

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09423

研究課題名(和文) Bak/Bax活性化によるミトコンドリアDNA放出が慢性肝疾患に与える影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of mitochondrial DNA release by Bak/Bax activation on chronic liver disease

研究代表者

疋田 隼人(Hikita, Hayato)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20623044

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)：アポトーシス刺激によってミトコンドリアからミトコンドリアDNA(mtDNA)が放出される。この時にDNase II活性が低下していると、細胞質内mtDNAが増加し、TRL9を介してIFN- $\gamma$ 発現が上昇し、肝細胞は非アポトーシス型の細胞死に陥ることを明らかにした。高脂肪食摂取マウスの肝臓ではDNase II活性が低下しており、肝細胞アポトーシスとともに非アポトーシス型肝細胞死を認めた。DNase II欠損により、非アポトーシス型細胞死はさらに増加し、血清ALT値は増悪し線維化も進展した。非アルコール性脂肪性肝疾患患者の肝臓でもDNase II活性低下を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、非アルコール性脂肪性肝疾患患者ではDNase II活性の低下を認めており、これがIFN- $\gamma$ 発現上昇、IFN非アポトーシス型肝細胞死を誘導し、病態進展に寄与することが示唆された。肝細胞のアポトーシス刺激がmtDNAを介して非アポトーシス型肝細胞死を誘導する経路の存在とそのヒト肝疾患における意義を明らかにした成果であり、学術的な意義は高いと考える。また、今後非アルコール性脂肪性肝疾患の進展抑制治療として、mtDNAによる非アポトーシス型細胞死誘導経路を標的とした治療薬の開発などにもつながり、臨床的にも意義の高い成果と考える。

研究成果の概要(英文)：Apoptotic stimuli release mitochondrial DNA (mtDNA) from mitochondria. Under the DNase II activity decreased condition, mtDNA in the cytoplasm increased, IFN- $\gamma$  expression increased via TRL9, resulted in induction of non-apoptotic hepatocyte death. In the liver of mice fed a high-fat diet, DNase II activity was reduced and non-apoptotic hepatocyte death was observed along with hepatocyte apoptosis. DNase II deficiency in hepatocytes of them increased non-apoptotic hepatocyte death and serum ALT levels, and exacerbated liver fibrosis. DNase II activity was also reduced in the livers of patients with non-alcoholic fatty liver disease.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝細胞死 アポトーシス 非アポトーシス型細胞死 ミトコンドリアDNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) などの各種慢性肝炎では、共通して肝細胞アポトーシスが認められる。肝細胞において種々のアポトーシス刺激は、Bid、Bim、Puma などの BH3-only タンパクを活性化して、最終的に Bak/Bax の活性化に帰結する<sup>1,3</sup>。活性化した Bak/Bax は、ミトコンドリア外膜で重合化することで、外膜の透過性を亢進させてミトコンドリア膜間腔から cytochrome c を放出させる<sup>2,4</sup>。放出された cytochrome c により、カスパーゼ 3/7 は活性化され<sup>1,5</sup>、アポトーシスが遂行される<sup>3</sup>。研究代表者は、cytochrome c 放出による肝細胞アポトーシスが、肝障害の増悪、肝線維化進展を促進することを報告した<sup>2,5</sup>。また一方で cytochrome c の放出は、活性酸素種の蓄積を誘導して肝発癌を惹起させることも報告した<sup>4,6</sup>。このように慢性肝疾患の肝細胞では、Bak/Bax の活性化によるミトコンドリアから cytochrome c 放出は、肝疾患の病態進展に大きく寄与している。

慢性肝疾患の一つである NASH モデルとしての高脂肪食負荷マウスでは、Fas によるアポトーシス刺激を受けたミトコンドリアと同様に、形態学的に異常なミトコンドリアが肝細胞内に多数認められることを確認している。Bak/Bax が活性化し、外膜の透過性亢進による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) もしくは非選択的オートファジーにより排除される。一方で、高脂肪食負荷マウスの肝細胞ではオートファジーが抑制されることを報告した。このことから、慢性肝疾患の中でも NASH のようなオートファジーが抑制された肝細胞では、さらに障害ミトコンドリアが蓄積していることが示唆される。

ミトコンドリアはゲノム DNA とは別のミトコンドリア DNA (mtDNA) をミトコンドリア膜間腔に 2~10 コピー程度有しており、Bak/Bax 活性化による外膜の透過性亢進にて放出される<sup>7</sup>。mtDNA は細菌と同じ CpG モチーフを有しており、cGAS/STING、Toll 様受容体 9 にて認識されて細胞内免疫機構などを介して細胞死経路に寄与している可能性がある。しかし mtDNA 放出が慢性肝疾患の病態進展にどのように関与しているかは不明である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、非アルコール性脂肪肝炎などの慢性肝疾患において、アポトーシス刺激によるミトコンドリアからの mtDNA の放出が細胞内免疫機構及びアポトーシス、ネクローシス誘導機構に与える影響を解明する。また、この細胞内免疫機構や細胞死機構を介して「肝障害の増悪」、「肝細胞の癌化」、「肝線維化の進展」に与える影響をそれぞれ解明する。

