

令和元年6月18日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09384

研究課題名(和文) Mitophagy誘導によるNASH肝発癌抑制機構

研究課題名(英文) Iron loss-induced mitophagy via mitochondria ferritin suppresses NASH-related hepatocellular carcinoma

研究代表者

原 裕一 (HARA, YUICHI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：60550952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NASHモデルマウスにおいて、マイトファジーが抑制されていること及びマイトファジー誘導剤(DFP)投与によりマウスの肝内にマイトファジーが惹起され、NASHの病態である肝線維化、脂肪沈着、肝発癌が抑制されることを明らかにした。また鉄キレートによるマイトファジーの誘導にミトコンドリアフェリチンが、key moleculeであることを世界で初めて明らかにした。またこのミトコンドリアフェリチンは肝線維化とも関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の患者規模は100万人以上であり、その数は年々増えてきている。にもかかわらずの特効薬はなく、また診断についても苦慮することが多い。我々が行った研究で、鉄キレート剤であるDFP(deferiprone)がミトコンドリア選択的オートファジー(マイトファジー)を惹起することでNASHの治療に有効であることが示されただけでなく、鉄誘導性マイトファジーのkey分子であるミトコンドリアフェリチンを同定した。またこのミトコンドリアフェリチンは肝線維化と密接に関連しており、診断のバイオマーカーとして期待できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate how iron deficiency triggers mitophagy.

Methods: The effect of iron chelator, deferiprone (DFP), on mitophagy was examined using Huh7 cells and hepatocarcinogenic mouse models. Results: DFP increased the expression of mitochondria ferritin (FtMt) which was retained to the mitochondria outer membrane. FtMt was not colocalized with intact mitochondria, suggesting that disrupted mitochondrial membrane potential may retain FtMt. Silencing FtMt suppressed DFP-induced mitophagy. FtMt was bound to nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4), a cargo receptor for autophagy, and the binding site of both proteins was identified. Under iron deficient condition DFP-induced mitophagy was preceded by ferritinophagy. Of note, DFP-induced mitophagy suppressed ROS production and hepatocarcinogenesis in mouse models. Discussion: FtMt is a molecule that triggers mitophagy under iron deficient condition.

研究分野：NASH

キーワード：ミトコンドリア オートファジー マイトファジー

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

#### 1. 研究開始当初の背景

アルコール性脂肪性肝炎(NASH)はわが国でも食事や生活様式の変化により増加傾向で、200万人の患者がいると推定されている。患者の著しい増加にもかかわらず、治療法は確立されておらず、治療の確立は急務である。NASHの病態の進展において酸化ストレスが重要な役割を果たすことはよく知られた事実で(*J Hepatol* 1999)、なかでもミトコンドリア由来のROSが産生されることが明らかになっている(*Hepatology* 2009)。さらに、ミトコンドリア内での抗酸化酵素の発現減少、活性低下も報告されている(*Metabolism* 2011)。このようにミトコンドリア障害による酸化ストレスはNASHの病態進展過程における重要な病態と位置付けられている。ミトコンドリアは最大の活性酸素(ROS)産生器官であるために、強力な抗酸化機能を備えるとともに、様々な品質管理機構が存在しその品質を保っている。ROSなどによる障害を受けたミトコンドリアは分裂、癒合を繰り返しミトコンドリアの機能が回復する。分裂癒合でも機能回復のできないほど障害を受けたミトコンドリアはミトコンドリア選択的オートファジー(マイトファジー)により選択的に除去される。マイトファジーはミトコンドリアの品質管理のために機能が低下したミトコンドリアを二重膜によって隔離し、その後これを分解する過程を指す。マイトファジーは type から まで分類されているが、中でも Type のマイトファジーが誘導される際にユビキチン結合酵素である Parkin が脱分極したミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアが選択的に分解除去されることが報告されている(PINK1-Parkin を介したマイトファジー; *J Cel Biol* 2008)。我々は NASH と同様ミトコンドリア障害により、酸化ストレスが増強することが病態進展と深く関連があることが知られている C 型肝炎において、HCV のコア蛋白が Parkin の N 末端側と結合しマイトファジーを抑制することを報告した(*Am J Pathol* 2014)。この報告でマイトファジーの抑制により機能障害を受けたミトコンドリアが消去されずに残存することで、ROS が増幅、増強されることも示した。興味深いことに NASH の肝線維化進展にオートファジーが深くかかわっていることや(*Gastroenterology* 2014)、NASH においてオートファジーの抑制が ER ストレスの増強に関与していること(*Cell Death Dis* 2014)、さらにマイトファジーの抑制により、マウスモデルにおいて NASH の病態進展することが報告されており(*Hepatology* 2015)、NASH とオートファジー(マイトファジー)との深い関連が示唆されている。われわれも Preliminary なデータながら NASH のヒト肝組織あるいは NASH モデルマウス肝において PINK1-Parkin を介したマイトファジーが抑制されていることを見出している(図 1)。一方、2014 年 Allen らにより鉄キレート剤である Deferiprone(DFP)は、PINK1-Parkin を介さずにマイトファジーを誘導することが明らかにされている(*EMBO reports* 2014)ため、従来のマイトファジーとは別の経路でマイトファジーを誘導しミトコンドリアの品質管理を行うことができるのではないかという着想に至った。

