

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08985

研究課題名(和文)細胞内リパーゼの脂肪性肝炎と肝癌の発症・進展における生理学的意義の解明

研究課題名(英文)The physiological roles of intracellular lipases in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver diseases

研究代表者

岡崎 佐智子 (OKAZAKI, Sachiko)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30648720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝炎、肝硬変、肝癌の発症・進展に寄与する因子として、脂肪肝に蓄積する脂質の役割が注目されている。我々は細胞内中性脂質水解酵素に着目して研究をすすめており、これまでにホルモン感受性リパーゼ(HSL)とその代謝産物である遊離コレステロール(FC)が肝炎を惹起することを示唆する結果を得た。HSLとその他の細胞内リパーゼ群のアデノウイルスを用いたin vivoでの肝臓過剰発現から、リパーゼとその代謝産物FCによる肝細胞毒性はHSLに特有の現象である可能性が示唆された。さらに、これらのリパーゼの欠損マウスを用いた研究を進展させ、脂肪肝の病態進展におけるリパーゼの意義を解明し新規治療標的の同定を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence has suggested that hepatic fat accumulation plays a key role in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD) such as hepatitis, liver cirrhosis, and liver cancer. Lipases, which hydrolyze neutral lipids such as triglycerides and esterified cholesterol, may modulate the progression of NAFLD by regulating lipid levels in liver. We found that adenovirus-mediated overexpression of hormone-sensitive lipase (HSL) in diet-induced fatty liver triggers hepatic inflammation, most likely by increasing the levels of free cholesterol in the liver. Overexpression studies using adenovirus carrying other neutral lipases suggested that this response is unique to HSL. Further studies are ongoing in our laboratory to elucidate the underlying molecular mechanisms by using mice deficient in these lipases, which may lead to the identification of a novel therapeutic target for NAFLD.

研究分野：医歯薬学

キーワード：リパーゼ コレステロール 非アルコール性脂肪性肝炎

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝は、肝炎、肝硬変、肝癌の発症・進展に寄与する病態として、近年注目されている。脂肪肝は成人の20～30%に認められる高頻度な病態であり、脂肪肝に起因する一連の病態は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) と総称されるが、脂肪肝の全てが肝炎、肝硬変、肝癌へと進展するわけではない。単純性脂肪肝 (simple steatosis) にとどまるものがある一方で、一部が炎症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) となる。NASH からの肝癌も近年増加傾向にある。では、どのようなタイプの脂肪肝において、あるいは脂肪肝にどのような遺伝因子や環境因子が加わると、肝炎、肝硬変、肝癌へと進展するのか？

近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) から、この過程における脂質代謝の重要性が改めて注目されている。脂質代謝系酵素である patatin-like phospholipase domain containing 3 (Pnpla3) の変異 (rs738409, I148M) が NASH の発症・進展と関連することが示され、注目されている (Romeo S et al. *Nat Genet* 40:1461-5, 2008)。Pnpla3 の酵素活性自体は、中性脂肪 (TG) 水解酵素 (TGH) であるとの報告もある一方で、lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAAT) であるとの報告もあり、詳細な分子機序は完全に明らかではないが、NASH の病態における脂質と脂質代謝酵素の重要な役割が示唆されている。

申請者はこれまで、細胞内の中性脂質水解酵素 (リパーゼ) の研究を行ってきた。中性脂質とは、コレステロールエステル (CE) や TG のような極性のない親油性の脂質であり、細胞内には油滴の形で蓄積している。これを水解しているのがリパーゼである。NAFLD の脂肪肝では、病理所見上、細胞内に大滴性油滴を認め、この油滴内には TG や CE などの中性脂質が蓄積していることを考えると、リパーゼは、NAFLD から NASH への進展、NASH からの肝癌の発症に、重要な役割を果たしている可能性がある (図1)。本研究課題は、このリパーゼの肝炎や肝癌における生理学的意義を解明することを目的としている。

細胞内中性脂質水解酵素は、従来からホルモン感受性リパーゼ (hormone-sensitive lipase (HSL) が主要と考えられてきた。HSL は中性 pH (neutral pH) 領域で活性を持ち、TG、CE の水解活性だけでなく、レチニルエステル (RE) やジアシルグリセロール (DG)、モノアシルグリセロール (MG) の水解活性も有する多機能酵素である。申請者らは、HSL 欠損マウスの樹立と解析から、HSL 以外のリ

パーゼの重要性も明らかにしてきた (Osuga J et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:787-92, 2000)。実際に、申請者らにより、新規中性 CE 水解酵素 (neutral CE hydrolase (nCEH) として NCEH1 (Okazaki H et al. *J Biol Chem* 283:33357-64, 2008)、新規 TG 水解酵素 (TGH) として TGH-2 が同定され (Okazaki H et al. *Diabetes* 55:2091-7, 2006)、海外のグループからは、新規 TGH として脂肪組織 TG リパーゼ (adipose triglyceride lipase (ATGL) が同定された (Zimmermann R et al. *Science* 306:1383-6, 2004)。

