

令和元年6月7日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09368

研究課題名(和文) 脂肪肝炎におけるHSP110ファミリーの脂質、糖代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of HSP110 family, Apg-2 in NASH-related hepatic lipid and glucose metabolism.

研究代表者

山口 寛二 (YAMAGUCHI, KANJI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50381950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：分子シャペロンはフォールディング作用で細胞内のたんぱく質の恒常性維持を担う。一方、細胞ストレスで異常蛋白が処理できずに蓄積しアポトーシスへ向かう細胞にとっては保護的な作用を持つ。今回我々は、HSP70と構造的に相同性の高い分子シャペロンApg-2が、LKB1-AMPKシグナルを抑制することで、脂肪酸酸化を抑制、脂質合成系を賦活化させ脂肪肝を促進させることをマウスモデルで見出した。機序としては、シャペロン依存性のユビキチンリガーゼCHIPによってLKB1の分解がApg-2存在下に促進していた。これらの知見は長期的な経過を辿る脂肪肝炎の病態把握だけでなく、治療戦略にとって重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子シャペロンが細胞死を迎えるべき細胞を救済するだけでなく、脂質や糖代謝に影響することで慢性炎症や発癌を助長していると考えられた。本来、いかに栄養を貯蓄し、効率よく使用することが生存に重要であった細胞にとって、近年の過栄養状態は想定されない状況と考えられる。この中で、分子シャペロンApg-2がLKB1の分解を通じてエネルギー貯蓄に重要であるという本研究の結果は、脂肪肝炎の病態解明に新たな知見となり得る。HSP70とHSP110の脂肪肝炎における個々の役割を明らかにすることで、慢性肝炎から肝硬変、肝がんへ至る長期的な病期に応じた治療法の開発に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hsp110 family, Apg-2 has a chaperone-like activity similar to Hsp70. However, the physiological and pathological functions of Apg-2 in NAFLD remain unclear. We studied HFD-induced liver steatosis in Apg-2-deficient mice for clarifying the role of Apg-2 in NAFLD. HFD for 12 weeks induced obesity and liver steatosis in wild-type mice but not in Apg-2-deficient mice. HFD-induced elevation of serum t-cholesterol and ALT levels were improved with enhanced phosphorylation levels of AMPK in Apg-2-deficient mice. Hepatic mRNA levels of SREBP1c, FAS, and ACC were also significantly decreased compared with wild-type mice. Liver-specific overexpression of Apg-2 in Apg-2-deficient mice restored obesity and liver steatosis by decreasing phosphorylated AMPK and promoting LKB1 ubiquitination and degradation. Hepatic Apg-2 expression promotes liver steatosis via AMPK signaling inhibition, suggesting that the regulation of Apg-2 activities is a therapeutic target for NAFLD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：脂肪肝炎 分子シャペロン LKB1 HSP110 Apg-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

分子シャペロンの作用は異常蛋白質をフォールディングし正常化するだけでなく、複合体形成、輸送、リフォールディング、脱凝集など多岐にわたり、蛋白質の品質管理を担っている。これらの機能は生命活動において必須事項であり、分子シャペロンの異常は、細胞の恒常性維持に関わる蛋白質の機能不全を引き起こし、代謝異常、発癌、神経変性疾患、心血管障害などの要因となる。このような分子シャペロンによる蛋白の修復作用以外に、異常タンパク質の処理のためにシャペロンシステムとユビキチン・プロテアソームシステムが協調して働くことが解明されつつある。分子シャペロンによる修復が不可能なタンパク質は小胞体から細胞質に輸送され、分子シャペロンと複合体を形成し品質管理ユビキチンリガーゼとして働く C-terminus of Hsc70 interacting protein (CHIP) によりユビキチン化され、プロテアソームによって分解される。ユビキチン-プロテアソーム系は CD8 陽性 T 細胞の抗原提示にも関与しており、細胞内由来蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系により短いペプチド断片へと分解、小胞体(ER)上の Transporter associated with antigen processing を介して ER 内に取り込み後に MHC class I 分子と会合し、細胞表面上に輸送されて T 細胞エピトープとなる。さらに近年になって、細胞内のもう一つの大規模タンパク質分解系であるオートファジーがユビキチン化蛋白質の除去に重要な役割を果たしていることが報告された(Dong S. et al., 2013 Cell Metab)。我々が以前から注目している Apg-1、Apg-2、HSP110/105、GRP (glucose-regulated protein)170 の 4 種からなる HSP110 ファミリーは変性蛋白の凝集を抑制だけでなく、HSP70 シャペロン系のヌクレオチド交換因子として機能することが明らかとなってきた。また、アポトーシスに対し細胞種によって正反対の作用、即ち胎児細胞においては促進的に、神経細胞や癌細胞においては抑制的に作用することが報告されている。特に、精子形成に重要な Apg-2 は、肝癌組織由来の subtracted cDNA library から肝細胞癌に高頻度の高発現することが同定されており、我々が作成した Apg-2 のノックアウトマウスの検討では、ジエチルニトロサミン誘発性の肝発癌や高脂肪食に対する脂肪肝進展に抑制的であることを確認した。分子シャペロンが病態悪化に関与するという一見すると矛盾したこの作用は、ストレス下にある細胞にとっては細胞死からの回避、生存の獲得という面では生物学的には合理的な機能と考えられる。実際に HSP70 は早期肝がんのマーカーとして確立されており、HSP の抗アポトーシス作用が注目されている。特に HSP70 は抗アポトーシス作用を介した発癌作用が証明されており、分子マーカーとして使用されている(Chuma M. et al., 2003 Hepatology)。以上から、HSP の個別の役割の検討が重要であり、これらの分子に注目することが長期的な治療戦略に繋がる点で意義深い。脂肪肝炎・肝硬変～肝発癌の阻止は今後の臨床上重要な課題である。