#### 2. 研究の目的

マイトファジーが誘導できれば、酸化ストレスの持続、増幅が抑制できるのではないかとこの着想に至った。そこでわれわれはマイトファジーの誘導剤として報告のある鉄キレート剤の Deferiprone (DFP)を用いてマイトファジーを誘導し、NASH の肝発癌抑制に有用か否かを検討することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

- (1) 慢性肝疾患を有しない患者および NASH 患者の肝組織においてマイトファジー関連因子の発現の差および NASH 患者における病態の程度とマイトファジー関連因子との関連性を明らかにする。
- (2) 培養細胞に DFP を添加し、マイトファジーが誘導できることを確認したのちに、ミトコンドリア機能解析、細胞内鉄動態の評価、マイトファジー誘導関連因子の同定をおこなう。
- (3) STAM<sup>+</sup> Mice(*Hepatology* 2011)および脂肪肝から肝発癌をきたすマウス(*Nature* 2013)とコントロールマウス(C57BL/6)に対し DFP を添加後 DFP 非群との比較を行い、病態進展の評価、マイトファジー関連分子の発現量、酸化ストレスの程度、オートファゴゾームの形態の検討を行う。

#### 4. 研究成果

鉄キレート剤が非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)において抑制されたミトコンドリア選択的オートファジー(mitophagy)を回復させミトコンドリア機能を改善することで病態進展(肝脂肪化、肝発癌)を抑制することを明らかにした。さらに我々は鉄キレート誘導性 mitophagy の key molecule として mitochondria ferritin (FtMt)を同定した。

鉄キレート剤(DFP)による mitophagy 誘導の際に FtMt 誘導されるが、ミトコンドリア鉄欠乏の際に転写因子 SP1 の FtMt プロモーター領域への結合増強が明らかとなった。FtMt のノックダウンにより mitophagy は抑制された。FtMt は標的分子とオートファゴソームを結合させるカーゴレセプター のひとつである nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4)結合し、さらに FtMt と NCOA4 の結合部位も同定した。ミトコンドリア移行シグナルを持つ蛋白はミトコンドリア膜電位の低下によりミトコンドリア外膜に係留するが、FtMt も鉄欠乏により膜電位の低下したミトコンドリア外膜に係留していた。以上から FtMt は障害ミトコンドリア選択的に移行し、さらに外膜に係留することで NCOA4 と結合して mitophagy を誘導すると考えられた。DFP による mitophagy は PINK1/Parkin の系とは独立していた。マウスモデルのミトコンドリアを検討したところ DFP 投与群は ATP の産生能は増加していた。NAFLD 肝組織の電顕による検討では FtMt の発現は mitophagosome と正の相関を示し( $r=0.82$ ,  $P<0.01$ )、病態の進展とともに減少した。

mitophagy の全く新しい分子機構を明らかにするとともに、ミトコンドリア品質管理は NAFLD 病態進展抑制のための治療戦略となる可能性が示唆された。さらに FtMt は NAFLD 線維化進展の新たなバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

