

岐阜薬科大学博士（薬科学）学位論文

脂質代謝調節因子の発現制御機構と
脂質異常症を是正する機能性成分に関する研究

井上 雄貴

2022年

目 次

序論	1
第1章 マクロファージにおける極長鎖脂肪酸合成酵素 ELOVL7 の発現制御機構とその役割の解明	
第1節 緒言	4
第2節 方法	6
第3節 結果	12
第4節 考察	26
第2章 ローヤルゼリー含有脂肪酸による脂肪代謝制御因子 ANGPTL8 の発現制御機構の解明	
第1節 緒言	29
第2節 方法	31
第3節 結果	38
第4節 考察	46
総括	49
謝辞	52
引用文献	53
略語	62

序 論

脂肪酸は、炭素鎖長、不飽和の有無などの違いによる構造的多様性に富む分子であり、炭素鎖長により短鎖脂肪酸（炭素鎖長が2~4程度（C2-C4））、中鎖脂肪酸（C6-C10程度）、長鎖脂肪酸（C12-C18程度）、極長鎖脂肪酸（C20以上）の4つに分類される。脂肪酸の機能は多岐にわたり、特に、細胞膜の主成分として細胞膜の形成や細胞のエネルギー源として生命の維持に不可欠である。また、脂肪酸は様々な脂質メディエーターの前駆体としても重要であるが、近年、脂肪酸自身がシグナル伝達物質として細胞機能を制御していることが明らかとなっている。このように、脂肪酸は生体機能の恒常性維持に重要な役割を担うため、脂肪酸代謝は様々な酵素や因子により調節されているが、その調節機構の破綻により様々な疾患の発症リスクが増加する。

極長鎖脂肪酸（very long-chain fatty acid : VLCFA）はC20以上の脂肪酸であり、主にC16以上の脂肪酸から炭素鎖を伸長することで合成される²⁾。VLCFAの伸長反応は縮合、還元、脱水、還元の4ステップで進行し、律速段階である縮合を触媒する酵素としてelongation of very long chain fatty acids（ELOVL）ファミリーが機能している。VLCFAは皮膚バリアの形成や網膜機能、ミエリン維持などに重要な機能を有する³⁾。それゆえ、生体内でVLCFAの代謝に異常が起こると疾患の発症につながる。スターガルト様黄斑ジストロフィーの原因遺伝子の一つとして同定された*ELOVL4*遺伝子は、網膜で多く発現しており、C26以上の脂肪酸の伸長反応を担う。本疾患では、*ELOVL4*の機能不全により網膜のVLCFA（C26-C36）の欠乏が網膜光受容体の機能異常を引き起こすと考えられている⁴⁾。また、ペルオキシソーム膜に局在してVLCFAの膜輸送を担うATP Binding Cassette Subfamily D Member 1（*ABCD1*）遺伝子の変異が原因で発症するX連鎖性副腎白質ジストロ

フィー（x-linked adrenoleukodystrophy : X-ALD）では、ABCD1 の機能不全により VLCFA が全身性に蓄積する⁵⁾。VLCFA の蓄積により副腎不全や中枢神経性の脱髄が生じる機序は不明であるが、X-ALD の脳剖検所見として脱髄を伴う白質変性とマクロファージやグリア細胞の浸潤がみられることから、VLCFA の蓄積とマクロファージやグリア細胞活性化との関係性が指摘されている⁶⁾。このように、VLCFA 量の変動は種々の疾患の発症と密接に関連している。現在、X-ALD の治療法は存在していないことから、X-ALD の治療法の開発に向けて、マクロファージやグリア細胞における VLCFA の機能や産生機構の解明は重要な課題である。

飽食の時代である現代では、脂質異常症は増加の一途をたどっている。厚生労働省の実施した患者調査によれば、脂質異常症患者の数は平成 8 年には 96.4 万人、平成 17 年には 153 万人、平成 26 年には 206 万人と年々増加している⁷⁾。脂質異常症は、脂質の過剰摂取、運動不足などが発症に関係しており、血液中の中性脂肪（triglyceride : TG）が増加した状態である。血液中の TG の増加は、肝細胞での脂肪蓄積を引き起こし、非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD）の発症にもつながる⁸⁾。NAFLD は、糖尿病、脂質異常症などの生活習慣病のリスク因子となることから⁹⁾、NAFLD 患者数の増加は社会問題となっており、その予防法や治療法の開発が望まれている。著者は、肝細胞における脂肪の蓄積を抑制することができれば NAFLD の予防につながると考え、NAFLD の発症とも密接に関連している脂質代謝制御因子アンジオポエチン様タンパク質 8（angiopoietin-like protein 8 : ANGPTL8）に注目した。ANGPTL8 は主に肝臓と脂肪組織で産生される分泌タンパク質である。ANGPTL8 はリポタンパク質リパーゼ（lipoprotein lipase : LPL）阻害活性を有し、TG の分解を抑制する¹⁰⁾。近年、肥満や糖尿病、NAFLD などの患者で ANGPTL8 の血中濃度が高いこと¹¹⁾、血中の TG や遊離脂肪酸が抗 ANGPTL8 抗体の投与により減少することが報告さ

れている¹²⁾。それゆえ、ANGPTL8は脂質異常症の治療ターゲットとして期待されている生体分子である。

第1章では、VLCFAとマクロファージの活性化との関連性を明らかにすることを目的に、マクロファージにおけるVLCFA合成酵素ELOVLファミリーの機能と発現制御機構について、公共RNA-seqを利用したバイオインフォマティクスと生化学・分子生物学実験の手技の両方を活用し解析を行った。第2章では、ANGPTL8に着目し、脂質代謝改善作用を有することが報告されているローヤルゼリー(royal jelly: RJ)含有脂肪酸の作用機序の解明に取り組んだ。本論文では、これらの研究から得られた成果について2章にわたり詳述する。

第1章 マクロファージにおける極長鎖脂肪酸合成酵素 ELOVL7 の 発現制御機構とその役割の解明

第1節 緒言

マクロファージは白血球に分類される単球由来の免疫細胞である。マクロファージは自然免疫応答の中心的な役割を担うだけでなく、炎症により傷害された組織の修復や組織恒常性の維持などにも寄与する。マクロファージは分化能を有しているが、不可逆的な細胞分化とは異なり、周囲の環境に応じて自身の表現型を可逆的に変化させることができる。本現象はマクロファージの極性化とよばれており、マクロファージが広範な機能を果たすうえで必須の仕組みである。マクロファージの表現型は、主に自然免疫や抗腫瘍免疫を担う炎症性の M1 マクロファージと、抗炎症反応や血管新生、組織のリモデリングを担う抗炎症性の M2 マクロファージの2つに分類される^{13,14)}。

マクロファージは生体の恒常性維持に不可欠な細胞であるが、マクロファージの過剰な活性化は様々な疾患の病因にもなりうる。例えば、過剰に活性化した M1 マクロファージは多量の炎症性サイトカイン(インターロイキン-6 (IL-6)、IL-1 β 、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) など)を産生し^{15,16)}、アテローム性動脈硬化症^{17,18)}、肥満^{17,19)}、がん^{17,20)}、などの発症や病態の悪化につながる。それゆえ、マクロファージの活性化を適切に制御することは、これら疾患の発症や悪化を抑制するために重要である。

VLCFA は C20 以上の脂肪酸である。VLCFA は、小胞体膜に存在する脂肪酸伸長酵素が C16 以上の脂肪酸の炭素鎖を伸長することで合成される²⁾。VLCFA は ganglioside GM3 と結合してリポ多糖を形成し、toll-like receptor (TLR) 4 を

活性化するなど、免疫賦活化作用を有している²¹⁾。また、ペルオキシソームへの VLCFA 輸送を担う *ABCD1* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、マクロファージの細胞内に VLCFA が蓄積し、炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6、IL-12 p70 の産生が増大する²²⁾。*ABCD1* 遺伝子変異により発症する X-ALD では、全身の組織に VLCFA が蓄積する。X-ALD の神経組織で認められる脱髄病巣には多数の M1 マクロファージが存在していることから⁶⁾、VLCFA は M1 マクロファージの制御に重要な役割を果たすと考えられている。

ELOVL ファミリーは VLCFA の伸長反応の律速酵素であり、ELOVL1-7 の 7 つのアイソザイムが存在する。ELOVL1、ELOVL3、ELOVL6 および ELOVL7 は、飽和脂肪酸と 1 価不飽和脂肪酸の伸長反応に特異的な酵素であり、ELOVL2、ELOVL4 および ELOVL5 は多価不飽和脂肪酸の伸長反応に特異的な酵素である^{2, 23-25)}。Emanuela らは、ELOVL2 ノックアウトマウスから分離したマクロファージでは IL-6、IL-12 p70、IL-23 の産生が亢進することを報告している²⁶⁾。Lu らは、マイコバクテリアに感染したマクロファージにおける *IL-1 β* 遺伝子の発現と *ELOVL7* 遺伝子の発現が高い正の相関を示すことを報告している²⁷⁾。これらの知見は、ELOVL ファミリーが自然免疫応答におけるマクロファージの機能を制御している可能性を示している。しかし、マクロファージへの分化過程における ELOVL ファミリーの発現制御機構、活性化マクロファージにおける ELOVL ファミリーの機能は不明である。そこで本章では、マクロファージのモデル細胞としてヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を使用し、ELOVL ファミリーとマクロファージの関係性について解析を行った。

第2節 実験方法

2-1 試薬

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、lipopolysaccharide (LPS) および fludarabine phosphate (Flu) は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。IL-4、IL-13、interferon- γ (IFN- γ) は PeproTech 社より購入した。抗ウサギ horseradish peroxidase (HRP) 標識 immunoglobulin G (IgG; A6154) 抗体、抗マウス HRP 標識 IgG (A4416) 抗体は Sigma Aldrich 社より購入した。抗リン酸化 STAT1 抗体 (#7649)、抗 STAT1 抗体 (#14994)、抗 NF- κ B (#8242) 抗体は Cell Signaling Technology 社より購入した。抗 YY1 抗体 (sc-1703) は Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。BAY11-7082 (BAY) は Calbiochem 社より購入した。

2-2 細胞培養

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を使用した。10% 非動化 fetal calf serum (FCS)、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン G を含む RPMI1640 を使用し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。THP-1 細胞のマクロファージへの分化は、以前当研究室で確立した方法により行った。THP-1 細胞を PMA (30 ng/mL) 存在下で 24 時間培養し、M0 マクロファージに分化させた。その後、この細胞を LPS と IFN- γ (各 100 ng/mL) で刺激し M1 様マクロファージに、IL-4 と IL-13 (各 20 ng/mL) で刺激し M2 様マクロファージに分化させた。

2-3 siRNA トランスフェクション

THP-1 細胞を PMA (30 ng/mL) 存在下で播種し、Lipofectamine^R RNAiMAX (Invitrogen 社) を用いて 20 nM ELOVL7 siRNA (Silencer ID 261256、Thermo Fisher

Scientific 社)、または Negative control siRNA (Silencer Negative Control AM4611、Thermo Fisher Scientific 社)をトランスフェクションした。24 時間後に LPS と IFN- γ (各 100 ng/mL) を添加し、さらに 24 時間培養した。その後、各種実験を行った。

2-4 Real-time RT-PCR (RT-qPCR) 法

細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、トリゾール試薬 (Invitrogen 社) を用いて総 RNA を抽出した。ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (東洋紡株式会社) のプロトコールに従い cDNA を作製した後、Thunderbird[®] SYBR[®] qPCR Mix (東洋紡株式会社) を用いて RT-qPCR を行った。標的の mRNA は、Table 1 に示す特異的なプライマーを用いて増幅した。それぞれの mRNA 発現量は、 β -actin mRNA 発現量で補正した。

Table 1. The primer sequences used for RT-qPCR

Genes		Sequence (5' to 3')
ELOVL1	sense	TCCCTCTACATTGTCTATGAGTTCC
	antisense	TTCAGTTGGCCTTGACCTTGGCAATACC
ELOVL5	sense	CCTTGGACTCACACTGCTGTCTCTG
	antisense	TTCAATCCTTCCGCAGCTTCCTTGGC
ELOVL7	sense	TCTATGAATCCTTGAGGGCCTA
	antisense	TGACAACATCCACAGAATGTTCC
IL-6	sense	AGACAGCCACTCACCTCTTCA
	antisense	GATTTTCACCAGGCAAGTCTC

IL-12B	sense	GGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGC
	antisense	GCTGCAAGTTGTTGGGTGGGTCAGGTTTG
IL-23A	sense	AGTGTGGAGATGGCTGTGACC
	antisense	GCTGGGACTGAGGCTTGAATCTG
CD80	sense	CTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTT
	antisense	GCCAGTAGATGCGAGTTTTGTGC
CD206	sense	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA
	antisense	CAAAACGCTCGCGCATTGTCCA
β -actin	sense	TGCGTGACATTAAGGAGAAGC
	antisense	GAGTTGAAGGTAGTTTCGTGG

2-5 細胞抽出液および核抽出液の調製

細胞抽出液の調製には、lysis buffer (1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、20 mM β -glycerophosphate、5 μ g/mL leupeptin、1 mM dithiothreitol (DTT)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、0.1% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4) を使用した。細胞を PBS で洗浄した後、lysis buffer 150 μ L を添加し細胞を回収した。10 分おきに攪拌しながら氷上に 30 分静置し、細胞を可溶化した。その後、遠心 (14,000 \times g、10 分、4°C) し、得られた上清を細胞抽出液とした。核抽出液の調製は以下のように行った。細胞を PBS で洗浄後、Buffer A (15 mM KCl、2 mM MgCl₂、5 μ g/mL leupeptin、0.5 mM PMSF、2 mM DTT を含む 20 mM HEPES 緩衝液 pH 7.8) 800 μ L を用いて細胞を回収した後、遠心 (1,500 \times g、3 分、4°C) した。この細胞に 0.2% Nonidet P-40 を含む buffer A 800 μ L を加え、氷上で 5 分間静置した。その後、遠心 (10,000 \times g、40 秒、4°C) し、得られた沈殿物に Buffer B (0.4 M NaCl、10% glycerol、5 μ g/mL leupeptin、0.5 mM

PMSF、2 mM DTT を含む 20 mM HEPES 緩衝液 pH 7.8) 60 μ L を加え、10 分おきに攪拌しながら氷上に 30 分間静置した。その後、遠心 (14,000 \times g、10 分、4°C) し、得られた上清を核抽出液とした。調製した細胞抽出液および核抽出液の総タンパク質濃度は、Bradford 法にて測定した。

2-6 ウェスタンブロット法

細胞抽出液 (20 μ g) と核抽出物 (10 μ g) をウェスタンブロット用のサンプルとして用いた。各サンプルを SDS-PAGE sample buffer (2% SDS、10% glycerol、1 mM DTT、0.01% bromophenol blue を含む 62.5 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8) と混和した後、沸騰水中で 5 分間処理した。電気泳動は、12%分離ゲルと 5%濃縮ゲルを用いて定電流 (18 mA) で行った。電気泳動で分離したタンパクを PVDF メンブランに転写した後、1% BSA を含む PBS 溶液を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体 (1,000 倍希釈) とメンブランを 4°C で一晩反応させた。その後、HRP 標識抗 IgG 抗体 (5,000 倍希釈) と室温で 1 時間反応させた。各種抗原の検出は、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた化学発光法にて行った。ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad 社) で撮影し、画像解析を行った。