## 2. 研究の目的

我々は、HSP70 と共役して働く HSP110 ファミリーに注目し、特に精子形成に重要な ATP and peptide-binding protein in germ cell 2(Apg-2)がヒト肝癌で高発現していることを示した(Gotoh. et al., 2007 FEBS lett.)。次に Apg-2 ノックアウトマウスが肝発癌や高脂肪食による脂肪肝形成に抑制的であることを確認した。分子シャペロンが細胞死を迎えるべき細胞を救済するだけでなく、脂質や糖代謝に影響することで慢性炎症や発癌に関与していると考えられ、本研究では近年増加傾向である脂肪肝炎の病態解明をテーマに HSP110 ファミリーの役割を代謝異常の視点から検討することを目的とした。マウスモデル、培養細胞株を用いて HSP ファミリーの中で HSP110、Apg-1、Apg-2 に注目し糖代謝、脂質代謝の主要シグナルにおける、凝集抑制作用、HSP70 系との核酸交換因子作用、ユビキチン化プロテアソームシステムの検

討を行うことで HSP110 ファミリーのターゲット蛋白、ターゲットシグナルを同定する。また、肝生検で得られた脂肪肝炎の組織における Apg-1, 2 及び HSP110 の発現を免疫組織化学的に検討し、脂肪化、炎症、線維化と臨床パラメーターとの関連性を検討する。以上の研究により、HSP70 と HSP110 の脂肪肝炎から肝がんに至る経過の中での個々の役割が明らかとなり、長期的な治療戦略の中で、慢性肝疾患としての脂肪肝炎の時相に応じた治療法の開発を目指す。

### 3 . 研究の方法

概要：

- 1) ヒト肝癌細胞株、マウス肝細胞株、マウス初代培養肝細胞を用い、脂肪酸負荷、トニカマイシンによる ER ストレス誘導、低酸素、飢餓条件などのストレス環境で、Apg-1,2 及び HSP110 の発現を検討する。
- 2) ヒト脂肪肝炎の肝生検組織を用いて、Apg-1, 2 及び HSP110 の発現パターンと脂肪化、炎症、線維化、臨床パラメーターとの比較検討を行うことで、Apg-1, 2 及び HSP110 のヒト NASH における発現意義を検討する。
- 3) 野生型、Apg-1, 2 のノックアウトマウスに脂肪肝炎を食餌性に誘導し、Apg-1, 2 及び HSP110 の発現と脂肪肝炎の誘導について検討する
- 4) Apg-1,2 ノックアウトマウスから肝細胞の初代培養を行い、レンチウイルスを用いて Apg-1,2 を強制発現させ、1) の検討を確認する。