これらのリパーゼ群のうち、肝臓においては、TGH としては ATGL と HSL が主要 (それぞれ内因性活性の 33%、10～20%に寄与)、nCEH としては HSL と NCEH1 が主要であること (それぞれ内因性活性の 50～80%、20%に寄与) が明らかとなっている (Sekiya M et al. *J Lipid Res* 49:1829-38, 2008; Ohta K et al. *Biochem Biophys Res Commun* 404:254-60, 2011)。実際にこれらの研究において、リパーゼ欠損マウスでは肝臓内コレステロール含量が増加することからもその生理学的重要性は強く示唆される。

これらの細胞内リパーゼの脂肪肝における生理学的意義を明らかにするため、申請者はまず多機能酵素 HSL に着目し、その肝臓での過剰発現系での解析を行った。様々な食餌性脂肪肝において、アデノウイルスを用いて肝臓で HSL を過剰発現した。すると、TG が主として蓄積するシクロオース食による脂肪肝では、肝臓での HSL 過剰発現により肝炎を来さず脂肪肝は改善 (肝臓内 TG 含量は正常化) した。ところが、驚くべきことに、CE が主として蓄積する Paigen 食による脂肪肝では、肝臓 HSL の過剰発現により、脂肪肝は改善 (肝臓内 CE 含量が正常化) したが、肝臓内遊離コレステロール (FC) 含量の著増とともに致死的肝炎を来した (図2)。

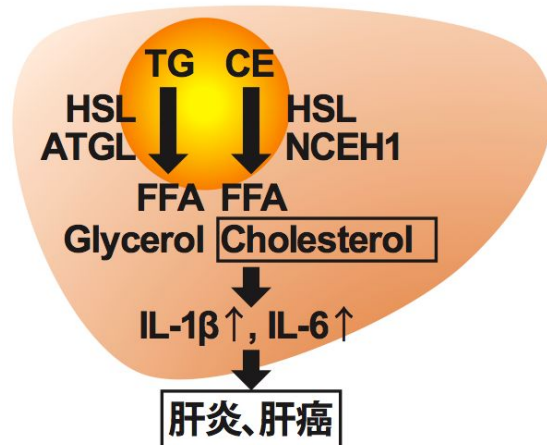


図1. 細胞内リパーゼと脂肪性肝炎、肝癌

これは、CE の水解による FC 増加が肝炎を引き起こすことが *in vivo* で示唆された初めての知見である。さらに申請者は、HSL 過剰発現による FC 増加に伴って、TNF- α に変化は来さない一方で IL-1 β と IL-6 の mRNA 発現が著増することを見出した (図 2)。FC による細胞毒性は、従来は、小胞体 (ER) への FC 蓄積による ER ストレス (Feng B et al. *Nat Cell Biol* 5:781-92, 2003) ミトコンドリアへの FC 蓄積によるミトコンドリア障害とアポトーシス (Mari M et al. *Cell Metabolism* 4:185-98, 2006) などが重要とされてきたが、これらの結果から、IL-1 β /IL-6 経路あるいはインフラマソームの活性化が肝炎惹起に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

FC による肝炎は、病態生理学的にも重要な現象である。1) 単純性脂肪肝に比し NASH では肝臓内 FC 含量が増加する (Puri P et al. *Hepatology* 46:1081-90, 2007) 2) NASH では肝細胞内の FC 結晶と死肝細胞を取り囲む Kupffer 細胞の crown-like structure を認める (Ioannou GN et al. *J Lipid Res* 54:1326-34, 2013)、3) 脂肪肝に炎症刺激 (TNF- α や LPS など) を加えても、TG 蓄積性脂肪肝では肝炎とならないが、CE 蓄積性脂肪肝 (Paigen 食) では肝細胞内遊離コレステロールの増加とともに劇症肝炎を来す (Mari M et al. *Cell Metabolism* 4:185-98, 2006) など、FC と肝炎の関係について、興味深い報告がなされている。

さらに、脂肪肝は肝炎だけでなく、肝癌の発生にも重要であることが最近分かってきた (Yoshimoto S et al. *Nature* 499:97-101, 2013)。化学発がん物質 DMBA による肝癌モデルにおいて、高脂肪食 (HFD) を投与したマウスは肝癌が多発するが、普通食下では肝癌を来さない。この際に肝がん細胞に脂質が著しく蓄積していたこと、IL-1 β や SASP 因子 (IL-6 など) の肝星細胞からの分泌が関与して発癌したことが報告されている。脂肪肝の肝癌における役割が示唆されるだけでな