2-7 ELISA 法

細胞培養液を回収し ELISA 用の試料とした。ELISA は、ELISA Kit for human IL-6 (Abcam 社) ならびに IL-12/IL-23 p40 (Abcam 社) を用いて行った。

2-8 使用した公共 RNA-seq データ

公共 RNA-seq データは Gene Expression Omnibus (GEO) より取得した。マクロ

ファージの解析には GSE159112、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells : pDC) の解析には GSE79272 を使用した。GSE159112 の解析では、THP-1 細胞を PMA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 48 時間処理し分化誘導した M0 マクロファージ (n=3)、LPS (100 ng/mL) と IFN- γ (25 ng/mL) を 24 時間処理した M0 マクロファージ (n=3)、IL-4 と IL-13 (各 20 ng/mL) を 24 時間処理した M0 マクロファージの計 9 サンプルを使用した。GSE79272 の解析では、薬剤未処理の健常人由来 pDC (n=6)、イミキモド (IMQ ; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 18 時間処理した健常人由来 pDC (n=6)、CpG-C ODN 2395 (CpG ; 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を 18 時間処理した健常人由来 pDC (n=6) の計 18 サンプルを使用した。

2-9 RNA-seq 解析

RNA seq データのアダプター配列ならびに低クオリティリードの除去には Trim Galore (v.0.6.6) を使用した²⁸⁾。クオリティチェックには FastQC (v.0.11.9) を使用した²⁹⁾。ヒトのリファレンスゲノム (hg38) へのマッピングには STAR (v.2.7.9a) を使用した³⁰⁾。遺伝子発現量の定量には featureCounts (v.2.0.1) を使用した³¹⁾。発現変動遺伝子 (differentially expressed genes : DEG) の検出には R パッケージである TCC (v.1.26.0) を使用した³²⁾。DEG の閾値には $q\text{-value} < 0.1$ を設定した。また、全サンプルの合計カウント値が 100 に満たない DEG は低発現遺伝子として除外した後、DEG のカウント値を対数変換し、以降の解析に使用した。M1 様マクロファージならびに M2 様マクロファージの Gene Ontology (GO) 解析では、M0 マクロファージと比較した DEG を抽出し、 $q\text{-value}$ が上位 500 までの DEG を使用して GO 解析を行った。pDC の GO 解析では、薬剤未処理群と比較した DEG を抽出し、 $q\text{-value}$ が上位 500 までの DEG を使用して GO 解析を行った。ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子の抽出にはピアソンの積率相関係数を利用した³³⁾。

ピアソンの相関係数が $0.9 \geq$ である遺伝子を、ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子としてその後の解析に使用した。

2-10 GO 解析

GO Biological Process (BP) エンリッチメント解析には R パッケージである clusterProfiler (v.3.14.3) を使用した³⁴⁾。閾値として $p\text{-value} < 0.05$ 、Benjamin-Hochberg adjusted $p\text{-value} < 0.05$ を設定した。

2-11 Metascape 解析

ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群の上流転写因子予測解析には Metascape を使用した³⁵⁾。

2-12 統計学的分析

データの分析は Bonferroni 法あるいは Student's t-test を用いて行った。 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

第3節 結果

3-1 THP-1 細胞由来マクロファージの公共 RNA-seq データ解析

マクロファージにおける ELOVL ファミリーの遺伝子発現を検討するため、THP-1 細胞由来マクロファージの公共 RNA-seq データ (GSE159112) を解析した。初めに、本データを解析に使用する妥当性を検証するため、マクロファージの分化に伴う変動遺伝子の解析を行った。解析では、M0 マクロファージ群との比較により抽出された DEG のなかで、特に q -value 値が上位 500 に該当する遺伝子を GO 解析に使用した。GO 解析の結果、M1 様マクロファージでは response to virus、defense response to virus など自然免疫の活性化に関わる GO term が検出された (Fig. 1A)。一方、M2 様マクロファージでは extracellular matrix organization、extracellular structure organization など抗炎症応答に関わる GO term が検出された (Fig. 1A)。以上の結果から、本 RNA-seq データはマクロファージの分化に伴う遺伝子の活性化が評価できたことから、以降の解析に使用することは妥当であると判断した。続いて、本データを用いて M0、M1 および M2 様マクロファージにおける ELOVL ファミリーの遺伝子発現を検討した。M0、M1 および M2 様マクロファージにおいて ELOVL1、ELOVL5、ELOVL7 が発現しており、これら遺伝子の発現は M1 様マクロファージへの分化に伴い増加していた (Fig. 1B)。特に、ELOVL7 の発現は著しく亢進していた。一方、ELOVL2、ELOVL3、ELOVL4、ELOVL6 は M0、M1 および M2 様マクロファージで発現していなかった (Fig. 1B)。

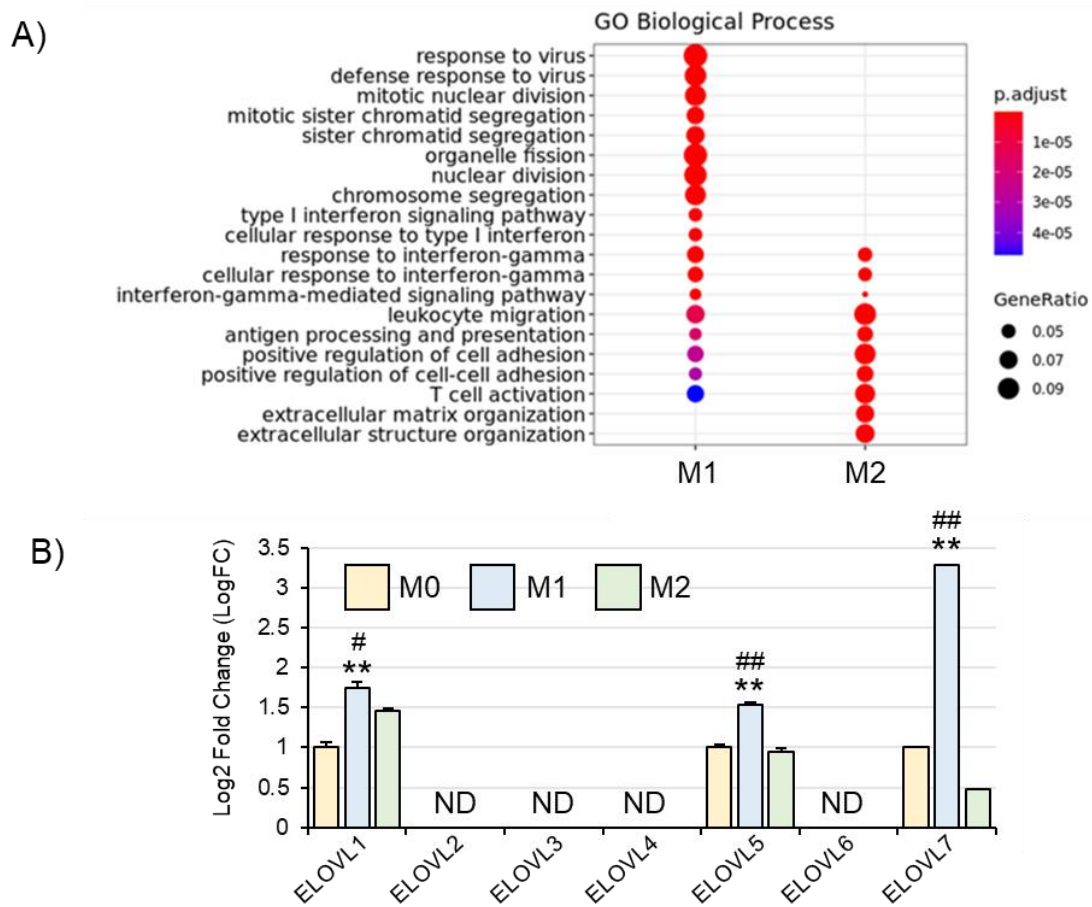


Fig. 1. RNA-seq analysis of THP-1-derived macrophage polarization model.

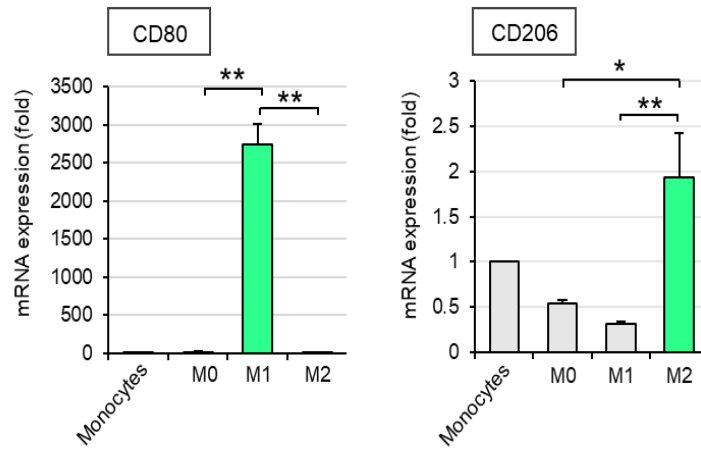
(A) GO BP enrichment analysis using RNA-seq data set (GSE159112). M1- and M2-like macrophage data sets were compared with the M0 macrophage data set and DEGs were identified respectively. The top 500 DEGs according to q -value were used for the enrichment analysis. M1, M1-like macrophages; M2, M2-like macrophages. (B) The expression levels of ELOVL family genes in the data set (GSE159112). Values (mean \pm SEM, $n=3$) are expressed as log₂ fold changes relative to M0 macrophages. ND, not detected. ** $p < 0.01$ (vs. M0 macrophages). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ (vs. M2-like macrophages).

3-2 RT-qPCR を用いた THP-1 細胞由来マクロファージにおける ELOVL ファミリー発現量の解析

公共 RNA-seq データの解析から、M1 様マクロファージで ELOVL1、ELOVL5 および ELOVL7 の発現が亢進することが確認できた。そこで、この現象の機序を解明するために、著者は THP-1 細胞由来マクロファージモデルを構築した。THP-

1 細胞を PMA で 24 時間処理し、M0 マクロファージへ分化させた後、M1 分化誘導剤 LPS/IFN- γ あるいは M2 分化誘導剤 IL-4/IL-13 により細胞を刺激した。LPS/IFN- γ により CD80 (M1 マクロファージマーカー) の発現が、IL-4/IL-13 により CD206 (M2 マクロファージマーカー) の発現が亢進したことから (Fig. 2A)、本実験条件で M1 および M2 様マクロファージへの分化を誘導できることが確認できた。この条件下で構築した M0、M1 ならびに M2 様マクロファージにおいて、RNA-seq 解析と同様に、ELOVL2、ELOVL3、ELOVL4、ELOVL6 は検出できなかった (Cq 値>30)。ELOVL1、ELOVL5 はどのサブタイプのマクロファージにも発現していたが、M1 様マクロファージへの分化に伴う有意な発現変化は認められなかった (Fig. 2B)。一方、ELOVL7 は単球から M0 マクロファージへの分化に伴い発現が亢進し、M1 様マクロファージに分化することでその発現はさらに亢進した (Fig. 2B)。

A)



B)

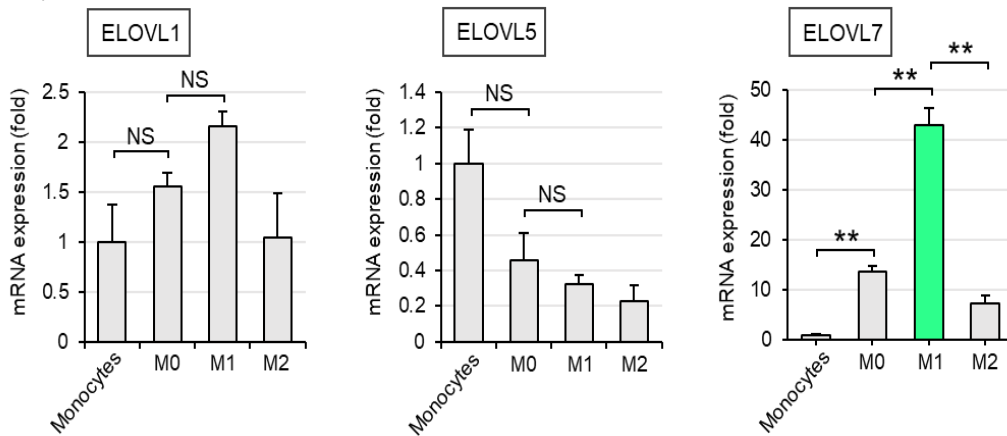


Fig. 2. Upregulation of ELOVL7 mRNA in M1-like macrophages.

(A) Differentiation of M0 macrophages into M1- and M2-like macrophages. THP-1 cells were treated with PMA (30 ng/mL) for 24 hr (M0 macrophages). M0 macrophages were treated with LPS and IFN- γ (100 ng/mL each; M1-like macrophages), or IL-4 and IL-13 (20 ng/mL each; M2-like macrophages) for 24 hr. After the treatment, CD80 and CD206 were detected by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to the Monocytes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) ELOVL family mRNA expression in macrophages. The expression levels of ELOVL family in M1 and M2-like macrophages were detected by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to the monocytes. NS, not significant. ** $p < 0.01$.