#### 1. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Hino K, Nishina S, Sasaki K, Hara Y. Mitochondrial damage and iron metabolic dysregulation in hepatitis C virus infection, *Free Radical Biology and Medicine*, 査読有、133, 2019, 193-199
2. Nishina S, Yamauchi A, Kawaguchi T, Kaku K, Goto M, Sasaki K, Hara Y, Tomiyama Y, Kuribayashi F, Torimura T, Hino K, Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors Reduce Hepatocellular Carcinoma by Activating Lymphocyte Chemotaxis in Mice, *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 査読有、7(1)、2018、115-134
3. Miwa Kawanaka, Yasuyuki Tomiyama, Hideyuki Hyogo, Masahiko Koda, Toshihide Shima, Hiroshi Tobita, Akira Hiramatsu, Ken Nishino, Toshiaki Okamoto, Shuichi Sato, Yuichi Hara, Sohji Nishina, Hirofumi Kawamoto, Kazuaki Chayama, Takeshi Okanoue, Keisuke Hino, Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein predicts the development of hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease, *Hepatology Research*, 査読有、48(7)、2018、521-528
4. Kudo, M., Ueshima, K., Yokosuka, O., Ogasawara, S., Obi, S., Izumi, N., Aikata, Nagano, H., Hatano, E., Sasaki, Y., Hino, K., Kumada, T., Yamamoto, K., Imai, Y., Iwadou, S., Ogawa,., Okusaka, T., Kanai, F., Akazawa, K., Yoshimura, K. I., Johnson, P., Arai, Y. Silius study group, Sorafenib plus low-dose cisplatin and fluorouracil hepatic arterial infusion chemotherapy versus sorafenib alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma (SILIUS): a randomised, open label, phase 3 trial, *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 査読有、2018、2468-1253
5. Nishida, N. Sugiyama, M. Sawai, H. Nishina, S. Sakai, A. Ohashi, J. Khor, S. S. Kakisaka, K. Tsuchiura, T. Hino, K. Sumazaki, R. Takikawa, Y. Murata, K. Kanda, T. Yokosuka, O. Tokunaga, K. Mizokami, M. Key HLA-DRB1-DQB1 haplotypes and role of the BTNL2 gene for response to a hepatitis B vaccine, *Hepatology*, 査読有、2018、210 - 217
6. Koyama N, Hata J, Sato T, Tomiyama Y, Hino K, Assessment of hepatic fibrosis with superb microvascular imaging in hepatitis C virus-associated chronic liver diseases, *Hepatol Res*, 査読有、47(6)、2018、593-597

〔学会発表〕(計 27 件)