方法の詳細：

- 1) ヒト肝癌細胞株、マウス肝細胞株、マウス初代培養肝細胞を用いた、HSP110 ファミリーの機能解析

ヒト肝細胞癌株の中で比較的分化度の高い Huh-7, PLC/PR5 と分化度の低い HLE、肝芽腫由来で Wt の P53 機能を有する HepG2 細胞、Hep3B 細胞、マウス肝細胞株 AML-12、マウス初代培養肝細胞を用いて実験を行う。HSP110, Apg-1, Apg-2 のサイレンシングは SiRNA のトランスフェクションによる方法を用いる。コントロールとサイレンシング群から得られた mRNA から cDNA を作成し、糖代謝、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現解析を行う。得られた結果から、HSP110, Apg-1, Apg-2 の変化に連動するシグナルを抽出し、その系に関わるドライバー遺伝子、転写因子を推定する。HSP110 ファミリーはストレスで誘導される HSF1 転写因子で誘導されることから、ストレス下でも同様の実験を行う。現段階では脂肪肝炎を推定してパルミチン酸負荷モデル、肝脂肪化による肝内の虚血、循環不全を推定して酸素 1 or 2% の低酸素モデル、ER ストレスを誘導するトニカマイシン投与モデルを作成する。特に既報の HSF1 ノックアウトマウス、我々が以前より検討中の Apg-2 ノックアウトマウスでは脂肪肝に抵抗性を示す事実があり、上記の肝内の脂肪化を助長するモデルでの検討を HSP70 の動態を確認しながら行う。さらにシャペロンによるユビキチン - プロテアソーム系、オートファジー系の修飾に注目するためにユビキチン化蛋白を免疫沈降し、候補の転写因子でウエスタンブロットを行い、HSP110 ファミリーのユビキチン化に与える影響を検討する。

- 2) ヒト脂肪肝炎の肝組織における HSP110 ファミリー蛋白の発現の検討

診断目的に行った肝生検で脂肪肝炎と診断された患者の肝組織を用いて以下の検討を行う。検体は平成 28 年度 ~ 29 年度にかけて採取したものおよび保存していたものを使用する。検体より mRNA を抽出し cDNA を作成し Real-Time PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行う。また HSP110, Apg-1, Apg-2 の免疫組織学的検討を行い、蛋白レベルでの発現解析を行う。さらに先の invitro 解析で候補に挙げたシグナルの主要因子についても同様に mRNA レベル及び蛋白レベルでの発

現解析を行う。得られた結果と、臨床パラメーターを比較し肝脂肪化、炎症、線維化の程度 HSP110 ファミリーの発現との関連について統計学的解析を行う。

3) 高脂肪高コレステロール食によるマウス NASH モデルにおいて HSP110 ファミリーの動態を検討する。

高脂肪高コレステロール食(脂肪 60%, コレステロール 1.25%)を 2 週、8 週、12 週、24 週間投与することでマウス脂肪肝モデルを作成し経時的な HSP110 ファミリーの発現動態を検討する。これらの脂肪肝モデルでは ER ストレス応答として転写因子 HSF1 が誘導され HSP 蛋白の発現が亢進する。脂肪肝の形成段階における HSP70 を初めとする他の HSP 蛋白と HSP110 ファミリーの間を普通食投与のコントロールモデルと比較検討する。Apg-1,2 のノックアウトマウスにおいて同様に脂肪肝を誘導し脂質代謝、脂肪酸酸化、糖代謝遺伝子の変化を検討する。

4) マウス肝細胞の初代培養

Apg-2 を初めとした HSP110 ファミリーは肝脂肪化を助長する可能性が示唆される。初代培養肝細胞で 1) の検討、AMPK, PPAR, PGC-1, HSP70 の発現動態を検討する。

#### 4. 研究成果

1) ヒト肝細胞癌株 Hep3B, HepG2, Huh-7, PLC/PR5, HLE 細胞、マウス肝細胞株 AML-12、マウス初代培養肝細胞を用いて実験を行った結果、HSP110, Apg-1, Apg-2 のサイレンシングにより細胞増殖の抑制が確認されたが、低グルコースメディウムや serum starvation などの条件下に限定された。パルミチン酸負荷や、低酸素モデル、ER ストレスを誘導するトニカマイシン投与モデルでは条件の影響が強いせいか明らかな差はみられなかった。Apg-1 ではなく、Apg-2 の発現を SiRNA でサイレンシングした際に AMPK のシグナルが活性化していたため、LKB1 の発現量をウエスタンブロットで定量したところ発現の上昇が確認された。リアルタイム PCR 法で mRNA の発現レベルを定量したところ、LKB1 の発現量には差がなく、転写ではなく、翻訳後修飾に関与していることが示唆された。HSP70 はシャペロン依存性の E3 である CHIP を介して LKB1 をユビキチン化しプロテアソームで分解することが知られており、HSP70 と構造的に相同性の高い HSP110 ファミリー、Apg-2 について検討したところ、Apg-2 は HSP70, CHIP, LKB1 と複合体を形成することが分かった。Apg-2 が HSP70 による LKB1 の分解を促進させることが分かった。この作用により AMPK を抑制し肝臓においては脂肪酸酸化の抑制、脂質合成系遺伝子の発現上昇をもたらす、脂肪肝を増悪させていると考えられた。