3-3 M1 様マクロファージへの分化に伴う ELOVL7 の発現制御機構の解析

M1 様マクロファージへの分化に伴う ELOVL7 mRNA 発現亢進の機序の解明に取り組んだ。初めに、LPS/IFN- γ による ELOVL7 の発現誘導の時間依存性を検討した。LPS/IFN- γ を添加した 2 時間後に ELOVL7 の発現は有意に亢進し、その発現は 6 時間まで持続していた (Fig. 3A)。

次に、ELOVL7 の発現調節に関わる転写因子を予測するため、ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群がどのような転写因子により調節を受けているかどうかを RNA-seq データを用いて解析した。ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群は、RNA-seq データセット GSE159112 を利用し、ピアソンの積率相関係数に基づいて (Pearson $r \geq 0.9$) 抽出した。Metascape を用いて上流転写因子の予測解析を行った結果、転写因子の候補として *RELA*、*NF κ B1*、*STAT1* が同定された (Fig. 3B)。

M1 様マクロファージにおける炎症応答では、転写因子 NF- κ B や STAT1 の活性化が炎症性サイトカインの発現亢進に寄与していることが報告されている³⁶⁾。しかし、これら転写因子が極長鎖脂肪酸合成酵素である ELOVL7 の発現制御に関与しているかどうかは不明である。そこで、LPS/IFN- γ による ELOVL7 発現誘導における NF- κ B および STAT1 の関与を明らかにするために、それぞれの転写因子の活性化経路の阻害剤を利用し解析を行った。

NF- κ B 経路の阻害剤 BAY11-7082 (BAY) は LPS/IFN- γ による ELOVL7 発現亢進を抑制した。しかし、STAT1 経路の阻害剤 fludarabine phosphate (Flu) は ELOVL7 発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 3C)。本実験系で、実際に BAY と Flu がそれぞれ NF- κ B と STAT1 の活性化を抑制するかどうかをウエスタンブロット法により検討した。LPS/IFN- γ による NF- κ B 核移行は BAY により、STAT1 のリン酸化の亢進は Flu により抑制された (Fig. 3D)。ELOVL7 の発現は LPS 単独刺激でも誘導されたが、IFN- γ 単独刺激のみでは ELOVL7 は誘導されなかった (Fig. 3E)。ま

た、LPS に IFN- γ を併用してもその ELOVL7 発現量に変化は認められなかった (Fig. 3E)。

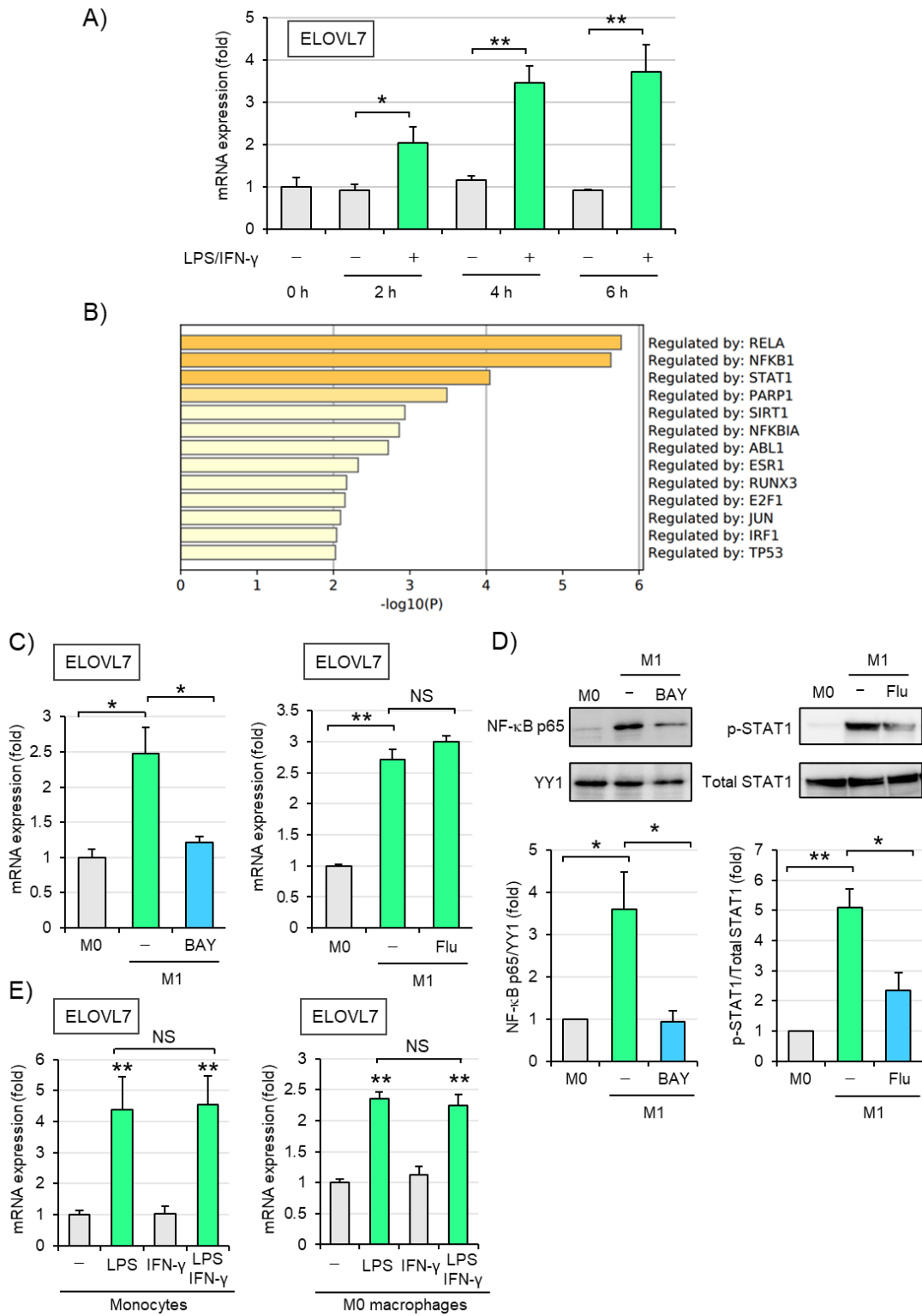


Fig.3. Contribution of NF- κ B to ELOVL7 mRNA expression.

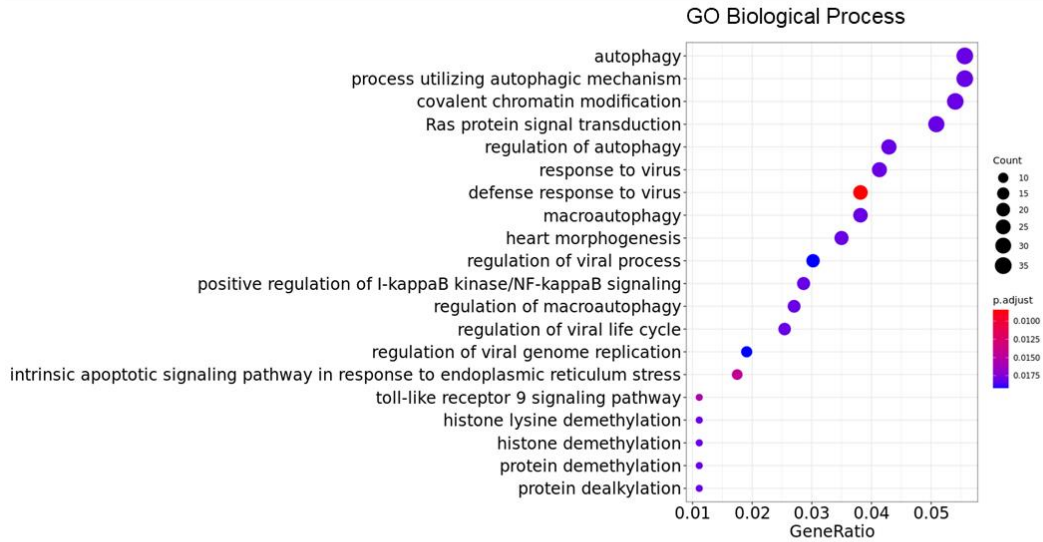
(A) Time-course study. M0 macrophages were treated with LPS and IFN- γ (100 ng/mL each) for the indicated times. After the treatment, RT-qPCR was performed. Values (mean \pm SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to the control (Time 0). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Enrichment analysis of ELOVL7 highly correlated genes (Pearson $r \geq 0.9$) using data set GSE159112. Candidate transcription factors were elucidated by Metascape analysis employing the TRRUST method. Graphic was created with Metascape. (C) The effect of NF- κ B and STAT1 inhibitors on ELOVL7 mRNA expression in M1-like macrophages. M0 macrophages were pretreated with BAY (20 μ M) or Flu (100 μ M) for 30 min, and then treated with LPS and IFN- γ (100 ng/mL each) for 2 hr. After the treatment, RT-qPCR was performed. Values (mean \pm SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to M0 macrophages. NS, not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) The effect of the inhibitors on NF- κ B and STAT1 activation in M1-like macrophages. After the treatment described in (C), nuclear extracts (NF- κ B) and whole cells extracts (STAT1) were prepared from the cells and then subjected to Western blot analysis. The expression levels of NF- κ B and p-STAT1 were normalized to those of YY1 and total STAT1, respectively. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (E) The effects of the combination of LPS and IFN- γ on ELOVL7 mRNA induction. THP-1 monocytes or M0 macrophages were treated with LPS and/or IFN- γ (100 ng/mL each) as indicated for 2 hr. After the treatment, RT-qPCR were performed. Values (mean \pm SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to untreated cells. ** $p < 0.01$. NS, not significant.

3-4 ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群の GO 解析

上述の実験により、LPS/IFN- γ による M1 様マクロファージへの分化に伴う ELOVL7 の発現亢進が NF- κ B により制御されることが明らかとなった。しかし、M1 様マクロファージの炎症応答において、ELOVL7 がどのような役割を担っているのかは不明である。そこで、マクロファージにおける ELOVL7 の機能を推定するために、RNA-seq データセット (GSE159112) を使用して ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群 (Pearson $r \geq 0.9$) を抽出し GO 解析を行った。その結果、response to virus、defense response to virus、positive regulation of I- κ B kinase/NF- κ B signaling、toll-like receptor 9 signaling pathway などウイルス感染時の免疫応答の活性化を示唆する GO term が検出された (Fig. 4A)。また、有意差の最も大きかった GO term 5 項目についてネットワーク図を作成したところ、IL-1 β や IL-23A など

M1 様マクロファージの炎症応答時に産生が亢進するサイトカインが ELOVL7 と高い正の相関を示すことが判明した (Fig. 4B)。

A)



B)

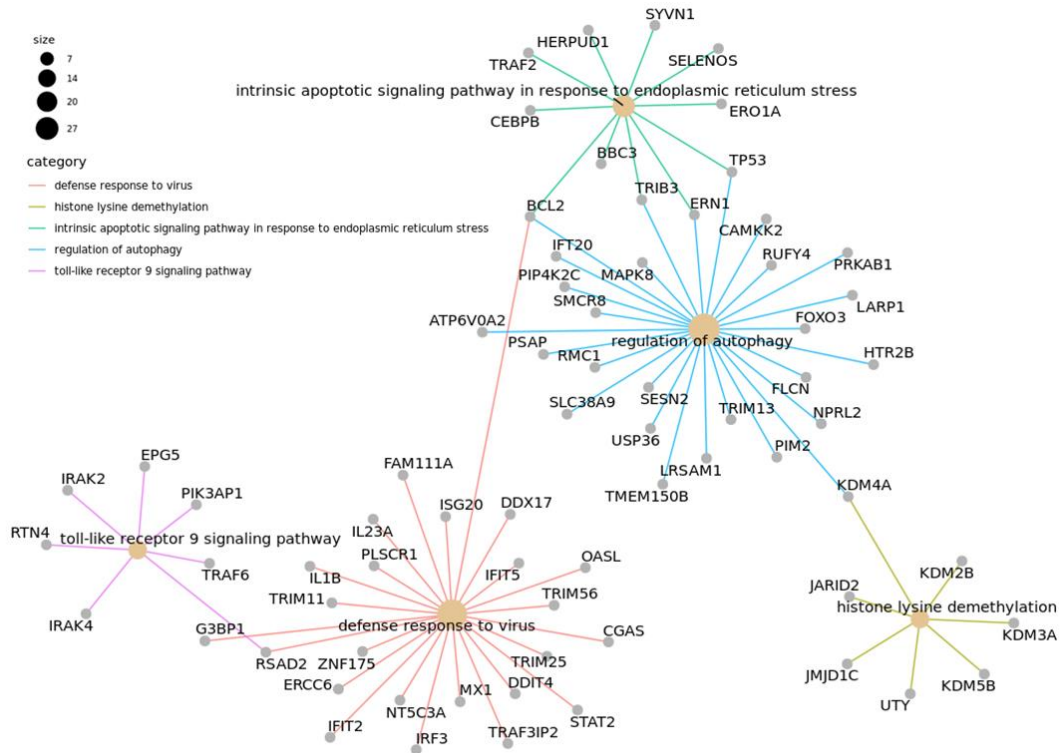


Fig. 4. Functional enrichment analysis of ELOVL7 highly correlated genes.

(A) GO BP enrichment analysis of ELOVL7 highly correlated genes (Pearson $r \geq 0.9$) using data set GSE159112. The top 20 significantly enriched GO terms are shown. Size of the circle represents number of genes, and color change of the circle corresponds to different p -value. (B) The network of the top 5 significantly enriched GO terms of (A) are illustrated. Size of the circle represents number of genes.

3-5 ELOVL7 が炎症性サイトカイン産生と M1 マクロファージマーカー遺伝子の発現に及ぼす影響

GO 解析の結果から、ELOVL7 は IL-1 β や IL-23A などの炎症性サイトカインの遺伝子発現と密接に関連していることが判明した。また、VLCFA が細胞内に蓄積した細胞では、これらの炎症性サイトカインの産生量が増大していることが報告されている²²⁾。そこで、ELOVL7 が M1 様マクロファージにおけるサイトカインの産生に及ぼす影響を検討した。ELOVL7 siRNA により M1 様マクロファージの ELOVL7 をノックダウンしたとき、M1 様マクロファージで分泌が亢進する IL-6 と IL-12/IL-23 p40 の産生量が変化するかどうかを ELISA および RT-qPCR により測定した。ELOVL7 ノックダウンにより ELOVL7 の発現は有意に抑制された。他の ELOVL ファミリーの発現についても測定したところ、ELOVL5 の発現は変化しなかったが、ELOVL1 の発現は亢進した (Fig. 5A)。この ELOVL1 の発現が亢進した理由は現在不明であるが、代償的な応答によるものであるかもしれない。ELOVL7 をノックダウンした細胞では、IL-6 と IL-12/IL-23 p40 の分泌量が減少した (Fig. 5B)。しかし、これらの遺伝子の発現量に変化は認められなかった (Fig. 5C)。さらに、ELOVL7 のノックダウンがマクロファージのマーカー遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。M1 様マクロファージにおける ELOVL7 ノックダウンは CD80 (M1 マクロファージマーカー) の発現を抑制したが、CD206 (M2 マクロファージマーカー) には影響を及ぼさなかった (Fig. 5D)。

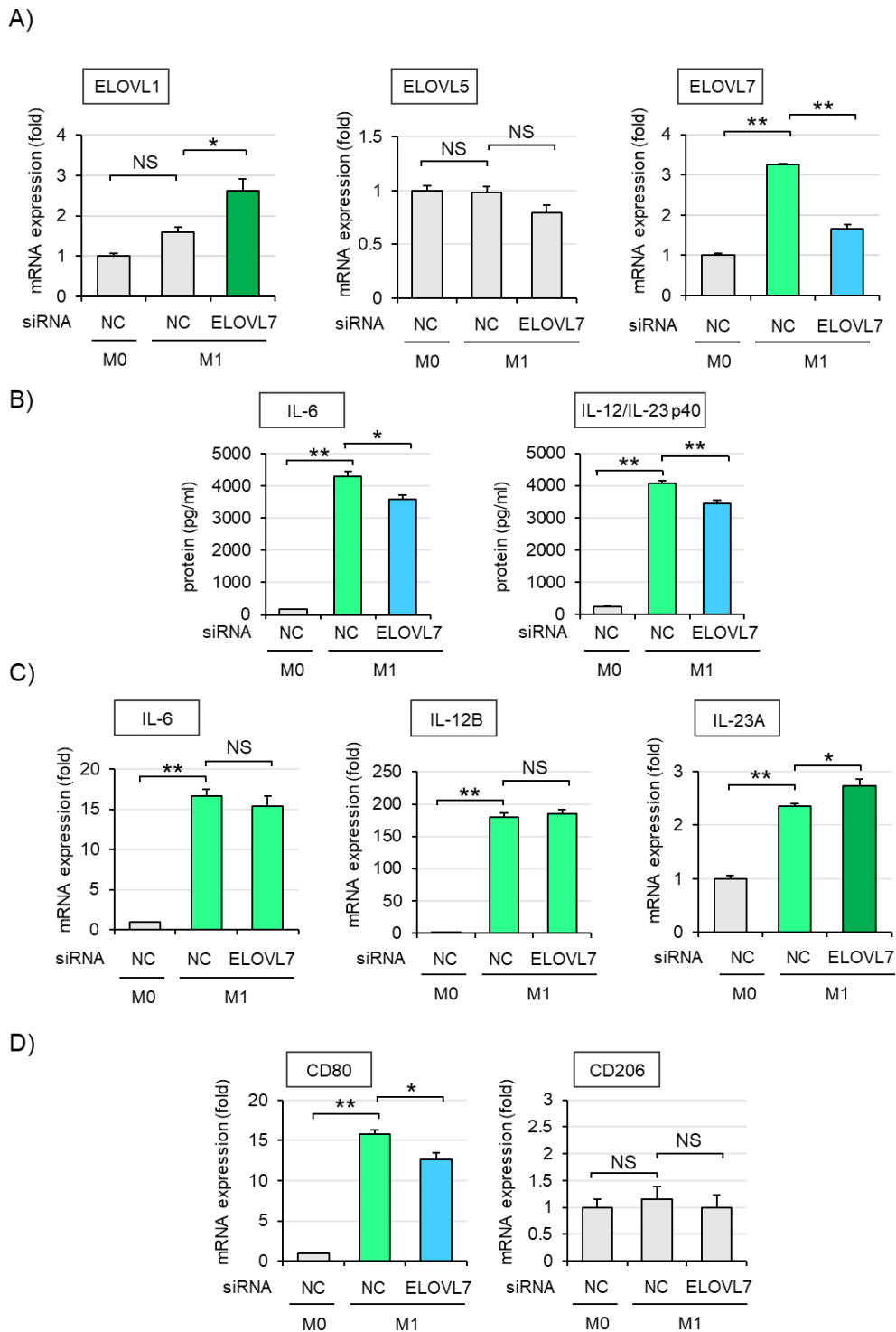


Fig. 5. Involvement of ELOVL7 in IL-6 and IL-12/IL-23 p40 production in M1-like macrophages.