ミトコンドリアはミトコンドリア特異的なオートファジーであるマイトファジーや非選択的オートファジーによって排除されるが、マイトファジーやオートファジーの亢進が障害ミトコンドリアを減少させ、mtDNA や cytochrome c の放出の抑制につながるかを明らかにする。また mtDNA や cytochrome c の放出抑制が肝発癌、肝線維化や肝障害の増悪を改善させる方法となり得るかを解明する。本研究の遂行を通じて、慢性肝疾患におけるミトコンドリアの制御という視点からの新規治療法を探索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

In vitro の実験では、マウス肝細胞株である CL2 細胞に Bad mimetic を添加し Bak/Bax を活性化させた。mtDNA を分解する DNase II を siRNA にて抑制して検討を行った。

マウスを用いた検討では、持続的に Bak/Bax が活性化している肝細胞特異的 Mcl-1 欠損マウスを使用した。また、肝細胞特異的 DNase II 欠損マウスと交配して、肝細胞特異的 Mcl-1/DNase II ダブル欠損マウスを作成して検討した。さらに Mcl-1 欠損マウスと TLR9 欠損マウスを交配して Mcl-1/TLR9 ダブル欠損マウスを、このマウスと肝細胞特異的 DNase II 欠損マウスを交配し Mcl-1/TLR9/DNase II トリプル欠損マウスを作成した。

非アルコール性脂肪性肝疾患モデルとして、マウスには高脂肪食を摂取させた。また臨床検体として、脂肪肝と非脂肪肝患者の肝切除検体を用いて、発現解析を行った。

## 4. 研究成果

マウス肝細胞株 (CL2) に siRNA を用いて DNase II をノックダウン (KD) し DNase II 酵素活性を抑制したところ、細胞質分画中の mtDNA 量は変化しなかった。一方で、CL2 細胞に Bad mimetic を添加し、Bak/Bax を活性化させると、細胞質中の mtDNA 量は増加した。この状態で DNase II を抑制すると細胞質中の mtDNA 量はさらに増加した。また DNase II の抑制は、CL2 細胞のアポトーシスを増加させなかったが、IFN- $\gamma$  の発現上昇とともに PI 陽性細胞の増加を認め、非アポトーシス型細胞死を誘導した。DNase II 抑制で認められた IFN- $\gamma$  の発現上昇、PI 陽性細胞の増加は共にカスパーゼ阻害剤で抑制されたが、TLR9 阻害剤でも抑制された。またこの非アポトーシス型細胞死は RIP1 阻害剤の投与でも抑制された。一方、AIM2 を抑制しても変化を認めなかった<sup>8</sup>。

CL2 細胞を ethidium bromide にて培養し mtDNA を欠損させた細胞を作成した。この細胞では、Bad mimetic を添加し Bak/Bax を活性化させると、アポトーシスは誘導された。しかしこの状態で、DNase II を抑制しても IFN- $\gamma$  の発現上昇、PI 陽性細胞の誘導は認めなかった<sup>8</sup>。

肝細胞特異的 DNase II 欠損マウスは生理的条件下では表現型を示さなかった。しかし持続的に

Bak/Bax が活性化している肝細胞特異的 Mcl-1 欠損マウスに、DNase II をさらに欠損させると、cleaved-caspase-3 陽性肝細胞や TUNEL 陽性肝細胞数には変化を認めず、肝細胞アポトーシスに変化を認めなかったが、細胞質中の mtDNA 量が増加し、肝臓での IFN- $\gamma$  発現上昇、PI 陽性細胞の増加と血清 ALT 値の上昇を認めた。Mcl-1/DNaseII ダブル欠損マウスに TLR9 阻害剤を投与すると、血清 ALT 値は改善し、肝臓での IFN- $\gamma$  の発現上昇は抑制され、PI 陽性細胞の増加も抑制された。Mcl-1/TLR9 ダブル欠損マウスと Mcl-1/TLR9/DNaseII トリプル欠損マウスでは、肝細胞アポトーシスだけでなく、血清 ALT 値も同等であった。Mcl-1 欠損マウスと Mcl-1/DNase II ダブル欠損マウスの肝臓を用いて cDNA アレイ後パルスウェイ解析を施行したところ、IFN シグナル活性化の大きな変動を認めた<sup>8</sup>。

野生型マウスに 8 ヶ月間高脂肪食(HFD)を摂取させると、通常食に比して DNase II 酵素活性が低下し、肝細胞アポトーシスの指標である cleaved-caspase-3 陽性肝細胞や TUNEL 陽性肝細胞と同時に PI 陽性肝細胞を認めた。肝細胞特異的 DNase II 欠損マウスに高脂肪食摂取負荷をおこなったところ、野生型マウスに比して肝臓での IFN- $\gamma$  の発現上昇を認めた。また、PI 陽性細胞の増加と血清 ALT 値の上昇を認め、肝線維化の進展を認めた<sup>8</sup>。