く、リパーゼが IL-1 β と IL-6 の分泌に深く関わる申請者のデータから、リパーゼの肝癌における役割も推察される。

以上、申請者独自の知見、および、国内外の知見から、FC やリパーゼの肝炎や肝癌における生理学的意義の解明は、最先端の重要な研究課題と考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題の第一の目的は、リパーゼの脂肪性肝炎における生理学的意義の解明、FC による肝炎の分子機序の解明である。予備的知見からは、FC は IL-1 β /インフラマソーム/IL-6 活性化を介して肝炎を惹起する可能性が示唆された。FC はマクロファージ (M ϕ) において、コレステロール結晶の形でインフラマソームの活性化をもたらすことが知られているが (Duewell P et al. *Nature* 464:1357-61, 2010)、肝臓ではどのメディエーター細胞 (Kupffer 細胞、肝星細胞、あるいは肝前駆細胞 (HPC) (Friedman SL et al. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:71-72, 2013) など) の IL-1 β /インフラマソーム/IL-6 が活性化されるのかはこれまで明らかではない。本研究の第二の目的は、リパーゼや FC による肝炎の肝癌における生理学的意義を明らかにすることである。肝癌の *in vivo* モデルとしては DMBA による肝癌発生モデルなどが報告されているが、申請者独自のリパーゼの過剰発現モデル、リパーゼの欠損マウスモデルを用いて、肝癌発生におけるリパーゼの生理的意義を解明する。FC 誘発肝炎については、分子シグナリング機構の同定 (IL-1 β /インフラマソーム/IL-6 経路、TLR4 経路の寄与の解明) FC 誘発肝炎のメディエーター細胞の同定 (Kupffer 細胞、肝星細胞、その他の骨髄由来細胞、HPC の寄与の解明) などは重要な未解決課題となっている。本研究では、申請者らのリパーゼ過剰発現モデル、リパーゼ欠損モデルを用いて、これらのリパーゼの病態生理学的意義と分子メカニズムの解明を目指した。

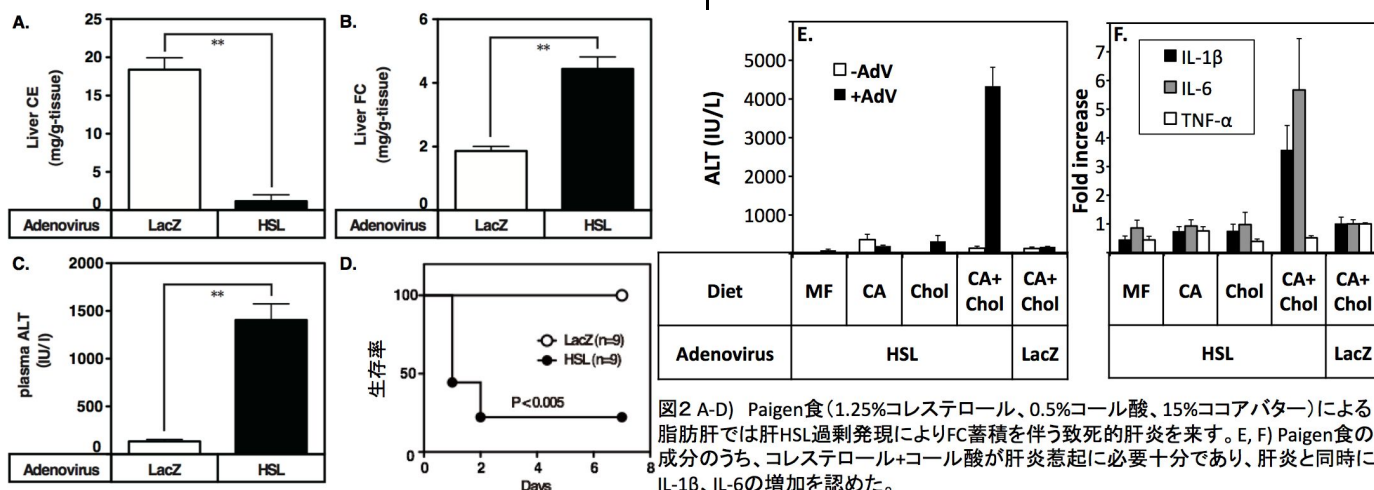


図2 A-D) Paigen食 (1.25%コレステロール、0.5%コール酸、15%ココアバター) による脂肪肝では肝HSL過剰発現によりFC蓄積を伴う致死的肝炎を来す。E, F) Paigen食の成分のうち、コレステロール+コール酸が肝炎惹起に必要十分であり、肝炎と同時に IL-1 β 、IL-6の増加を認めた。