THP-1 cells were treated with PMA (30 ng/mL), and then cells were transfected with ELOVL7 siRNA (20 nM) or negative control siRNA (NC, 20 nM) for 24 hr. After the treatment, the cells were treated with LPS and IFN- γ (100 ng/mL each) for 24 hr. (A) Effect of ELOVL7 knockdown on ELOVL1, ELOVL5, and ELOVL7 mRNA expression. After the treatment, RT-qPCR was performed. Values (mean

± SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to NC M0 macrophages. NS, not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) ELISA analysis. After the treatment, the conditioned medium was subjected to ELISA. Values (mean ± SEM, n=3) are expressed as IL-6 or IL-12/IL-23 p40 protein levels (pg/mL). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (C) Effect of ELOVL7 knockdown on cytokine mRNA expression. After the treatment, RT-qPCR was performed. Values (mean ± SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to NC M1-like macrophages. NS, not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Effect of ELOVL7 knockdown on macrophage polarization marker CD80 and CD206 mRNA expression. After the treatment, RT-qPCR was performed. Values (mean ± SEM, n=3) are expressed as fold changes relative to NC M0 macrophages. NS, not significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3-6 活性化 pDC における ELOVL ファミリーの制御

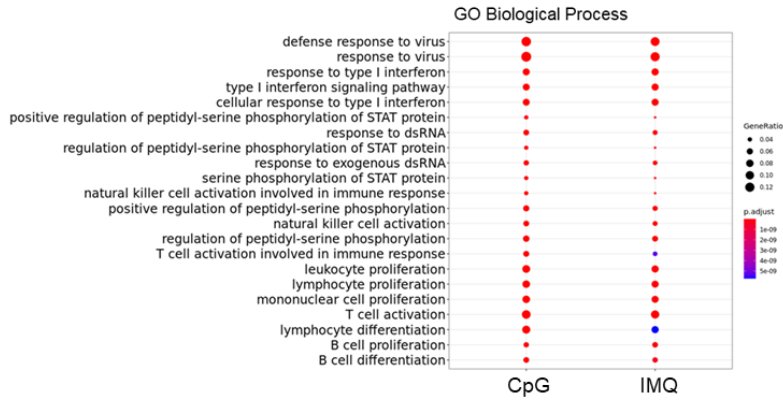
マクロファージの RNA-seq 解析から、ELOVL7 の発現はウイルス感染時の免疫応答に関連する遺伝子と高い正の相関を示すことが判明した。そこで、ウイルス感染時の免疫応答における ELOVL7 の関与を検証するために、生体内でウイルス感染時の司令塔の役割を担うプラズマサイトイド樹状細胞 (pDC) に着目した。pDC はウイルス由来の核酸成分を TLR7 や TLR9 を介して認識し、I 型インターフェロンを産生する³⁷⁾。pDC の活性化と ELOVL ファミリーの関連を検証するため、pDC の公共 RNA-seq データ解析を行った。この解析に使用した RNA-seq データ (GSE79272) は、ヒト末梢血単核細胞から pDC を分離した後、TLR7 アゴニストであるイミキモド (IMQ) あるいは TLR9 アゴニストである CpG-C ODN 2395 (CpG) で活性化を誘導した pDC から得られたデータである。

初めに、本データを解析に使用する妥当性を検証するため、pDC の活性化に伴う変動遺伝子の解析を行った。GO 解析により、それぞれのアゴニスト処理した pDC で自然免疫活性化に関わる GO term が検出された (Fig. 6A)。続いて、活性化 pDC における ELOVL ファミリーの発現量を解析した。アゴニストで処理した pDC では、ELOVL1 と ELOVL7 の発現が亢進し、特に ELOVL7 で著しい発現の亢進が認められた (Fig. 6B)。その他の ELOVL ファミリー発現は pDC で検出で

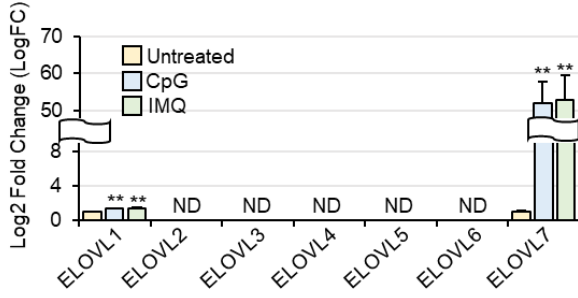
きなかった (Fig. 6B)。

活性化 pDC における ELOVL7 の発現制御機構を推測する目的で、ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群 (Pearson $r \geq 0.9$) の発現に関与する転写因子を Metascape により解析した。その結果、*NFκB1*、*RELA*、*IRF1* が候補遺伝子として同定された (Fig. 6C)。また、ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群について GO 解析を行った結果、response to virus、defense response to virus、regulation of RNA stability pathways などウイルス感染による免疫応答の活性化を示唆する GO term が検出された (Fig. 6D)。有意差の最も大きかった 5 項目についてネットワーク図を作成したところ、IL-12B、IL-12A、IL-15、I型インターフェロンなど pDC の抗ウイルス応答を示唆するサイトカインが ELOVL7 と高い正の相関を示した (Fig. 6E)。

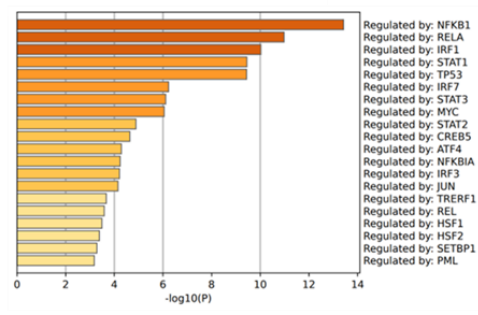
A)



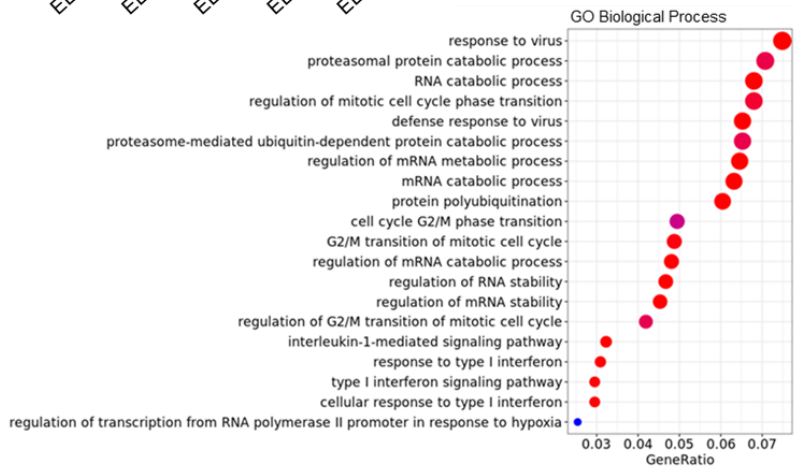
B)



C)



D)



E)

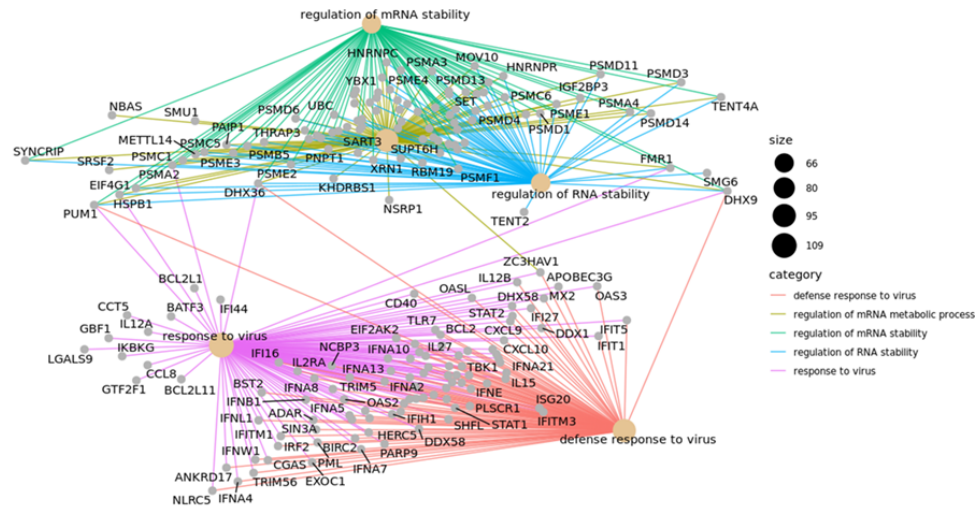


Fig. 6. The effect of TLR7 and TLR9 agonists on ELOVL7 mRNA expression in pDCs.

(A) GO BP enrichment analysis using RNA-seq data set (GSE79272). pDCs treated with CpG or IMQ data set were compared with pDCs treated with no drug data set, and DEGs were identified respectively. The top 500 DEGs according to q -value were used for the GO BP enrichment analysis. Size of the circle represents number of genes, and color change of the circle corresponds to different p -value. (B) The expression level of ELOVL family genes in data set GSE79272. ELOVL family genes filtered out because of low counts are represented as Not Detected (ND). Values (mean \pm SEM, $n=3$) are expressed as \log_2 fold changes relative to the Untreated pDCs. ** $p < 0.01$ (vs. Untreated pDCs). (C) Metascape analysis of ELOVL7 highly correlated genes (Pearson $r \geq 0.9$) using data set GSE79272. Candidate transcription factors are shown by Metascape analysis employing the TRRUST method. Graphic was created with Metascape. (D) GO BP enrichment analysis of ELOVL7 highly correlated genes (Pearson $r \geq 0.9$) using data set GSE79272. The top 20 significantly enriched GO terms are shown. Size of the circle represents number of genes, and color change of the circle corresponds to different p -value. (E) The network of the top 5 significantly enriched GO terms of (D) is illustrated. Size of the circle represents number of genes.

第4節 考察

ELOVL7 と自然免疫応答との関連性は以前から指摘されてきた。例えば、マイコバクテリア株が感染したマクロファージの RNA-seq 解析により、*ELOVL7* がマイコバクテリア感染と最も相関する遺伝子群のハブ遺伝子であること²⁷⁾、オリゴデンドロサイトにおいて活性化した ELOVL7 が細胞内における VLCFA の蓄積を引き起こし、炎症性神経変性を誘発することなどが報告されている³⁸⁾。本研究においても、著者がマクロファージの RNA-seq データを解析した結果、*ELOVL7* 発現と高い相関性を示す遺伝子として IL-1 β や IL-23A など自然免疫応答に関連するものが検出された。それゆえ、*ELOVL7* はマクロファージが免疫応答を誘発する際に重要な役割を担っていると考えられた。実際、*ELOVL7* ノックダウンは M1 様マクロファージの IL-6 や IL-12/IL-23 p40 分泌量を減少させた。一方、*ELOVL7* のノックダウンはこれらサイトカインの遺伝子発現には影響しなかった。また、*ELOVL7* のノックダウンで M1 マクロファージのマーカーである CD80 の遺伝子発現量が低下した。これらの結果より、*ELOVL7* はサイトカインの遺伝子発現を直接的に制御するのではなく、M1 様マクロファージへ分化した後に、その機能を発揮するために必要な遺伝子の発現を抑制することで、サイトカインの翻訳あるいは細胞外分泌などの過程を阻害するのではないかと考えられた。

ELOVL ファミリーにより産生される VLCFA 量の変動が、マクロファージのサイトカイン産性能や可塑性に影響を及ぼすことが報告されている^{6, 22)}。全身性に VLCFA が蓄積する X-ALD 患者の死後脳では、その病巣において M1 マクロファージの浸潤が観察される一方で、M2 マクロファージは減少している⁶⁾。X-ALD と同様の中枢神経系の慢性炎症性脱髄を特徴とする多発性硬化症では炎症応答の寛解と増悪を繰り返すが、X-ALD は常に進行性である。それゆえ、X-ALD では

ABCDI 変異による細胞内 VLCFA の蓄積よりマクロファージの抗炎症状態 (M2) への分化が抑制され、炎症促進状態 (M1) が持続することに起因すると考察されている⁶⁾。本研究において、ELOVL7 ノックダウンが M1 様マクロファージの機能を抑制したことから、ELOVL7 により産生される VLCFA がマクロファージの機能発現に重要であると考えられる。しかし、今回の研究では、VLCFA に関する解析をしていないことから、VLCFA のマクロファージの機能発現における詳細な役割の解明に向け今後さらなる検討が必要である。

M1 様マクロファージと活性化 pDC のどちらの細胞でも ELOVL1 と ELOVL7 の発現が認められた。ELOVL5 の遺伝子発現については、マクロファージの RNA-seq 解析から得られた結果と、著者が実際に RT-qPCR を行い得られた結果が異なっていた。また、pDC の RNA-seq 解析では ELOVL5 の発現が認められなかった。このことから、ELOVL5 は ELOVL1、ELOVL7 とは異なる機序でその発現が制御されており、ELOVL5 発現は免疫応答と関連している可能性は低いと考えられた。

ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群を **Metascape** で解析した結果、これらの遺伝子の発現を制御する転写因子の候補として NF- κ B と STAT1 が同定された。しかし、LPS/IFN- γ による ELOVL7 mRNA の発現誘導は、STAT1 阻害剤 Flu ではなく、NF- κ B 阻害剤 BAY により抑制された。また、LPS は単独処理で ELOVL7 の発現を亢進したが、IFN- γ 単独処理では ELOVL7 は誘導されず、LPS と IFN- γ を併用しても ELOVL7 の発現は増大しなかった。これらの結果から、LPS による TLR4 を介した NF- κ B 経路の活性化が ELOVL7 の発現に重要であると考えられた。本実験系において、NF- κ B の活性化はマクロファージの炎症応答初期に起きたこと、また、LPS/IFN- γ 刺激後速やかに ELOVL7 の発現が誘導されたことから、炎症応答初期における ELOVL7 により産生される VLCFA はマクロファージ機能の発現に重要な役割の担っている可能性が示唆される。