患者切除肝組織を用いた検討では、脂肪肝では非脂肪肝に比し DNase II 活性の低下を認めた。

以上より、高脂肪摂取は肝細胞 DNase II を低下させ、Bak/Bax 活性化によりアポトーシスだけでなく非アポトーシス型細胞死を誘導し、肝障害の増悪および肝線維化進展に寄与する可能性が示唆された。

#### 引用文献

1. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, et al. The Bcl-2 homology domain 3 (BH3)-only proteins Bim and bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic Bcl-2 family proteins in healthy liver. *J Biol Chem* 2013;288:30009-18.
2. Hikita H, Takehara T, Kodama T, et al. BH3-only protein bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 2009;50:1972-80.
3. Hikita H, Takehara T, Kodama T, et al. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology* 2011;54:240-51.
4. Hikita H, Kodama T, Tanaka S, et al. Activation of the Mitochondrial Apoptotic Pathway Produces Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Hepatocytes That Contribute to Liver Tumorigenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015;8:693-701.
5. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, et al. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 2009;50:1217-26.
6. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, et al. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. *J Hepatol* 2012;57:92-100.
7. Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell* 2014;159:1563-77.
8. Saito Y, Hikita H, Nozaki Y, et al. DNase II activated by the mitochondrial apoptotic pathway regulates RIP1-dependent non-apoptotic hepatocyte death via the TLR9/IFN- $\beta$  signaling pathway. *Cell Death Differ* 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito Y, Hikita H, Nozaki Y, Kai Y, Makino Y, Nakabori T, Tanaka S, Yamada R, Shigekawa M, Kodama T, Sakamori R, Tatsumi T, Takehara T.	4. 巻 26
2. 論文標題 DNase II activated by the mitochondrial apoptotic pathway regulates RIP1-dependent non-apoptotic hepatocyte death via the TLR9/IFN- signaling pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death Differ.	6. 最初と最後の頁 460-486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41418-018-0131-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 疋田隼人
2. 発表標題 ミトコンドリアDNA分解酵素活性の低下による非アポトーシス型細胞死の誘導
3. 学会等名 肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 義修, 疋田 隼人, 工藤 慎之輔, 野崎 泰俊, 牧野 祐紀, 中堀 輔, 山田涼子, 小玉 尚宏, 阪森 亮太郎, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 慢性肝疾患におけるマクロファージ由来TNF- は肝細胞における非アポトーシス型の肝細胞死誘導と酸化ストレス誘導により肝発癌を促進する
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎泰俊、疋田隼人、田中聡司、水谷直揮、明神悠太、坂根貞嗣、 牧野祐紀、中堀輔、齋藤義修、小玉尚宏、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 持続的肝細胞アポトーシスは、酸化ストレス依存的にジエチルニトロサミンによるDNA損傷を持続させ腫瘍形成を促進させる
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinobu Saito, Hayato Hikita, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 DNase II Activated by the mitochondrial apoptotic pathway regulates RIP-1 dependent hepatocyte non-apoptotic cell death via the TLR9/IFN-
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 義修, 疋田 隼人, 甲斐 優吾, 野崎 泰俊, 牧野 祐紀, 中堀 輔, 小玉 尚宏, 阪森 亮太郎, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 肝細胞DNase IIはアポトーシス刺激下においてTLR9/IFN- 経路を介した非アポトーシス細胞死を制御する
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤 義修, 疋田 隼人, 甲斐 優吾, 野崎 泰俊, 牧野 祐紀, 中堀 輔, 田中 聡司, 小玉 尚宏, 阪森 亮太郎, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 NAFLDの病態における肝細胞DNaseIIの役割
3. 学会等名 第59回日本消化器病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齋藤 義修, 疋田 隼人, 竹原 徹郎
2. 発表標題 DNA分解酵素DNase IIの活性低下による脂肪性肝疾患の病態進展
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 疋田 隼人, 齋藤 義修, 竹原 徹郎
2. 発表標題 肝細胞DNase 活性の低下は、肝細胞ネクローシスを誘導し非アルコール性肝疾患の病態進展に寄与する
3. 学会等名 第26回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshinobu Saito, Hayato Hikita, Yasutoshi Nozaki, Yugo Kai, Yuki Makino, Tasuku Nakabori, Minoru Shigekawa, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Suppression of DNase II activity in fatty livers contributes to induction of RIP1-dependent hepatocyte necrosis through TLR9-IFN pathway.
3. 学会等名 AASLD 2017 The Liver meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Wen-Xing Ding (Eds.), Xiao-Ming Yin (Eds.), Edward N Harris, April O'Brien, Fatemeh P. Parvin-Nejad, John Marentette, Hayato Hikita, Tetsuo Takehara, Kari Nejak-Bowen, Rui Kang, Carl W Decker, Kristina L. Go, Cheng Ji, Wenke Feng	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 289
3. 書名 Molecules, Systems and Signaling in Liver Injury	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	巽 智秀  (Tatsumi Tomohide)  (20397699)	大阪大学・医学系研究科・講師   (14401)	