3. 研究の方法

リパーゼとその代謝産物である遊離コレステロールの脂肪性肝炎、肝臓における生理学的意義を解明するため、リパーゼ過剰発現モデル、リパーゼ欠損モデルを用いて研究を行った。リパーゼ過剰発現モデルとしては、従来より検討してきた HSL に加えて、その他リパーゼ群（脂肪細胞 TG リパーゼ (ATGL)、中性 CE 水解酵素 1 (NCEH1)、TG 水解酵素-1 (TGH-1)、TGH-2) の組み替えアデノウィルスを作成し、マウスに *in vivo* で投与することにより、肝臓におけるリパーゼ過剰発現が脂肪肝に与える影響を解析した。リパーゼ欠損モデルとしては、HSL、および NCEH-1 の単独欠損マウスや両欠損マウスを用いて、これらの欠損が脂肪肝や肝臓発生に与える影響を *in vivo* で解析した。

血中脂質測定、肝酵素などの生化学的測定、組織中脂質含量測定、リパーゼなどの蛋白発現のウェスタンブロット解析、組織中遺伝子発現の定量的 PCR による解析、細胞内 TG 水解酵素活性・CE 水解酵素活性の測定、上述の組み替えアデノウィルスの作成、リパーゼ欠損マウスを用いた *in vivo* 実験は、当研究室において確立されている既報のプロトコルに従って行なった (Osuga J et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:787-92, 2000; Okazaki H et al. *J Biol Chem* 283:33357-64, 2008; Sekiya M et al. *Cell Metab* 10:219-28, 2009; Takanashi M et al., *J Atheroscler Thromb* 24:1105-1116, 2017)。

全ての動物実験は倫理委員会の承認を経て東京大学動物実験実施規則に基づき実施されている。組み替えアデノウィルスを用いた実験は東京大学研究用微生物安全管理規則を遵守して実施されている。

4. 研究成果

HSL およびその他リパーゼ群 (脂肪細胞 TG リパーゼ (ATGL)、中性 CE 水解酵素 1 (NCEH1)、TG 水解酵素-1 (TGH-1)、TGH-2) の組み替えアデノウィルスを用いた *in vivo* 肝臓での過剰発現の結果、リパーゼ過剰発現による致死的肝炎は HSL 過剰発現において特に顕著に認められたことから、リパーゼ過剰発現による肝細胞毒性は HSL に特有の現象である可能性が示唆された。また、組織中の脂質含量測定の結果から、HSL による脂質水解の代謝産物 (遊離コレステロールなど) が脂肪性肝炎を惹起している可能性が示唆された。さらに、リパーゼ欠損マウス (HSL 欠損マウス、NCEH1 欠損マウス、HSL;NCEH1 両欠損マウス) を用いた解析からは、高炭水化物食などの脂肪肝をきたす食餌の負荷により、明らかな腫瘍の発生は今回

検討した条件の範囲では認めなかったが、肝炎が惹起される可能性が示唆された。リパーゼの過剰発現や欠損がどのようなメカニズムで脂肪性肝炎を惹起するのか、これらの *in vivo* でのリパーゼ過剰発現モデル、リパーゼ欠損モデルを用いて、今後さらに検討する予定である。特に、FC 誘発肝炎の分子シグナリング機構 (IL-1 β /インフラマソーム/IL-6 経路、TLR4 経路の寄与の解明)、FC 誘発肝炎のメディエーター細胞 (Kupffer 細胞、肝星細胞、その他の骨髄由来細胞、HPC の寄与の可能性) についてはまだ未解明である。脂肪肝の病態進展におけるリパーゼの意義とその分子メカニズムを解明することにより、脂肪性肝炎や肝臓の新たな制御標的の同定を目指し、研究を進めている。

特に HSL については、その欠損症がヒトで見出され、糖尿病と脂肪肝のリスクとなることが近年報告されており、リパーゼの欠損は、ヒトにおいても重要な生理学的意義を持つことが示唆されている (Albert JS et al. *N Engl J Med* 370(24):2307-2315, 2014)。脂肪肝とそれに伴う肝臓は、メタボリックシンドロームに伴う脂肪肝の増加を背景に、その原因究明が特に期待されている喫緊の課題であり、ヒトにおける重要性が示唆されている HSL に焦点をあてた本研究課題をさらに発展させることにより、これらの疾患の新たな治療法開発につなげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔その他〕 <http://lipid.umin.ne.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡崎 佐智子 (OKAZAKI, Sachiko)
東京大学・保健・健康推進本部・助教
研究者番号: 30648720

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

岡崎 啓明 (OKAZAKI, Hiroaki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80610211

高梨 幹生 (TAKANASHI, Mikio)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70610799

高瀬 暁 (TAKASE, Satoru)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80508094

久保田 みどり (KUBOTA, Midori)
研究者番号: 20383804

高橋 将文 (TAKAHASHI, Masafumi)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40296108

(4) 研究協力者 なし