LPS/IFN- γ により分化した M1 様マクロファージだけではなく、RNA-seq 解析から、TLR7 や TLR9 のアゴニストで活性化した pDC においても ELOVL7 の発現が亢進していた。これらの受容体を介した抗ウイルス応答の発現は、IRF7 や NF- κ B の活性化により誘発される³⁹⁾。pDC の RNA-seq データ解析において、ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群が *NFKB1* や *RELA* の制御下にあると推定されたことから、pDC における ELOVL7 の発現も NF- κ B 依存的に制御されていると推察される。これらの結果は、ウイルス応答時における免疫応答にも ELOVL7 により産生される VLCFA が pDC の機能制御に寄与している可能性を示すもので興味深い。

本研究では、M1 様マクロファージにおいて、1) ELOVL7 の発現が亢進すること、2) ELOVL7 は M1 様マクロファージにおける炎症性サイトカイン IL-6 および IL-12/IL-23 p40 の産生に寄与すること、3) ELOVL7 の遺伝子発現は NF- κ B により制御されることを明らかにした。また、バイオインフォマティクス解析により、ELOVL7 は pDC 活性化にも関与している可能性を示した。以上の結果から、ELOVL7 は IL-6 や IL-12/IL-23 p40 の過剰な産生によって発症または増悪する炎症性疾患に対する有望な創薬標的であると考えられる。ELOVL7 はマクロファージや pDC における免疫応答に依存して発現が亢進するため、恒常的に発現する遺伝子を標的とした薬剤と比較し、副作用の軽減も期待できる。現在、ELOVL7 阻害剤の開発報告は存在しないため、今後、新規 ELOVL7 阻害剤の探索と、動物モデルにおける薬効評価が望まれる。

第2章 ローヤルゼリー含有脂肪酸による脂肪代謝制御因子

ANGPTL8 の発現制御機構の解明

第1節 緒言

飽食の時代を迎えた現代では、肥満や糖尿病などの糖・脂質代謝異常と関連した生活習慣病は社会的にも大きな課題となっている。生活習慣病の発症リスクとなる脂肪肝は、肝細胞に TG が蓄積することで起きる肝障害である。脂肪肝には、アルコール性肝障害と、明らかな飲酒歴がないにもかかわらず脂肪蓄積する NAFLD に分類される。我が国において行われた調査によれば、成人の NAFLD 有病率は 1994 年から 2000 年までの 6 年間で 12.9% から 34.7% へと急増した⁴⁰⁾。今後も偏食や運動不足による肥満人口の増加が予想されることから、NAFLD 患者数の更なる増加が懸念される^{41,42)}。

NAFLD は、単純性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver : NAFL) と進行性により肝硬変や肝がんの発症につながる脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) に分類される。NASH は NAFLD の 1~2 割を占める。NAFL が NASH へと進行する明確な機序は十分に解明されていないが、NAFL 患者の肝臓で生じた酸化ストレスや小胞体ストレスが炎症や線維化を惹起し NASH へと進行する 2 hit theory が提唱されている^{43,44)}。NAFLD 患者の増加に伴い、NASH を基盤とした肝硬変、肝がんなど重篤疾患患者の増加が懸念されることから^{45,46)}、NAFLD/NASH の予防・治療に向けた取り組みは喫緊の課題である。肝細胞に TG が過剰に蓄積することが NAFLD の発症を誘発することから、生体における脂質代謝異常を改善することができれば NAFLD 発症の抑制につながると考えられる。

ANGPTL はアンジオポエチンに類似の構造を有する分泌性タンパク質であり、

これまでに 8 種類の ANGPTL ファミリー分子が同定されている⁴⁷⁾。ANGPTL ファミリーの一員である ANGPTL8 は、ヒトでは肝臓、マウスでは肝臓や脂肪組織にて高発現しており、TG 分解の律速酵素である LPL 阻害活性を有している^{48,49)}。ANGPTL8 は摂食後に発現が亢進し、心筋や骨格筋の LPL を阻害するため、循環血液中の TG が増加し、脂肪組織での TG 取り込みが増大する⁵⁰⁾。実際、ANGPTL8 欠損マウスでは野生型マウスと比較し、体重、血中 TG および遊離脂肪酸は減少する⁵¹⁾。また、ANGPTL8 モノクローナル抗体を投与したマウスでは、心筋と骨格筋における LPL 活性が増大し、血清中 TG が低下する¹²⁾。NAFLD/NASH、糖尿病、肥満症など脂質代謝異常症患者の血中 ANGPTL8 量が高値を示すことから¹¹⁾、ANGPTL8 は、脂質代謝異常症の新規治療薬開発のためのターゲットとして期待されている。

RJ は働き蜂の大顎腺と下咽頭腺から分泌される乳白色の物質であり、タンパク質 (12~15%)、糖質 (10~12%)、脂質 (3~7%) およびアミノ酸やビタミンを含有している。RJ は、抗腫瘍作用、抗炎症作用、抗酸化作用など多様な生理活性を有する⁵²⁾。また、RJ の糖・脂質代謝異常に対する改善効果も報告されている。Guo らは 4 週間 RJ を摂取した健常人の血清コレステロールが RJ 未摂取群と比較して低値を示すこと、このコレステロール低下の理由の一つとして RJ の主要脂溶性成分である 10-ヒドロキシ-2-デセン酸 (10-hydroxy-2-decenoic acid : 10H2DA) が関与することを報告している⁵³⁾。また、10H2DA や他の RJ 含有脂肪酸であるセバシン酸 (sebacic acid : SA) の投与により、2 型糖尿病のモデル動物や患者においてインスリン抵抗性が改善することが示されている⁵⁴⁻⁵⁶⁾。このように、RJ 含有脂肪酸による糖・脂質代謝改善効果が示されているが、その作用機序については十分に解明されていない。そこで本章では、RJ 含有脂肪酸が脂質代謝に及ぼす影響を ANGPTL8 に着目して解析し、その発現制御機構について検討した。

第2節 実験方法

2-1 試薬

10H2DA は長良サイエンス株式会社、SA は和光純薬工業株式会社より購入した。抗 hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) 抗体 (sc-6556)、抗 β -actin 抗体 (sc-47778) は Santa Cruz Biotechnology 社より購入した。ダルベッコ変性イーグル培地 (Dullbecco's modified Eagle medium : DMEM)、PBS は日水製薬株式会社、ペニシリン、ストレプトマイシンは明治製薬株式会社、FCS は Invitrogen 社より購入した。Lipofectamine[®] RNAiMAX は Invitrogen 社より購入した。KOD-Plus- Mutagenesis Kit は東洋紡株式会社より購入した。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

2-2 細胞培養

ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞を使用した。10% FCS、4 mM グルタミン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、100 U/mL ペニシリン G を含む DMEM (10% FCS DMEM) を使用し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

2-3 RT-qPCR 法

細胞を PBS で洗浄した後、トリゾール試薬 (Invitrogen 社) を用いて総 RNA を抽出した。ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (東洋紡株式会社) のプロトコールに従い cDNA を作製した後、Thunderbird[®] SYBR[®] qPCR Mix (東洋紡株式会社) を用いて RT-qPCR を行った。標的の mRNA は、Table 2 に示す特異的なプライマーを用いて増幅した。それぞれの mRNA 発現量は、 β -actin mRNA 発現量で補正した。

Table 2. The primer sequences used for RT-qPCR

Genes		Sequence (5' to 3')
ANGPTL8	sense	AGAACTGGCACAGGATGAGGA
	antisense	CTCCATCTGAGTCTCCAACAG
HNF4 α	sense	GAAGAAGGAAGCCGTCCAGAATGA
	antisense	TCGCAGAAAGCTGGGATGTACTTG
β -actin	sense	TGCGTGACATTAAGGAGAAGC
	antisense	GAGTTGAAGGTAGTTTCGTGG

2-4 細胞抽出液の調製

細胞抽出液の調製には、lysis buffer (1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、20 mM β -glycerophosphate、5 μ g/mL leupeptin、1 mM DTT、1 mM PMSF、0.1% Triton X-100 を含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.4) を使用した。細胞を PBS で洗浄した後、lysis buffer 150 μ L を添加し細胞を回収した。10 分おきに攪拌しながら氷上に 30 分静置し、細胞を可溶化した。その後、遠心 (14,000 \times g、10 分、4°C) し、得られた上清を細胞抽出液とした。調製した細胞抽出液の総タンパク質濃度は、Bradford 法にて測定した。

2-5 ウェスタンブロット法

細胞抽出液 (35 μ g) をウェスタンブロット用のサンプルとして用いた。各サンプルを SDS-PAGE サンプル緩衝液 (2% SDS、10% glycerol、1 mM DTT、0.01% bromophenol blue を含む 62.5 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 6.8) と混和した後、沸騰水中で 5 分間処理した。電気泳動は、12%分離ゲルと 5%濃縮ゲルを用いて定電流 (18 mA) で行った。電気泳動で分離したタンパクを PVDF メンブランに転写し

た後、1% BSA を含む PBS 溶液を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。その後、一次抗体として、HNF4 α 抗体 (6,000 倍希釈)、抗 actin 抗体 (1,000 倍希釈) とメンブランを 4°C で一晩反応させた。その後、HRP 標識抗 IgG 抗体 (5,000 倍希釈) と室温で 1 時間反応させた。各種抗原の検出は、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた化学発光法にて行った。Chemi Doc Touch Imaging System (Bio-Rad) で撮影し、画像解析を行った。

2-6 ELISA 法

細胞培養液を回収し、ELISA 用の試料とした。ELISA は、ELISA Kit for Human β -trophin (EIAab 社) を用いて行った。

2-7 プラスミドの構築

ヒトゲノム DNA を鋳型とし、ヒト *ANGPTL8* 遺伝子の 5' 転写調節領域とエクソン 1 の一部 (-1926/+14) を含む DNA 断片 (Fragment I) を Table 3 に示したプライマーを用いて PCR により増幅した。精製した Fragment I を *Kpn* I と *Bgl* II で消化した後、ルシフェラーゼレポータープラスミド pGL4.12 (Promega 社) の *Kpn* I / *Bgl* II 部位に挿入し、*ANGPTL8* レポータープラスミド (-977/+14 pGL4) を構築した。欠失変異体は、-977/+14 pGL4 を鋳型に Table 3 に示したプライマーを用いた PCR 法を利用し構築した。

Table 3. The primer sequences used for the construction of plasmids

Plasmids		Sequence (5' to 3')
-1926/+14 pGL4	sense	GACTCGAGGACATGGTAGAAGGTGAACAGC
	antisense	GTAGATCTAGGGTCTAAGGTATAGCCACAG
-494/+14 pGL4	sense	ATATGCAGGTCTTGGAGATCAGG
	antisense	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAGA
-262/+14 pGL4	sense	GAAACAGGCTCAGCATGGTGAGT
	antisense	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAGA
-136/+14 pGL4	sense	GACATTCGCCTGATGCAACTATC
	antisense	GGTACCGGCCAGTTAGGCCAGA
-262/-137 delete pGL4	sense	GACATTCGCCTGATGCAACTATC
	antisense	TCCATCTATGAATAGGCATCGCA

2-8 レポーターアッセイ

HepG2 細胞を 24 穴プレートへ 1.7×10^5 cells /well の細胞密度で播種した。レポータープラスミド (-262/+14 pGL4 400 ng、TK-pRL 10 ng) を Lipofectamine[®] 3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてトランスフェクションした。一晚培養した後、遺伝子導入された細胞を実験に供した。ルシフェラーゼ活性は、細胞を冷 PBS で 2 回洗浄後、デュアル-ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega 社) を用いて測定した。ホタル (Firefly) ルシフェラーゼ活性 (-262/+14 pGL4) は、ウミシイタケ (*Renilla*) ルシフェラーゼ活性 (TK-pRL) で補正した。

2-9 クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

細胞へ DMEM で希釈した 1%ホルムアルデヒドを添加し、室温で 5 分間インキュベートした。その後、DMEM で希釈した 400 mM グリシンを添加し、室温で 5 分間インキュベートした。細胞を PBS で洗浄し、1 mM NP-40 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 10 mM NaCl and 0.5% NP-40) を添加して細胞回収後、遠心 (1,500 × g、3 分、4°C) した。沈殿を SDS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1% SDS and 10 mM EDTA) 100 μL で溶解し、ChIP dilution buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 0.11% deoxycholic acid, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β-glycerophosphate, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF) 400 μL を添加した。超音波破碎機 (ultrasonic homogenizer) を用いて処理 (出力 35%、12 秒×6 回) した後、ChIP dilution buffer 500 μL を加えた。超音波破碎後の溶液 200 μL を RIPA buffer I (50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, and proteinase inhibitors) 800 μL と混合した後、抗 HNF4α抗体 (1,000 倍希釈) を加えた。一晩転倒混和 (4°C) した後、10 μL の Dynabeads Protein G (Invitrogen 社) を添加し、さらに 4°C で 2 時間転倒混和した。RIPA buffer I、RIPA buffer II (50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, and proteinase inhibitors)、TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 1 mM EDTA) で beads を洗浄した。Beads および、input として超音波破碎した溶液 DNA 2 μL を 100 μL の ChIP elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.5% SDS) に懸濁し、RNase (Sigma 社) 1 μL (15 U) を添加した後、37°C で 30 分間インキュベートした。続いて、proteinase K (Sigma 社) 1 μL (546 U) を添加し、65°C で 2 時間インキュベートした。フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、得られた沈殿を TE

buffer 20 μ L に溶解した後、Table 4 に示すプライマーを用いて real-time PCR を行った。

Table 4. The primer sequences used for real-time PCR

Primer		Sequence (5' to 3')
ANGPTL8 for ChIP	sense	GAAACAGGCTCAGCATGGTGAGT
	antisense	GATAGTTGCATCAGGCGAATGTC

2-10 DNA プルダウンアッセイ

14 項に記載した方法により調製した細胞抽出液 (250 μ g) を使用した。細胞抽出液に poly (dI-dC) 5 μ g を添加し、4°C で 30 分間インキュベートした。その後、ビオチン標識 HNF4 α DNA プローブあるいはビオチン標識 mutant HNF4 α DNA プローブ 250 pmol を添加し、さらに 4°C で 1 時間インキュベーションした。ストレプトアビジン-アガロース樹脂 (Sigma 社) 15 μ L を添加し、4°C で一晩転倒混和した。翌日、タンパク/DNA プローブ/ストレプトアビジン-アガロース複合体を lysis buffer で 3 回洗浄した後、ウエスタンブロット法により検出した。使用した DNA プローブ配列を Table 5 に示す。DNA プローブの塩基配列は *ANGPTL8* 遺伝子の-185 から-163 の領域に相当する配列である。

Table 5. Oligonucleotides used in DNA pull-down assay

Probe	Sequence (5' to 3')
HNF4 α probe	biotin-ACACCTGGCCCTGAGCCCCAGGA
Mutant HNF4 α probe	biotin-ACACCT <u>CGCC</u> <u>AT</u> GAG <u>CGC</u> GAGGA

The underlined nucleotides indicate the mutated position.

