析を推進する。また、可溶性 PRSS8 を大量精製し、外因的投与による糖・脂質代謝への影響を検討する。

肝細胞特異的プロスタシン（PRSS8）新過剰発現マウス（LTg マウス）をモデルとした
肝 PRSS8 を起点とした新たな糖・脂質代謝の調節機構の解明



63. 肝プロスタシンによる糖脂質代謝機構の解明と医学応用

土屋　恭一郎

山梨大学 大学院総合研究部 医学域 内科学講座第 3 教室

Key words：セリンプロテアーゼ，肥満，糖尿病，脂肪肝

緒　言

肥満人口の増加と、それに伴う糖・脂質代謝異常は世界的な健康課題である。肝臓は糖・脂質代謝の中心的役割を担っているが、肥満に伴う肝臓への脂肪蓄積とインスリン抵抗性は糖・脂質代謝異常における重要な病態基盤である。これまでに、肝臓と糖・脂質代謝及び肥満が及ぼす影響について多くの研究がなされ、数多くの分子や調節機構に関する知見が得られている。プロスタシン（prostasin：PRSS8）は 1994 年に Chao らがヒト精液より精製した分子量 40 kDa の細胞膜に局在するセリンプロテアーゼであり［1，2］の切断を介し機能調節を担う［3］。PRSS8 の生理機能として、腎尿細管細胞における ENaC の活性化を介した Na 調節機構が知られ、PRSS8 は DNA メチル化制御を介して乳癌の進展・転移を抑制したり［4］、前立腺癌の進展に抑制的に作用するという報告が認められる［5］。

我々の研究室では、肝細胞特異的 PRSS8 欠損（liver-specific PRSS8 knock-out：LKO）マウスの解析から、肝 PRSS8 は Toll 様受容体（Toll-like receptor：TLR）4 を切断し、リポ多糖や飽和脂肪酸などにより惹起される肝臓の炎症を抑制していることを示した［6］。また、高脂肪食や肥満では小胞体ストレスを介して肝 PRSS8 の発現が低下し、PRSS8 による炎症防御機構の破綻をきたしてインスリン抵抗性へ進展することを明らかにした。このことは、肝 PRSS8 を起点とした新たな糖・脂質代謝調節機構が存在することを示唆する。本研究では、肝細胞における肝 PRSS8 の基質の網羅的解析を行い、新規基質蛋白を同定する。加えて、新規に同定した基質蛋白やその下流分子・メカニズムについて *in vitro*、*in vivo* における検討で明らかにし、肝臓における新たな糖・脂質代謝調節機構の解明を目指す。

方法および結果

1. LTg マウスにおける糖・脂質代謝の表現型解析

高脂肪食給餌野生型及び LTg マウスの体重、摂餌量、随時血糖値を経時的に測定し、糖、インスリンおよびピルビン酸負荷試験を施行した。高脂肪食給餌 8 週目の絶食後に血液、肝臓、白色・褐色脂肪組織、骨格筋を採取した。これまで、LTg マウスが高脂肪食負荷にて体重非依存的にインスリン抵抗性が軽減し、血清 LDL-コレステロール値及び肝中性脂肪蓄積が減少することを見出した（図 1）。今後は耐糖能改善の機序の検討としてグルコースクランプ法、脂肪肝改善の機序の検討として *in vivo* lipogenesis assay を追加する。

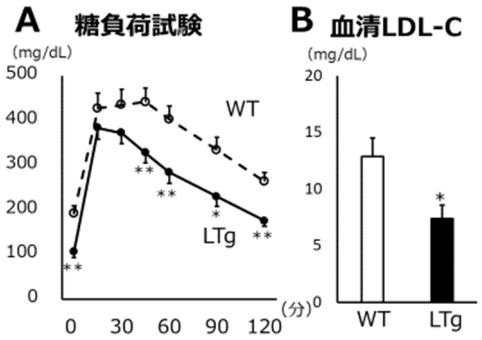


図 1. LTg マウスの耐糖能および血清 LDL-C 値

高脂肪食給餌下 LTg マウスは WT マウスと比較して、A：耐糖能の改善、
および B：血清 LDL コレステロール値の低下が認められる。
n = 6～10, * p < 0.05, ** p < 0.01 by non-paired t-test

2. 肝細胞における PRSS8 の新規標的蛋白の同定

これまでの予備データと PRSS8 の分子特性より、肝臓において脂質の取り込み及び代謝に関連する膜蛋白に PRSS8 が作用し、脂肪肝と糖・脂質代謝が改善している可能性を考えている。候補的に LTg マウス由来初代培養肝細胞における種々の脂質トランスポーターと脂質代謝関連分子（CD36、LDL 受容体、PCSK9）の蛋白発現を検討しており、肝細胞における PRSS8 の新規標的蛋白を絞り込む。これまで、LTg マウスの肝臓では脂肪酸トランスポーターCD36 の蛋白発現が減少しており（図 2）、ヒト肝癌由来細胞株（HepG2 細胞）に PRSS8 を過剰発現させることにより CD36 の蛋白発現が同様に減少することを確認している。

並行して、LTg マウス由来初代培養肝細胞の培養上清と細胞をショットガン解析（大阪大学大学院共通基盤部門へ依託予定）に供する。加えて、HepG2 細胞（ヒト肝癌細胞株）を用いてテトラサイクリン発現誘導システムによる PRSS8 過剰発現安定細胞株を既に作製済みであり、SILAC（Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture）法による定量比較により蛋白レベルでの網羅的解析を推進する。データベースを用いて PRSS8 による切断予測部位を抽出し変異体を作製、組換え PRSS8 との *in vitro* の反応系により作用部位の同定を試みる。更には個体レベルでの確認のため、PRSS8 新規標的蛋白の PRSS8 作用部位に変異を導入したノックインマウスの作製も検討する。