1. NAFLD 進展・発癌抑制のためのミトコンドリア品質管理とその分子機構 肝類同壁細胞研究会
2. 肝細胞癌と肺腺癌の重複癌に対してレンバチニブが奏功した 1 例 第 119 回日本内科学会中国地方会
3. 細胞内鉄欠乏によるミトコンドリア選択的オートファジーの分子機構 第 42 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 肝糖代謝阻害薬 2-deoxy-D-glucose 封入 PLGA ナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発 第 5 回肝臓と糖尿病・代謝研究会
5. 糖代謝阻害薬 2-deoxy-D-glucose 封入 PLGA ナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発 第 18 回日本肝がん分子標的治療研究会
6. 細胞内鉄欠乏によるミトコンドリア選択的オートファジーの分子機構 広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
7. 肝糖代謝阻害薬 2-deoxy-D-glucose 封入 PLGA ナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発 第 54 回日本肝癌研究会
8. 進行肝細胞癌に対するレゴラフェニブの初期使用経験 第 115 回日本内科学会講演会
9. Mitophagy 誘導機構の解明 第 14 回酸化ストレスと肝研究会
10. 進行肝細胞癌に対する regorafenib の初期使用経験 第 17 回日本肝がん分子標的研究会
11. 大型肝細胞癌に対する Bland-TAE を軸とした治療戦略 第 42 回日本肝臓学会西部会
12. C 型慢性肝炎に対する DAAs 治療後の肝発癌に関する検討 第 42 回日本肝臓学会西部会
13. ミトコンドリア内鉄欠乏による mitophagy 誘導機構 第 42 回日本肝臓学会西部会
14. 胆嚢穿孔に対して内視鏡的胆嚢ドレナージが有用であった一例 第 119 回日本消化器内視鏡学会 中国支部例会
15. Mitophagy 誘導機構の解明 JDDW2017 肝臓学会
16. 肝細胞癌に対する DPP4 阻害剤の抗腫瘍効果 JDDW2017 肝臓学会
17. Bland-TEA を軸とした大型肝細胞癌に対する治療戦略 JDDW2017 肝臓学会
18. ミトコンドリア内鉄欠乏による mitophagy 誘導機構 第 41 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
19. 鉄キレートによる mitophagy 誘導機構の解明 第 13 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム
20. C 型慢性肝疾患に対する DAAs 治療後の早期肝発癌に関する検討 第 16 回肝がん分子標的治療研究会
21. 肝細胞癌術後 follow 画像で膵管拡張を契機に発見された膵微小浸潤癌の 1 例 第 107 回日本消化器病学会中国支部例会
22. 肝細胞癌に対する DPP4 阻害剤の抗腫瘍効果についての基礎的検討 第 53 回日本肝臓学会
23. NASH 肝発癌抑制機構としての mitophagy 誘導 第 53 回日本肝臓学会総会
24. 巨大脾腫を伴う脾原発悪性リンパ腫の 1 例 日本内科学会第 116 回中国地方会
25. 鉄キレートによる mitophagy 誘導機構の解明 第 103 回日本消化器病学会総会
26. NASH 肝発癌抑制機構としての mitophagy 誘導 第 103 回日本消化器病学会総会
27. ソラフェニブ長期投与による遅発性奏効後の肺切除で完全奏効が得られた肝細胞癌の 1 例 第 15 回日本肝がん分子標的治療研究会

〔図書〕(計 7 件)

1. 原裕一、日野啓輔、消化器・肝臓内科、特集 肝疾患におけるサルコペニアのメカニズム、2019、5(1):92-97
2. 仁科惣治、佐々木恭、原裕一、福田宏太郎、日野啓輔、The Liver Cancer Journal、糖代謝阻害薬 2-deoxy-D-glucose 封入 PLGA ナノ粒子を用いた肝細胞癌治療開発、2018 10(suppl.2):67-67
3. 仁科惣治、日野啓輔、肝胆膵、特集サルコペニア-今注目される肝胆膵疾患の新たな病態-肝・筋関連メディエーターとしての高アンモニア血症、2018、77(4):777-781
4. 原裕一、日野啓輔、肝胆膵 肝炎と酸化ストレス、2018、77(3):643-649
5. 仁科惣治、日野啓輔、肝疾患と代謝異常、肝疾患における鉄代謝異常 Modern Physician 38-2 消化器疾患と代謝異常を考える、38(2):115-118
6. 日野啓輔、原裕一、医学のあゆみ、肝疾患におけるミトコンドリア特異的オートファジー(マイトファジー)の意義、2017、261(12):1177-1178
7. 原裕一、日野啓輔、細胞、【ミトコンドリアダイナミクスと疾患】肝疾患におけるマイトファジーの意義、2017、38(11):534-537

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：日野啓輔

ローマ字氏名：Hino Keisuke

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：肝胆膵内科学

職名：教授

研究者番号（8桁）：80228741

研究分担者氏名：仁科惣治

ローマ字氏名：Nishina Sohji

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：肝胆膵内科学

職名：講師

研究者番号（8桁）：70550961

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。