2-11 siRNA トランスフェクション

HepG2 細胞を 3.5 cm dish に 6.5×10^5 cells/dish になるように播種し、Lipofectamine[®] RNAiMAX を用いて 6.7 nM の HNF4 α siRNA (Silencer Select ID s6698、Thermo Fisher Scientific 社) または negative control siRNA (Silencer Select NegativeControl 4390843、Thermo Fisher Scientific 社) をトランスフェクションした。24 時間後に 1.5 mL の 10% FCS DMEM 培地に置換し、さらに 24 時間培養した後、第 3 項、第 4 項および第 5 項で示す方法にて各種実験を行った。

2-12 統計学的分析

データの分析は Bonferroni 法あるいは Student's t-test を用いて行った。 $P < 0.05$ の場合を統計学的に有意であると判断した。

第3節 結果

3-1 RJ含有脂肪酸が ANGPTL8 mRNA 発現に及ぼす影響

RJ含有脂肪酸 (Fig. 7A) が ANGPTL8 の mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。HepG2 細胞を各化合物 (1.5 mM) で 24 時間処理した後、RT-qPCR にて ANGPTL8 mRNA 発現量を測定した。使用した全ての RJ 含有脂肪酸が ANGPTL8 mRNA の発現を抑制した (Fig. 7B)。評価した RJ 含有脂肪酸の中で SA が特に強い抑制効果を示した (Fig. 7B)。この結果から、以降の実験では SA をモデル化合物として使用した。

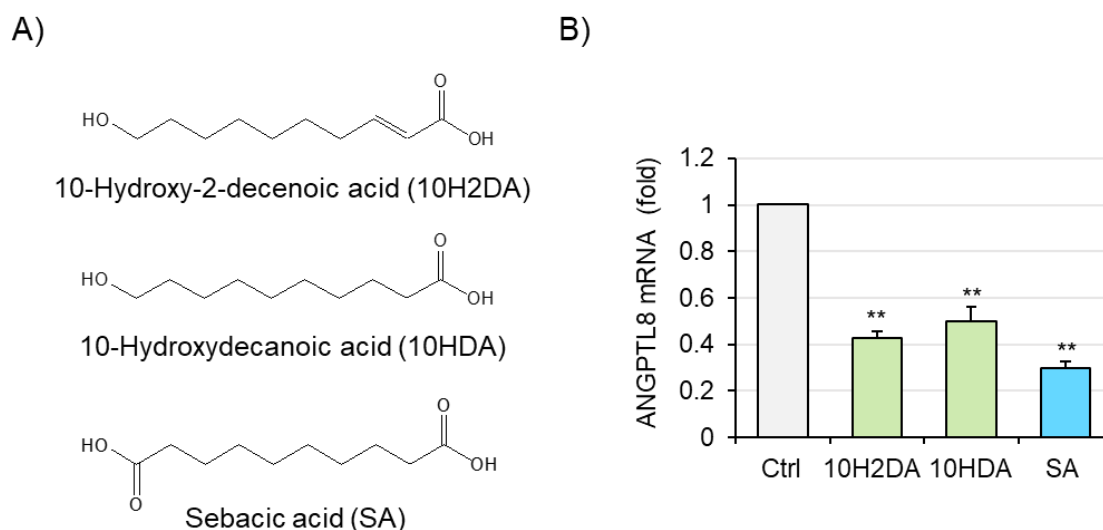


Fig. 7. Effects of RJ fatty acids on ANGPTL8 mRNA expression.

(A) Chemical structure of RJ fatty acids. (B) HepG2 cells were treated with each compound (1.5 mM) for 24 hr. The levels of ANGPTL8 mRNA were measured by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, n = 3) are expressed as fold changes relative to the control (Ctrl). ** $p < 0.01$ (vs. Ctrl).

3-2 SAによるANGPTL8発現抑制作用

SAがANGPTL8 mRNA発現を抑制したことから、その抑制作用について詳細な解析を行った。SAは濃度依存的にANGPTL8 mRNAの発現を抑制した (Fig.

8A)。また、SA による ANGPTL8 発現抑制は、SA 処理後 6 時間から認められ、24 時間まで持続した (Fig. 8B)。また、SA は培養液中の ANGPTL8 タンパク量も濃度依存的に抑制した (Fig. 8C)。

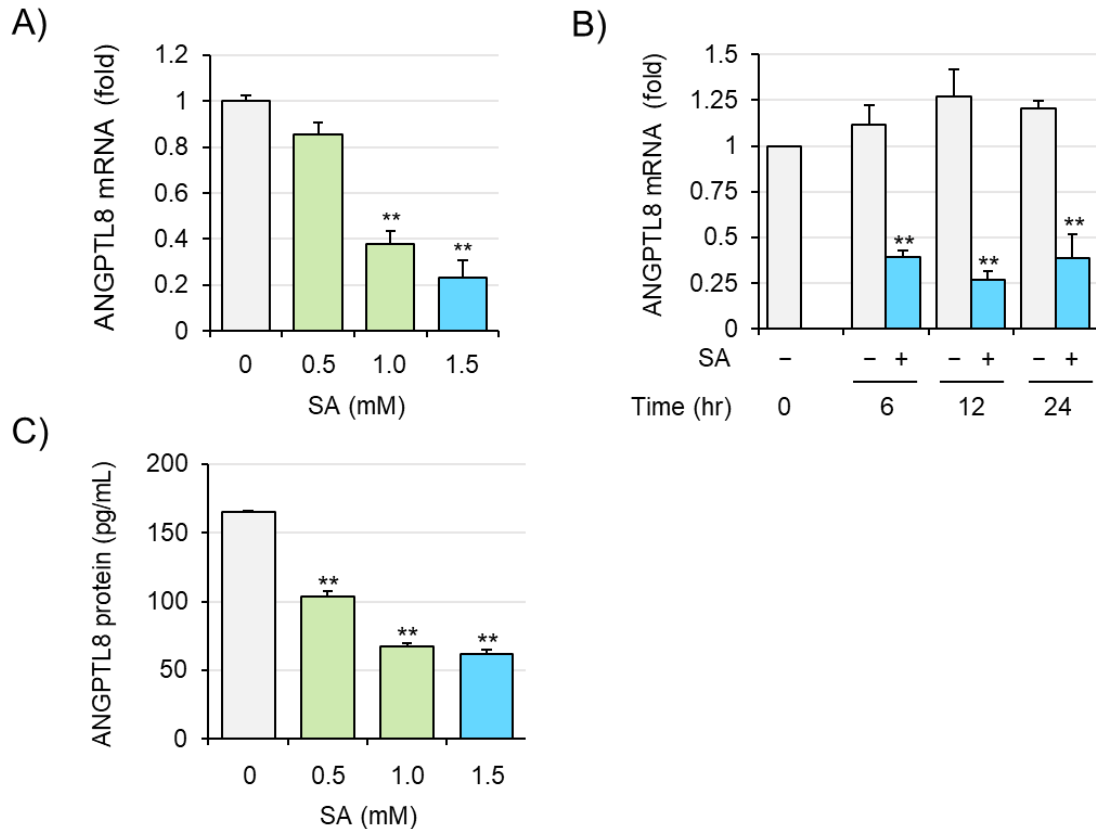


Fig. 8. Effects of SA on constitutive ANGPTL8 expression in HepG2 cells.

(A) Dose-dependent study. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of SA for 24 hr. The levels of ANGPTL8 mRNA were measured by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, $n = 3$) are expressed as fold changes relative to the control (0 mM). ** $p < 0.01$ (vs. 0 mM). (B) Time-course study. HepG2 cells were treated with SA (1.5 mM) for the indicated times. The levels of ANGPTL8 mRNA were measured by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, $n = 3$) are expressed as fold changes relative to the control (Time 0). ** $p < 0.01$ (vs. untreated cells). (C) ELISA analysis. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of SA for 24 hr. After the treatment, the conditioned medium was subjected to ELISA. Values (mean \pm SEM, $n = 3$) are expressed as ANGPTL8 protein levels (pg/mL). ** $p < 0.01$ (vs. 0 mM).

3-3 SA が *ANGPTL8* 遺伝子の転写活性に及ぼす影響

次に、SA により *ANGPTL8* mRNA の発現が抑制される機序の解明に取り組んだ。SA による *ANGPTL8* 発現の減少が転写レベルで起きている現象かどうかを確かめるために、転写阻害剤 actinomycin D (ActD) の効果を検討した。ActD 単独処理群と ActD+SA 処理群との間に *ANGPTL8* 発現抑制に対する有意な差が認められなかった。(Fig. 9A) そこで、SA の *ANGPTL8* 発現抑制作用が *ANGPTL8* の転写抑制によるものかどうか *ANGPTL8* 遺伝子のプロモーターのレポータープラスミドを用いたレポーターアッセイにより検討した。*ANGPTL8* 遺伝子の-977 から+14 までのプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミド (-977/+14 pGL4) を使用した。SA により *ANGPTL8* プロモーター活性が低下したことから (Fig. 9B)、SA は *ANGPTL8* 遺伝子発現を転写レベルで抑制すると考えられた。

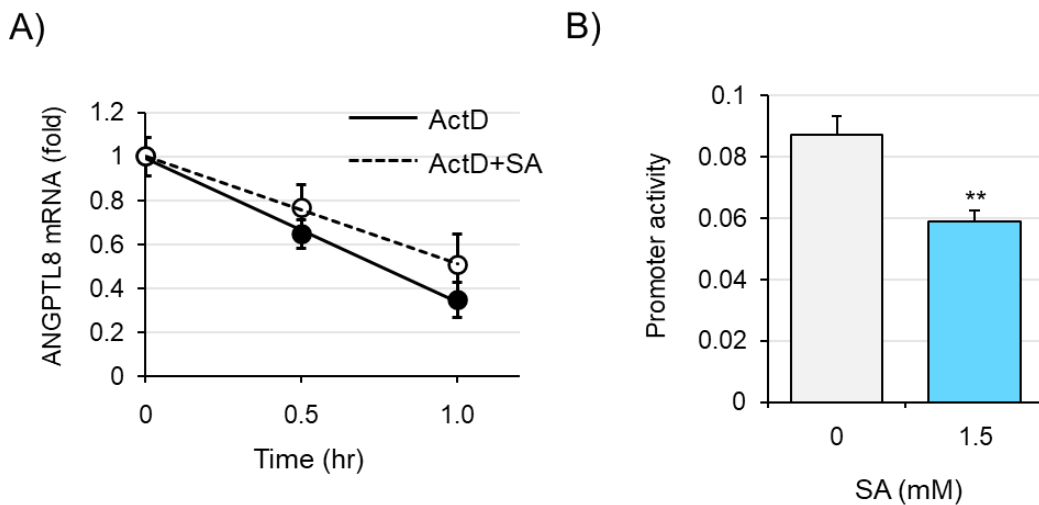


Fig. 9. Effects of SA on the transcriptional regulation of *ANGPTL8*.

(A) Effects of SA on *ANGPTL8* mRNA stability. HepG2 cells were treated with actinomycin D (ActD; 5 μ g/mL) in the presence or absence of SA (1.5 mM) for the indicated times. The levels of *ANGPTL8* mRNA were measured by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, n = 3) are expressed as fold changes relative to the control (Time 0). (B) Effects of SA on *ANGPTL8* promoter activity. HepG2 cells were transiently transfected with -977/+14 pGL4 (400 ng) and pRL-TK (10 ng). The next day, the cells were treated with SA (1.5 mM) for 24 hr. After the treatment, the cells were lysed and luciferase activity was measured

using a luminometer. Values (mean \pm SD, n = 3) are expressed as promoter activity (Firefly luciferase [-977/+14 pGL4]/Renilla luciferase [pRL-TK]). ** $p < 0.01$ (vs. 0 mM).

3-4 *ANGPTL8* 遺伝子の転写抑制に関与するシスエレメントの探索

上述の実験により、SA による *ANGPTL8* 遺伝子の発現抑制は転写レベルで制御されていることが示唆された。そこで、SA が *ANGPTL8* の転写を抑制する機序を明らかにするため、SA による *ANGPTL8* 遺伝子の転写抑制に重要な *ANGPTL8* プロモーター領域のシスエレメントの同定に取り組んだ。-977/+14 pGL4 をもとに、*ANGPTL8* プロモーターを 5'側から段階的に欠失させた欠失変異体を作製した。*ANGPTL8* 遺伝子のプロモーター領域を-262 まで欠失させても SA により *ANGPTL8* のプロモーター活性は低下したが、-136 まで欠失させたときには SA によるプロモーター活性の抑制が認められなかった (Fig. 10A)。また、-262 から -137 の部分を欠失させたレポータープラスミド (Δ -262/-137 pGL4) を用いたとき、*ANGPTL8* のプロモーター活性が低下し、SA によるプロモーター活性の低下も抑制された (Fig. 10B)。これらの結果から、*ANGPTL8* 遺伝子の-262/-137 の領域中に SA による *ANGPTL8* 発現抑制に関与するシスエレメントが含まれていると考えられた。

ANGPTL8 遺伝子の-262 から-137 の領域に結合する転写因子を、転写因子の結合予測データベース JASPAR⁵⁷⁾を用いて解析したところ、-165 から-183 の塩基配列が転写因子 HNF4 α の推定結合部位として同定された (Fig. 10C)。

activity in the lysate was measured using a luminometer. Values (mean \pm SEM, $n = 3$) are expressed as promoter activity (Firefly luciferase [pGL4]/*Renilla* luciferase [pRL-TK]). ** $p < 0.01$ (vs. untreated cells). (C) Schematic diagram of the HNF4 α putative binding site in the ANGPTL8 promoter. The open box indicates a putative HNF4 α binding site.