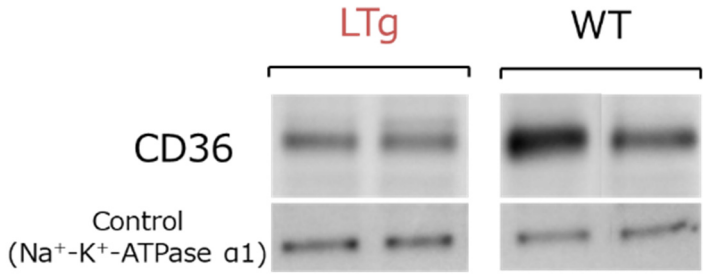


図 2. LTg マウス肝の CD36 発現

LTg マウス肝では野生型マウスと比較して CD36 発現が低下している。

3. 可溶性 PRSS8 投与による糖・脂質代謝異常の治療効果の検討

LTg マウスの血中において可溶性 PRSS8 濃度が貯蔵していることを確認した。既にバキュロウィルスを用いて可溶性 PRSS8 を大量に精製しており、肥満、糖尿病並びに脂質異常症モデルマウスに浸透圧ポンプを用いて 4～8 週間投与し、表現系を解析する。

4. 培養細胞を用いた可溶性 PRSS8 の肝外臓器への作用機構の解明

3. の結果により、肝外の代謝関連臓器への可溶性 PRSS8 の作用機序を解析する。脂肪細胞株、骨格筋細胞株に LTg マウス由来初代培養肝細胞の培養上清、並びに可溶性 PRSS8 を添加し、*in vivo* の表現型に即した細胞機能への影響（糖新生、糖取込、インスリンシグナルへの影響等）を確認すると共に、候補的並びに網羅的（マイクロアレイ解析）手法により可溶性 PRSS8 の肝外臓器への新たな作用を検討する。

考　察

これまでの結果より、肝細胞に発現する PRSS8 が高脂肪食に伴う糖・脂質代謝異常と脂肪肝に保護的に作用することが想定され、本研究においては主に臨床医学的効果が期待される。肝細胞に発現する PRSS8 が肝臓における脂質取り込み関連分子の活性を制御するだけでなく、肝 PRSS8 由来の血中可溶性 PRSS8 が肝外の代謝関連臓器においても糖・脂質代謝の調節を担っていることが想定される（図 3）。したがって、肝 PRSS8 の発現または活性の薬理学的制御も同様の治療的可能性を有することとなり、新たな薬剤の創出につながる可能性がある。加えて、外因性 PRSS8 の肝外臓器への作用を伴う糖・脂質代謝異常の治療効果が明らかになれば、可溶性 PRSS8 自体の治療薬としての臨床応用を見据えることが可能である。さらに、病態および治療対象の臓器（組織）に応じてより症例の病態に即した治療応用が可能となることが考えられる。近年、LDL コレステロール値が低下するほど心血管イベントのリスクを減少させることが明らかとなっており、より厳格な LDL コレステロール管理が求められつつある。肝 PRSS8 を標的とした治療法が臨床応用されることにより、今後脂質管理法の選択肢が増す可能性があることは有意義であることに加え、単剤により脂質のみならず糖代謝の改善と脂肪肝の抑制がもたらされれば、ハイリスクな症例に対するより効果的かつシンプルな治療オプションとなる可能性がある。

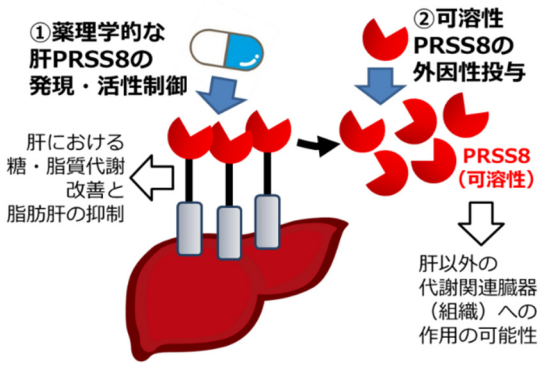


図 3.　本研究の展望

文　献

1) Yu JX, Chao L, Chao J: Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostasin mRNA. J Biol Chem 1995, 270(22):13483-13489. PMID: 7768952, DOI: 10.1074/jbc.270.22.13483

2) Yu JX, Chao L, Chao J: Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. J Biol Chem 1994, 269(29):18843-18848. PMID: 8034638

3) Kitamura K, Tomita K: Proteolytic activation of the epithelial sodium channel and therapeutic application of a serine protease inhibitor for the treatment of salt-sensitive hypertension. Clin Exp Nephrol 2012, 16(1):44-48. PMID: 22038264, DOI: 10.1007/s10157-011-0506-1

4) Chen LM, Chai KX: Prostasin serine protease inhibits breast cancer invasiveness and is transcriptionally regulated by promoter DNA methylation. Int J Cancer 2002, 97(3):323-329. PMID: 11774283, DOI: 10.1002/ijc.1601
5) Chen LM, Hodge GB, Guarda LA, Welch JL, Greenberg NM, Chai KX: Down-regulation of prostasin serine protease: a potential invasion suppressor in prostate cancer. Prostate 2001, 48(2):93-103. PMID: 11433419, DOI: 10.1002/pros.1085
6) Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Morinaga J, Onoue T, Yamazoe R, Ueda M, Adachi M et al: The serine protease prostasin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. Nature communications 2014, 5:3428. PMID: 24614850, DOI: 10.1038/ncomms4428