2) ヒト脂肪肝患者の肝生検組織から肝脂肪化、炎症、風船様腫大の病理組織を判断し、NAS score (NAFLD activity score) を算出し、Apg-2 の mRNA の発現レベルと比較検討を行った。Apg-2 はヒト NASH でも特に脂肪肝の程度と相関して発現が上昇していた。また、血清中の Apg-2 はアルブミン除去後にウエスタンブロット法を行ったが検出されず、今後の ELISA 系の樹立に既存の抗体ではなく、新規抗体の開発が重要と考えられた。

3) Apg-2<sup>-/-</sup>マウスはメンデルの法則に従って産まれるが、Apg-2<sup>-/-</sup>マウスの体重は Apg-2<sup>+/-</sup>および Apg-2<sup>+/+</sup>マウスの 70%前後にとどまることが分かった。Apg-1<sup>-/-</sup>マウスではこの所見は認めなかった。また、主要臓器の HE 標本では明らかな病変を認めなかった。高脂肪食による脂肪肝モデルを作成したところ Apg-2<sup>-/-</sup>マウスでは著明に肝脂肪化が抑制されただけでなく、体重増加、全身の脂肪組織の肥大化が抑制された。高脂肪食投与前の 6 週マウスの肝臓から RNA を抽出し cDNA アレイを施行したところ、Apg-2<sup>-/-</sup>マウスでは Wt に比べカタラーゼの発現が約 3 倍上昇しておりペロキシゾームの活性化が示唆された。また、高脂肪食 2 週投与と 24 週投与のいずれにおいても AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化、peroxisome

proliferator-activated receptor (PPAR) の発現が亢進していた。以上より、Apg-2 がないことでペロキシゾームにおける脂肪酸の酸化の亢進がみられ脂肪肝の抑制に寄与したと考えられた。さらに高脂肪食高コレステロール食による脂肪肝炎モデルを作製したところ、脂肪化の抑制と線維化の改善効果が見られた。Apg-2<sup>-/-</sup>マウスに pcDNA3.1-His-ub のプラスミドをハイドロダイナミック法で尾静脈より注入しプロテアソーム阻害剤 MG-132 を腹腔内投与し肝臓から蛋白を抽出、His で免疫沈降を行い、LKB1 をウエスタンブロット法で検出したところ、Wt マウスで見られた LKB1 のポリユビキチン化が抑制されていることが確認された。以上から Apg-2 は LKB1 のユビキチン化を促進することで AMPK シグナルを抑制していると考えられた。

4 )Apg-1 及び Apg-2 ノックアウトマウスから肝細胞を単離し初代培養した。初代培養では徐々に肝細胞の増殖能が低下するなかで、HSP70, HSP110 ファミリーは発現上昇することが mRNA レベルで確認できた。しかし、グルコース取り込み能力を FACS 解析したところ、大きな差はみられなかった。特に初代肝細胞での AMPK シグナルを活性させる starvation の条件設定が困難でステロイドやインスリン添加の影響から野生型の肝細胞との差が確認できなかった。

#### 5 . 主な発表論文等

Mizuno N, Seko Y, Yamaguchi K, Itoh Y, et al. Increase in the skeletal muscle mass to body fat mass ratio predicts the decline in transaminase in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2019 Feb;54(2):160-170. doi: 10.1007/s00535-018-1485-8. ( 査読有 )

Seko Y, Nishikawa T, Yamaguchi K, Itoh Y, et al. Efficacy and safety of canagliflozin in type 2 diabetes mellitus patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis classified as stage 1-3 fibrosis. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2018 Nov 27;11:835-843. doi: 10.1111/hepr.13296. ( 査読有 )