3-5 SA による ANGPTL8 発現抑制への HNF4 α の関与

HNF4 α は肝臓における主要な転写因子であり、糖・脂質代謝調節に関与している⁵⁸⁾。Fig. 10C の結果より、HNF4 α が ANGPTL8 の転写に寄与している可能性が示されたことから、SA が HNF4 α の発現に及ぼす影響を検討した。SA は濃度依存的に HNF4 α タンパク量を低下させたが (Fig. 11A)、HNF4 α の遺伝子発現には影響しなかった (Fig. 11B)。

続いて、SA が ANGPTL8 のプロモーター上の HNF4 α 推定配列を含む領域 (-262/-137) に結合しているかどうかを ChIP 法にて検討した。SA 処理により -262/-137 を含む領域に結合する HNF4 α が減少した (Fig. 11C)。また、HNF4 α が ANGPTL8 遺伝子の HNF4 α 推定結合配列に結合するかどうかを、その部位に相当する DNA プローブを用いてプルダウンアッセイを行った。HNF4 α は wild-type の DNA プローブと結合したが、変異 DNA プローブとは結合しなかったことから (Fig. 11D)、この推定配列に実際に HNF4 α が結合することが確認できた。さらに、SA で処理した細胞では、DNA プローブへの HNF4 α の結合が減少した (Fig. 11D)。

最後に、ANGPTL8 の発現制御における HNF4 α の寄与を確かめるために、ANGPTL8 遺伝子の発現に及ぼす HNF4 α ノックダウンの影響を検討した。HNF4 α siRNA のトランスフェクションにより、HNF4 α の mRNA およびタンパク質の発現は抑制された (Fig. 11E)。HNF4 α siRNA による HNF4 α のノックダウンは ANGPTL8 mRNA の発現を抑制した (Fig. 11E)。また、HNF4 α のノックダウンが

ANGPTL8 遺伝子の転写活性に及ぼす影響をレポーターアッセイで解析したところ、*ANGPTL8* 遺伝子の転写活性も HNF4 α のノックダウンで抑制された (Fig. 11F)。

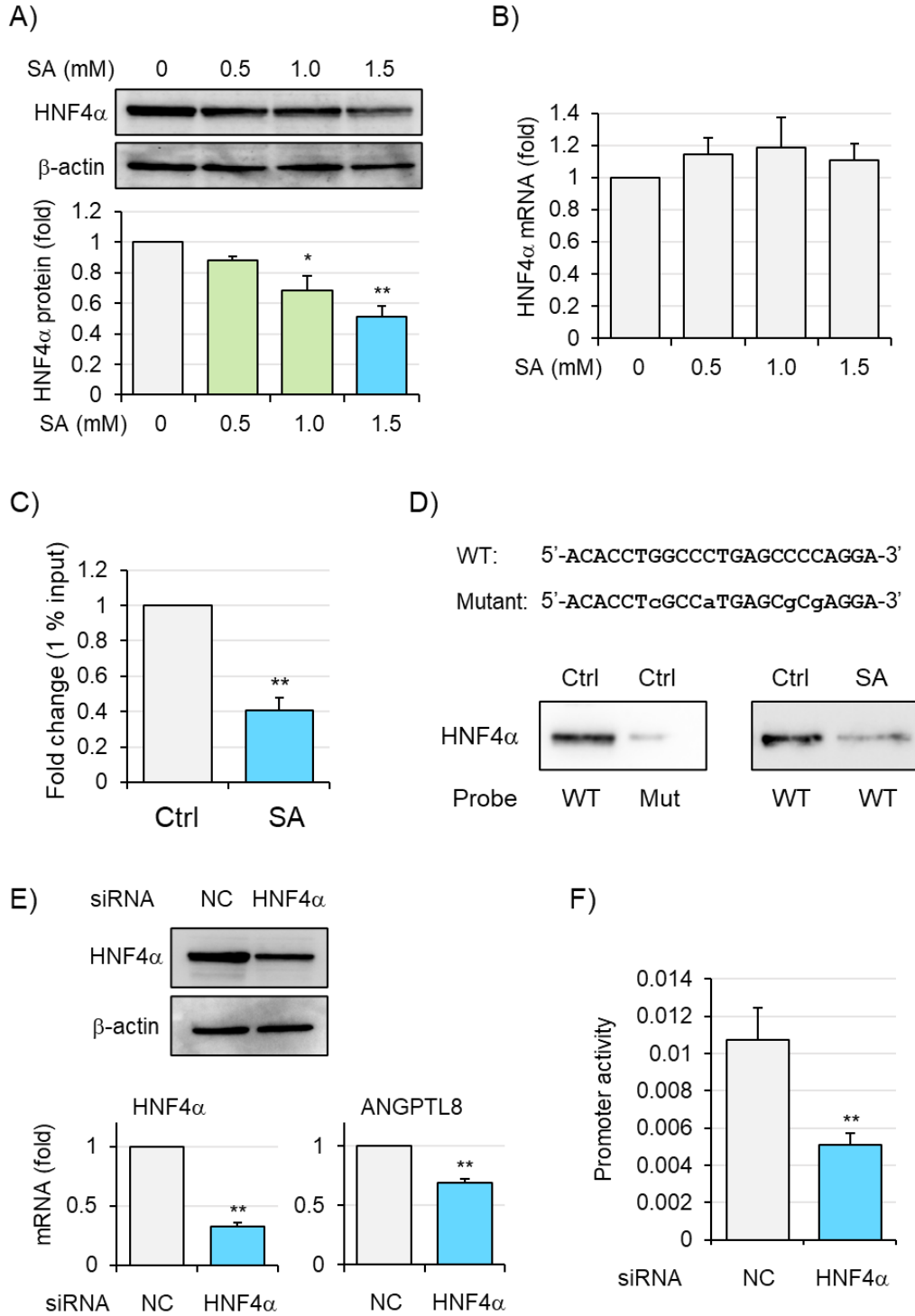


Fig. 11. Involvement of HNF4 α in SA-induced ANGPTL8 suppression.

(A) Effects of SA on HNF4 α protein expression. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of SA for 18 hr. After the treatment, whole cell extracts were prepared from the cells and then subjected to Western blot analysis. The expression levels of HNF4 α were normalized to those of β -actin. Values (mean \pm SEM, n = 3) are expressed as fold changes relative to untreated cells (0 mM). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs. 0 mM). (B) Effects of SA on HNF4 α mRNA expression. HepG2 cells were treated with the indicated concentrations of SA for 24 hr. The levels of HNF4 α mRNA were measured by real-time RT-PCR. Values (mean \pm SEM, n = 3) are expressed as fold changes relative to untreated cells (0 mM). (C) ChIP analysis of the ANGPTL8 promoter. HepG2 cells were treated with SA (1.5 mM) for 24 hr. After the treatment, sonicated genomic DNA was prepared from the cells and subjected to ChIP analysis. Values (mean \pm SEM, n = 3) are expressed as relative binding (1% input). ** $p < 0.01$ (vs. Ctrl). (D) DNA affinity precipitation assay. Upper panel: Nucleotide sequences of HNF4 α and mutant probes. Mutant nucleotides are indicated in small letters. Lower panel: HepG2 cells were treated with or without SA (1.5 mM) for 24 hr. After treatment, whole extracts were prepared from the cells and the DNA affinity precipitation assay was performed. A representative blot from 3 independent experiments is shown. WT, wild-type HNF4 α probe. Mut, mutant HNF4 α probe. (E) Effects of HNF4 α knockdown on ANGPTL8 mRNA expression. HepG2 were transfected with HNF4 α siRNA (5 nM) or negative control siRNA (NC, 5 nM) for 24 hr. Thereafter, the medium was changed to fresh growth medium and the cells were cultured for another 24 hr. Upper panel: Whole cell extracts were prepared from the cells and subjected to Western blot analysis. Lower panel: The levels of HNF4 α and ANGPTL8 mRNAs were measured by RT-qPCR. Values (mean \pm SEM, n = 3) are expressed as fold changes relative to NC. ** $p < .01$ (vs. NC). (F) Effects of HNF4 α knockdown on ANGPTL8 promoter activity. HepG2 were transfected with HNF4 α siRNA (5 nM) or negative control siRNA (NC, 5 nM) for 24 hr. Thereafter, the cells were transfected with -262/+14 pGL4 (400 ng) and pRL-CMV (10 ng). The next day, the cells were lysed and luciferase activity was measured using a luminometer. Values (mean \pm SD, n = 3) are expressed as promoter activity (Firefly luciferase [-262/+14 pGL4]/*Renilla* luciferase [pRL-CMV]). ** $p < 0.01$ (vs. NC).

第4節 考 察

RJ に含有されている中鎖脂肪酸は多彩な生理機能を有することが報告されている。例えば、免疫応答に関わる遺伝子の転写を調節する転写因子 NF- κ B の抑制を介した抗炎症作用や⁵⁹⁾、細胞外局在型の抗酸化酵素である extracellular superoxide dismutase の発現亢進を介した抗酸化作用が知られている⁶⁰⁾。本研究で著者は、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞において RJ 脂肪酸である SA が脂質代謝制御因子 ANGPTL8 の発現を抑制することを明らかにした。

ANGPTL8 は LPL の阻害を介して TG の分解を抑制することから、動脈硬化など脂質異常症の病態発症や進展に関与する重要な因子であると考えられている。Jiao らは、ANGPTL8 ノックダウンマウスでは野生型マウスと比較して血中の TG 量が減少し、ANGPTL8 を過剰発現させたマウスでは野生型と比較して血中の TG 量が亢進することを報告している⁶¹⁾。また、Izumi らは、ANGPTL8 ノックアウトラットでは野生型と比較して体重や血中 TG 量が減少することを報告している⁶²⁾。これらの知見から、ANGPTL8 は動脈硬化などの脂質異常症の有望な創薬標的であると考えられている。RJ 脂肪酸の SA による ANGPTL8 抑制作用は、RJ 摂取による脂質代謝改善効果の機序の一つであると考えられる。

ANGPTL8 の発現を制御する転写因子として liver X receptor (LXR) と sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) などが同定されている。LXR アゴニスト T0901317 は SREBP-1c の活性化を介して ANGPTL8 の発現を亢進する⁶³⁾。また、摂食により生じる ANGPTL8 の発現亢進は LXR により制御されている⁶³⁾。本研究では、これらの転写因子に加え、HNF4 α が ANGPTL8 の転写制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。HNF4 α は肝臓や腸に存在する転写因子であり、脂質や胆汁酸、薬物の代謝に関連する遺伝子群を制御する^{64,65)}。これまで

に、HNF4 α をノックダウンした HepG2 細胞のマイクロアレイ解析により、HNF4 α と ANGPTL8 の関連性は示唆されていたが⁶⁶⁾、その詳細な発現制御のメカニズムは不明である。本研究では、ANGPTL8 プロモーターの転写開始領域の上流に存在する-262/-137 の領域が ANGPTL8 遺伝子の転写制御に重要であると明らかにした。また、本領域には HNF4 α の推定結合配列が存在しており、その配列に HNF4 α が結合することをプルダウンアッセイで確認した。また、HNF4 α をノックダウンした HepG2 細胞では、ANGPTL8 プロモーター活性は低下し、その遺伝子発現も抑制された。これらの結果から、HepG2 細胞では HNF4 α が ANGPTL8 の発現制御を担う重要な転写因子であることが示された。

SA は HNF4 α mRNA 発現には影響を及ぼさず、HNF4 α タンパクの発現量を減少させた。この減少は ANGPTL8 プロモーターへの HNF4 α の結合を低下させ、ANGPTL8 の遺伝子発現量を低下させた。それゆえ、SA は HNF4 α 遺伝子の転写や HNF4 α mRNA の安定性に影響するのではなく、HNF4 α タンパクの分解を促進することで抑制作用を発揮しているのではないかと考えられた。実際、HNF4 α は様々な翻訳後修飾を受け、その活性が制御される⁶⁷⁾。例えば、一酸化窒素は HNF4 α の DNA 結合ドメインのシステイン残基を修飾することで DNA 結合能を低下させること^{64,68)}、HNF4 α の転写活性ドメインの small ubiquitin-like modifier (SUMO) 修飾により HNF4 α の転写活性が向上すること⁶⁹⁾、などが報告されている。また、AMP-activated protein kinase (AMPK) による HNF4 α のリン酸化により、プロテアソーム非依存的に HNF4 α タンパクの分解が促進される^{70,71)}。現在、SA により HNF4 α タンパクの分解が誘導される機序は不明である。しかし、中鎖脂肪酸はミトコンドリアで β 酸化を受け細胞内の AMP/ATP 比が増大し、HNF4 α タンパクの分解に関与する AMPK を活性化することが報告されている⁷²⁾。また、RJ 脂肪酸の主要な脂肪酸である 10H2DA は骨格筋において AMPK を活性化する⁷³⁾。これら

の知見から、SA による HNF4 α タンパクの分解にも AMPK が関与していると推察される。その詳細な機序を理解するために、今後は、AMPK に着目した解析に取り組む必要がある。

以上の結果より、RJ 脂肪酸、特に SA は、1) ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞における ANGPTL8 の発現を抑制すること、2) この発現低下は SA による HNF4 α タンパク発現量の低下に起因することを明らかにした。ANGPTL8 の抑制は脂質代謝異常症に対する有望な治療アプローチであることから、本研究結果は、RJ による脂質代謝改善効果の作用機序の解明につながる有益な知見になると考える。

総 括

脂質代謝の異常は、脂質異常症、糖尿病などの生活習慣病のみならず、X-ALD などのペルオキシソーム不全が関与する疾患の発症とも密接に関与している。X-ALD では、全身性の VLCFA 蓄積と脱髄病巣における炎症性マクロファージの集積が認められることから、VLCFA とマクロファージの炎症応答との関連性が指摘されている^{5,6)}。しかし、マクロファージにおける VLCFA 産生の制御機構やその機能については不明な点が多いことから、本疾患を理解するうえで、マクロファージの活性化と VLCFA 合成酵素である ELOVL の発現との関連性を解明することは重要である。また、近年、生活習慣病のリスクとなる NAFLD が増加していることから⁴⁰⁾、NAFLD の背景にある脂質代謝異常の改善につながる予防・治療法の開発が求められている。本研究では、上述の 2 つの課題に取り組むために、1) マクロファージにおける ELOVL の発現制御機構、2) 脂質代謝異常症の創薬ターゲットとして注目されている ANGPTL8 の発現を低下させる機能性成分に関する研究を実施し、以下の知見を得た。

第 1 章では、細胞内の VLCFA がマクロファージの免疫応答を増強させることに注目し、活性化マクロファージにおける ELOVL ファミリーの機能と発現制御機構について解析を行った。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞から分化誘導した M1 様マクロファージで ELOVL7 の遺伝子発現量が亢進した。また、マクロファージの公共 RNA-seq データより抽出した ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群の Metascape を用いた転写因子の予測解析と THP-1 細胞を用いた生化学な解析から、M1 様マクロファージにおける ELOVL7 発現誘導は NF- κ B により制御されていることが明らかとなった。ELOVL7 と高い正の相関を示す遺伝子群の GO 解析

やその後のネットワーク図の作成により、IL-6 や IL-12/IL-23 p40 との関連性が示された。また、ELOVL7 ノックダウンは IL-6 や IL-12/IL-23 p40 の分泌を抑制した。さらに、pDC の RNA-seq 解析の結果、マクロファージと同様に、TLR7 や TLR9 のアゴニストにより活性化した pDC でも ELOVL7 の発現が亢進していた。これらの結果から、M1 様マクロファージや pDC おける炎症応答は、NF- κ B の活性化を介した ELOVL7 の発現誘導が部分的に関与していると考えられた。

第 2 章では、RJ による脂質代謝改善効果の作用メカニズムを解明するため、RJ 成分である中鎖脂肪酸が脂質代謝改善作用をもつことに注目し、その作用機序の解析を行った。RJ 脂肪酸である 10H2DA、10HDA、SA は、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞における ANGPTL8 の発現を抑制した。特に、SA が強く ANGPTL8 を抑制した。転写阻害剤 ActD と *ANGPTL8* プロモーターのレポータープラスミドを用いた解析から、SA による ANGPTL8 の抑制作用は転写レベルで制御されていること、*ANGPTL8* プロモーターの-262/-137 の領域が *ANGPTL8* の転写活性ならびに SA による転写の抑制に重要であることが明らかとなった。本領域には転写因子 HNF4 α の推定結合領域が存在していた。SA は、HNF4 α mRNA 発現量には影響を及ぼさなかったが、そのタンパク量を減少させた。また、-262/-137 の領域に存在する HNF4 α 推定結合部位への HNF4 α の結合が SA で抑制されることを ChIP 法とプルダウンアッセイで確認した。さらに、HNF4 α のノックダウンは、*ANGPTL8* のプロモーター活性を減弱し、その遺伝子発現量を抑制した。これらの結果から、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 細胞における RJ 脂肪酸、特に SA による ANGPTL8 の発現抑制作用は、SA が HNF4 α タンパク発現量の減少させることで発揮されることと考えられた。

以上、本研究により、マクロファージの免疫応答時に誘導される ELOVL7 の機

能と、RJ 含有脂肪酸による脂質代謝改善効果の作用機序について新知見を得ることができた。本研究の成果は、免疫細胞内における VLCFA の制御を標的とした創薬研究や、RJ に代表される中鎖脂肪酸を含む機能性健康食品の脂質代謝異常症への医療応用につながる有益なエビデンスになると考える。

謝 辞

本研究の遂行において終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学臨床薬剤学研究室、足立哲夫特命教授、原宏和教授、神谷哲朗准教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に際し御協力頂きました岐阜薬科大学臨床薬剤学研究室の諸氏に感謝いたします。

引用文献

- 1) Papackova Z, Cahova M. Fatty acid signaling: the new function of intracellular lipases. *Int J Mol Sci*, **16**, 3831-55 (2015)
- 2) Sassa T, Kihara A. Metabolism of very long-chain fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)*, **22**, 83-92 (2014)
- 3) Uchida Y. The role of fatty acid elongation in epidermal structure and function. *Dermatoendocrinol*, **3**, 65-9 (2011)
- 4) Agbaga MP, Brush RS, Mandal MNA, Henry K, Elliott MH, Anderson RE. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 12843-8 (2008)
- 5) Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP, Kishimoto Y. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology*, **31**, 1241-9 (1981)
- 6) Weinhofer I, Zierfuss B, Hametner S, Wagner M, Popitsch N, Machacek C, Bartolini B, Zlabinger G, Repic OA, Stockinger H, Köhler W, Höftberger R, Regelsberger G, Petter SF, Lassmann H, Berger J. Impaired plasticity of macrophages in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain*, **141**, 2329-42 (2018)
- 7) 厚生労働省 (2014) 「平成 26 年患者調査の概況」
- 8) Kawano Y, Cohen DE. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, **48**, 434-41 (2013)
- 9) Matos AFG, Júnior WSS, Valerio CM. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol Metab Syndr*, **12**, 60-79 (2020)
- 10) Kovrov O, Kristensen KK, Larsson E, Ploug M, Olivecrona G. On the mechanism

- of angiopoietin-like protein 8 for control of lipoprotein lipase activity. *J Lipid Res*, **60**, 783-93 (2019)
- 11) Lee YH, Lee SG, Lee CJ, Kim SH, Song YM, Yoon MR, Jeon BH, Lee JH, Lee BW, Kang ES, Lee HC, Cha BS. Association between betatrophin/ANGPTL8 and non-alcoholic fatty liver disease: animal and human studies. *Sci Rep*, **6**, 24013-25 (2016)
 - 12) Fu Z, Abou-Samra AB, Zhang R. A lipasin/Angptl8 monoclonal antibody lowers mouse serum triglycerides involving increased postprandial activity of the cardiac lipoprotein lipase. *Sci Rep*, **5**, 18502-10 (2015)
 - 13) Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, **8**, 958–69 (2008)
 - 14) Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, **11**, 889-96 (2010)
 - 15) Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol*, **32**, 227-55 (2014)
 - 16) Bridgwood C, Fearnley GW, Berekmeri A, Laws P, Macleod T, Ponnambalam S, Stacey M, Graham A, Wittmann M. IL-36 γ is a strong inducer of IL-23 in psoriatic cells and activates angiogenesis. *Front Immunol*, **9**, 200 (2018)
 - 17) Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci*, **10**, 520-9 (2014)
 - 18) Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*, **13**, 709-21 (2013)
 - 19) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*,

- 112**, 1796-808 (2003)
- 20) Poh AR, Ernst M. Targeting macrophages in cancer: from bench to bedside. *Front Oncol*, **8**, 49 (2018)
 - 21) Kanoh H, Nitta T, Go S, Inamori KI, Veillon L, Nihei W, Fujii M, Kabayama K, Shimoyama A, Fukase K, Ohto U, Shimizu T, Watanabe T, Shindo H, Aoki S, Sato K, Nagasaki M, Yatomi Y, Komura N, Ando H, Ishida H, Kiso M, Natori Y, Yoshimura Y, Zonca A, Cattaneo A, Letizia M, Ciampa M, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Suzuki A, Inokuchi JI. Homeostatic and pathogenic roles of GM3 ganglioside molecular species in TLR4 signaling in obesity. *EMBO J*, **39**, e101732 (2020)
 - 22) Yanagisawa N, Shimada K, Miyazaki T, Kume A, Kitamura Y, Sumiyoshi K, Kiyonagi T, Lesaki T, Inoue N, Daida H. Enhanced production of nitric oxide, reactive oxygen species, and pro-inflammatory cytokines in very long chain saturated fatty acid-accumulated macrophages. *Lipids Health Dis*, **7**, 48 (2008)
 - 23) Nugteren DH. The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*, **106**, 280-90 (1965)
 - 24) Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*, **45**, 237-49 (2006)
 - 25) Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*, **49**, 186-99 (2010)
 - 26) Talamonti E, Pauter AM, Asadi A, Fischer AW, Chiurchiù V, Jacobsson A. Impairment of systemic DHA synthesis affects macrophage plasticity and polarization: implications for DHA supplementation during inflammation. *Cell Mol Life Sci*, **74**,

- 2815-26 (2017)
- 27) Lu L, Wei R, Bhakta S, Waddell SJ, Boix E. Weighted gene co-expression network analysis identifies key modules and hub genes associated with mycobacterial infection of human macrophages. *Antibiotics (Basel)*, **10**, 97 (2021)
 - 28) A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/
 - 29) A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
 - 30) Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29**, 15-21 (2013)
 - 31) Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, **30**, 923-30 (2014)
 - 32) Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*, **14**, 219 (2013)
 - 33) Benesty J, Chen J, Huang Y, Cohen I. Pearson correlation coefficient. In: *Noise Reduction in Speech Processing. Springer Topics in Signal Processing*, Vol. 2. Berlin: Springer, 2009 DOI: 10.1007/978-3-642-00296-0_5
 - 34) Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*, **16**, 284-7 (2012)
 - 35) Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C,

- Chanda SK. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun*, **10**, 1523 (2019)
- 36) Miao X, Leng X, Zhang Q. The current state of nanoparticle-induced macrophage polarization and reprogramming research. *Int J Mol Sci*, **18**, 336 (2017)
- 37) Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev*, **19**, 3-19 (2008)
- 38) Shin D, Shin JY, McManus MT, Ptáček LJ, Fu YH. Dicer ablation in oligo dendrocytes provokes neuronal impairment in mice. *Ann Neurol*, **66**, 843-57 (2009)
- 39) Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*, **89**, 1-47 (2008)
- 40) Komeda T. Obesity and NASH in Japan. *Hepatol Res*, **33**, 83-6 (2005)
- 41) Gaggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. Non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. *Nutrients*, **5**, 1544-60 (2013)
- 42) Targher G, Byrne CD. Clinical Review: Nonalcoholic fatty liver disease: a novel cardiometabolic risk factor for type 2 diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*, **98**, 483-95 (2013)
- 43) Sumida Y, Niki E, Naito Y, Yoshikawa T. Involvement of free radicals and oxidative stress in NAFLD/NASH. *Free Radic Res*, **47**, 869-80 (2013)
- 44) Takaki A, Kawai D, Yamamoto K. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci*, **15**, 7352-79 (2014)

- 45) Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **10**, 656-65 (2013)
- 46) Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K. Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*, **4**, 88-92 (2013)
- 47) Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **5**, 4-9 (2014)
- 48) Tseng YH, Yeh YH, Chen WJ, Lin KH. Emerging regulation and function of betatrophin. *Int J Mol Sci*, **15**, 23640-57 (2014)
- 49) Zhu JZ, Yu CH, Li YM. Betatrophin provides a new insight into diabetes treatment and lipid metabolism (Review). *Biomed Rep*, **4**, 447-51 (2014)
- 50) R Zhang. The ANGPTL3-4-8 model, a molecular mechanism for triglyceride trafficking. *Open Biol*, **6**, 150272-82 (2016)
- 51) Wang Y, Quagliarini F, Gusarova V, Gromada J, Valenzuela DM, Cohen JC, Hobbs HH. Mice lacking ANGPTL8 (Betatrophin) manifest disrupted triglyceride metabolism without impaired glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 16109-14 (2013)
- 52) Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic Properties of Bioactive Compounds from Different Honeybee Products. *Front Pharmacol*, **8**, 412-31 (2017)
- 53) Guo H, Saiga A, Sato M, Miyazawa I, Shibata M, Takahata Y, Morimatsu F. Royal jelly supplementation improves lipoprotein metabolism in humans. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)*, **53**, 345-48 (2007)
- 54) Watadani R, Kotoh J, Sasaki D, Someya A, Matsumoto K, Maeda A. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a natural product, improves hyperglycemia and insulin resistance

- in obese/diabetic KK-Ay mice, but does not prevent obesity. *J Vet Med Sci*, **79**, 1596-602 (2017)
- 55) Iaconelli A, Gastaldelli A, Chiellini C, Gniuli D, Favuzzi A, Binnert C, Macé K, Mingrone G. Effect of oral sebacic acid on postprandial glycemia, insulinemia, and glucose rate of appearance in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, **33**, 2327-32 (2010)
- 56) Membrez M, Chou CJ, Raymond F, Mansourian R, Moser M, Monnard I, Ammon-Zufferey C, Mace K, Mingrone G, Binnert C. Six weeks' sebacic acid supplementation improves fasting plasma glucose, HbA1c and glucose tolerance in db/db mice. *Diabetes Obes Metab*, **12**, 1120-26 (2010)
- 57) Mondragon JAC, Puig RR, Rauluseviciute I, Lemma RB, Turchi L, Mathieu RB, Lucas J, Boddie P, Khan A, Pérez NM, Fornes O, Leung TY, Aguirre A, Hammal F, Schmelter D, Baranasic D, Ballester B, Sandelin A, Lenhard B, Vandepoele K, Wasserman WW, Parcy F, Mathelier A. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, **50**, D165-75 (2022)
- 58) Hong YH, Varanasi US, Yang W, Leff T. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 α transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem*, **278**, 27495-501 (2003)
- 59) Sugiyama T, Takahashi K, Kuzumaki A, Tokoro S, Neri P, Mori H. Inhibitory mechanism of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid (royal jelly acid) against lipopolysaccharide- and interferon- β -induced nitric oxide production. *Inflammation*, **36**, 372-8 (2013)

- 60) Makino J, Ogasawara R, Kamiya T, Hara H, Mitsugi Y, Yamaguchi E, Itoh A, Adachi T. Royal Jelly Constituents Increase the Expression of Extracellular Superoxide Dismutase through Histone Acetylation in Monocytic THP-1 Cells. *J Nat Prod*, **79**, 1137-43 (2016)
- 61) Jiao X, Yang Y, Li L, Yu H, Yang Y, Li J, Du Y, Zhang J, Hu C, Qin Y. Angiopoietin-like protein 8 accelerates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis*, **307**, 63-71 (2020)
- 62) Izumi R, Kusakabe T, Noguchi M, Iwakura H, Tanaka T, Miyazawa T, Aotani D, Hosoda K, Kangawa K, Nakao K. CRISPR/Cas9-mediated Angptl8 knockout suppresses plasma triglyceride concentrations and adiposity in rats. *J Lipid Res*, **59**, 1575-85 (2018)
- 63) Dang F, Wu R, Wang P, Wu Y, Azam MS, Xu Q, Chen Y, Liu Y. Fasting and feeding signals control the oscillatory expression of ANGPTL8 to modulate lipid metabolism. *Sci Rep*, **6**, 36926-35 (2016)
- 64) Hara H, Adachi T. Contribution of hepatocyte nuclear factor-4 to down-regulation of CYP2D6 gene expression by nitric oxide. *Mol Pharmacol*, **61**, 194-200 (2002)
- 65) Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol*, **21**, 1393-403 (2001)
- 66) Wang Z, Bishop EP, Burke PA. Expression profile analysis of the inflammatory response regulated by hepatocyte nuclear factor 4a. *BMC Genomics*, **12**, 128 (2011)

- 67) Yokoyama A, Katsura S, Ito R, Hashiba W, Sekine H, Fujiki R, Kato S. Multiple post-translational modifications in hepatocyte nuclear factor 4 α . *Biochem Biophys Res Commun*, **410**, 749-53 (2011)
- 68) Lucas SD, López-Alcorocho JM, Bartolomé J, Carreno V. Nitric oxide and TGF-beta1 inhibit HNF-4alpha function in HEPG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **321**, 688-94 (2004)
- 69) Zhou W, Hannoun Z, Jaffray E, Medine CN, Black JR, Greenhough S, Zhu L, Ross JA, Forbes S, Wilmot I, Iredale JP, Hay RT, Hay DC. SUMOylation of HNF4 α regulates protein stability and hepatocyte function. *J Cell Sci*, **125**, 3630-5 (2012)
- 70) Inoue J, Ikeda S, Kanayama T, Sato R. The flavonoid derivative 4'-nitro-6-hydroxyflavone suppresses the activity of HNF4 α and stimulates the degradation of HNF4 α protein through the activation of AMPK. *Biosci Biotechnol Biochem*, **81**, 1548-52 (2017)
- 71) Hong YH, Varanasi US, Yang W, Leff T. AMP-activated protein kinase regulates HNF4alpha transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem*, **278**, 27495-501 (2003)
- 72) Huang L, Gao L, Chen C. Role of Medium-Chain Fatty Acids in Healthy Metabolism: A Clinical Perspective. *Trends Endocrinol Metab*, **32**, 351-66 (2021)
- 73) Takikawa M, Kumagai A, Hirata H, Soga M, Yamashita Y, Ueda M, Ashida H, Tsuda T. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a unique medium-chain fatty acid, activates 5'-AMP-activated protein kinase in L6 myotubes and mice. *Mol Nutr Food Res*, **10**, 1794-802 (2013)

略 語

10H2DA	10-hydroxy-2-decenoic acid
10HDA	10-hydroxydecanoic acid
ABCD1	ATP Binding Cassette Subfamily D Member 1
ActD	actinomycin D
AMPK	AMP-dependent kinase
ANGPTL8	angiopoietin-like protein 8
BAY	BAY11-7082
BP	biological process
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CpG	CpG-C ODN 2395
DEG	differentially expressed genes
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DTT	dithiothreitol
ELOVL	elongation of very long chain fatty acids
FCS	foetal calf serum
Flu	fludarabine phosphate
GEO	Gene Expression Omnibus
GO	gene ontology
HNF4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α
HRP	horseradish peroxidase
IFN	interferon

IgG	immunoglobulin G
IMQ	imiquimod
LPL	lipoprotein lipase
LPS	lipopolysaccharide
LXR	liver X receptor
NAFL	nonalcoholic fatty liver
NAFLD	nonalcoholic fatty liver disease
NASH	nonalcoholic steatohepatitis
PBS	phosphate-buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
RJ	royal jelly
RT-qPCR	real-time reverse transcription-polymerase chain reaction
SA	sebacic acid
SDS	sodium dodecyl sulfate
SREBP	sterol regulatory element binding protein
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TG	triglyceride
TLR	toll-like receptor
VLCFA	very long-chain fatty acids
X-ALD	x-linked adrenoleukodystrop