Furuta M, Moriguchi M, Yamaguchi K, Itoh Y, et al. Impact of Insufficient Response with an Increase in Tumor Number in Predicting Transcatheter Arterial Chemoembolization Refractoriness for Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis*. 2018;36(5):385-394. doi: 10.1159/000489488. ( 査読有 )

Iwai N, Yasui K, Yamaguchi K, Itoh Y, et al. Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2018 Jul;53(1):237-245. doi: 10.3892/ijo.2018.4369. ( 査読有 )

Seko Y, Yamaguchi K Itoh Y. The genetic backgrounds in nonalcoholic fatty liver disease. *Clin J Gastroenterol*. 2018 Apr;11(2):97-102. doi: 10.1007/s12328-018-0841-9.

Seko Y, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Combination of PNPLA3 and TLL1 polymorphism can predict advanced fibrosis in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2018 Mar;53(3):438-448. doi: 10.1007/s00535-017-1372-8.( 査読 有 )

Matsumoto M, Yamaguchi K, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C, et al. The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2018 Feb 1; 115:412-420. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.019. ( 査読有 )

Moriguchi M, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Sorafenib versus Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy as Initial Treatment for Hepatocellular Carcinoma with Advanced Portal

Vein Tumor Thrombosis. Liver Cancer. 2017 Nov;6(4):275-286. doi: 10.1159/000473887.

( 査読有 )

Gen Y, Yamaguchi K, Itoh Y et al. ASPP2 suppresses invasion and TGF- 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer. Cancer Lett. 2017 Jul 10;398:52-61. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.002. ( 査読有 )

Okajima A, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Liver stiffness measurement to platelet ratio index predicts the stage of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2017 Jul;47(8):721-730. doi: 10.1111/hepr.12793. ( 査読有 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 10 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 7 件 ) .

2019/4/11 The International Liver Congress 2019. Seko Y, Yamaguchi K, Umemura A, Itoh Y. NAFLD: Clinical aspects except therapy. The relationship between the PNPLA3, TLL1 polymorphism combination and advanced fibrosis in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease.

2018/6/14 第 54 回日本肝臓病学会総会(大阪) SY2 山口寛二, 石破博, 伊藤義人. NASH の諸問題 ~ 診断法と治療の再検証 ~ . 分子シャペロン Apg-2 を標的にした NAFLD 治療戦略.

2017/6/8 第 53 回日本肝臓学会総会 ( 広島 ) PD2-14 ( 追加発言 ) 山口寛二, 石破博, 伊藤義人 パネルディスカッション 2 「 NASH 発症の分子機構と治療戦略 」分子シャペロン Apg-2 をターゲットにした肝脂肪化治療戦略

2017/6/2 第 1 回 ICFL The 1st International Conference on Fatty Liver Seville Spain. BEST POSTER PRESENTATIONS SESSION 2 Screen 2 Yamaguchi Kanji, Ishiba Hiroshi, Seko Yuya, Umemura Atsushi, Itoh Yoshito Apg-2 plays an important role in hepatic steatosis

2016/11/13 AASLD 2016 第 67 回米国肝臓学会議(ボストン)、ポスター、Ishiba Hiroshi, Yamaguchi Kanji, Itoh Yoshito et al ( 他 8 名 ) . P-1573 Apg2 is a key determinant of hepatic steatosis by regulating AMPK activity.

2016/5/19 第 52 回日本肝臓学会総会 ( 幕張 ) 山口寛二, 石破 博、伊藤義人 一般演題 1、0-78、Heat shock protein 110 ファミリー・Apg-2 の脂肪肝形成における役割

2016/5/19 第 52 回日本肝臓学会総会 ( 幕張 ) 榎村敦詩、山口寛二、伊藤義人 シンポジウム 2-10 肝発癌・進展における , mTORC1 および p62-Nrf2 シグナルの役割

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

伊藤義人, 山口寛二, 榎村敦詩, 森口理久, 原祐, 瀬古裕也. N A S H における肝癌発生の実態. 臨床消化器内科 33(1): 77-83, 2018.

山口寛二, 瀬古裕也, 榎村敦詩, 西川太一朗, 森口理久, 伊藤義人. オベチコール酸 ( DSP-1747 ) による NASH 治療. 肝胆膵 76(4): 803-809, 2018. アークメディア

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ] ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

(2) 研究協力者: 伊藤 克彦 ( 京都大学 医学研究科 教授 )

Itoh Katsuhiko

研究者番号 : 80725812