

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10679

研究課題名(和文)がん特異的エネルギー代謝機構調節遺伝子によるNASH病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of NASH pathogenesis by the cancer specific energy metabolic machinery regulatory gene

研究代表者

廣川 文鋭(Hirokawa, Fumitoshi)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20322373

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)：本研究の目的はラット及びマウスのNASH発症モデルを用いて、NASH発症とがん特異的エネルギー代謝機構(Warburg効果)関連遺伝子との関連性を検証することである。NASH群においてWarburg効果の主体である解糖系が亢進し、さらにWarburg効果の律速酵素であるPKM2とリン酸化PKM2が有意に発現上昇していた。さらにmicroRNAの一つであるMIR122-5pがPKM2の発現調整しているのを同定した。またこの変化の主体はKupffer細胞であった。以上の結果よりNASHではKupffer細胞においてWarburg効果が亢進していることが示唆された。

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)は進行性の慢性肝炎であり、肝硬変から肝細胞癌を発症するにもかかわらずいまだ明確な治療法は確立されていない。本研究ではNASH発症とKupffer細胞の代謝変化をmicroRNAの観点から解明した。この研究結果はKupffer細胞の代謝機構を標的とするNASH治療法への一助となり社会的意義の期待される成果である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the association with the pathophysiology of NASH and the cancer-specific energy metabolism (Warburg effect)-affiliated genes using NASH models (rats and mice). The glycolytic pathway, the main constituent of the Warburg effect, was activated in the NASH group. PKM2 and phosphorylation-PKM2, which were limited-enzyme of the Warburg effect, were significantly up-regulated in the NASH group. Furthermore, MIR122-5p, which was one of the microRNAs, coordinated the expression of PKM2. In addition, the main constituent of this change was Kupffer cells. It was suggested that the Warburg effect was activated in Kupffer cells of NASH.

研究分野：一般・消化器外科学 肝臓外科学

キーワード：NASH Warburg効果 microRNA MIR122-5p PKM2 Kupffer細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、環境の欧米化により脂肪肝の割合が増加している、脂肪肝のうちアルコール摂取に依存しないものを non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) と定義し、そのうち約 20% に非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis :NASH) が存在する。NASH は進行性の慢性肝炎であり、肝硬変及び肝細胞癌 (HCC) を発症することが問題である。しかしながら、NASH の病態・発生機序はほとんど不明であり、有効な早期診断法や治療法が確立されていないことが現状である。

がん細胞は有酸素下においても嫌気性解糖系で ATP 産生 をしており、これをがん特異的エネルギー代謝機構 (Warburg 効果) という。本研究では NASH 発症動物モデルを用いて、Warburg 効果および、その律速酵素である PKM2 などの関連遺伝子を中心に NASH 及び NASH 由来肝細胞がんの病態を解明する。また、これらの遺伝子の発現を調節する機構を microRNA の観点から明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、NASH 発症ラット及びマウスモデルを主に用い、Warburg 効果関連遺伝子を中心に NASH 及び NASH 由来肝細胞がんの病態を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) NASH 発症モデルの飼育とタンパク発現の解析

脂肪食を与えて作成した NASH 発症ラット及びマウスモデル (SHRSP5/Dmcr, C57BL/6J-NASH) を使用した。これらモデルの肝臓を取り出し、タンパク抽出を行いプロテオーム解析・ウェスタンブロッティング法 (WB 法)・免疫組織染色法 (IHC 法) により NASH におけるタンパク発現の変化を解析した。特に Warburg 効果の主体である解糖系関連分子の発現変化を網羅的に解析し、その律速酵素である PKM2 を詳細に解析した。

### (2) MIR122-5p による PKM2 の発現調節の解析

HCC 細胞株 (Hep3B, HuH-7) を用いて肝臓特異的に発現する MIR122-5p による PKM2 の発現調節能を WB 法やルシフェラーゼレポーターアッセイで確認した。MIR122-5p 発現量は RT-PCR 法で解析した。

### (3) PKM2 発現部位の同定解析

NASH 発症動物モデルを用いて、Warburg 効果の律速酵素である PKM2 が発現している局在部位を IHC 法で確認した。またコラゲナーゼ還流法により細胞を分離し、分離した細胞の PKM2 発現量を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) NASH 発症モデルの飼育とタンパク発現の解析

本研究ではラット及びマウスの2種類の NASH 発症モデルを作成した。ラットモデルは 10 週齢の SHRSP5/Dmcr に 8 週間脂肪食を与え NASH 発症モデルを作成した。マウスモデルは 6 週齢の C57BL/6J に 12 週間コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) を与えて作成した。これらのモデルの NASH 肝は脂肪沈着を認め、顕微鏡下においてヒト NASH 患者に類似した病理変化を認めた (図 1A, C)。また採血では肝逸脱酵素の上昇を認めた。

まずラットモデルを用いて、プロテオーム解析により解糖系関連酵素をはじめとしたタンパク発現量を網羅的に解析した。この解析により NASH 発症モデルにおいて解糖系全体が亢進していることが示唆され、特に律速酵素である PKM2 の発現が上昇していた (図 1B)。

さらに、ラット・マウス両 NASH モデルを用いて

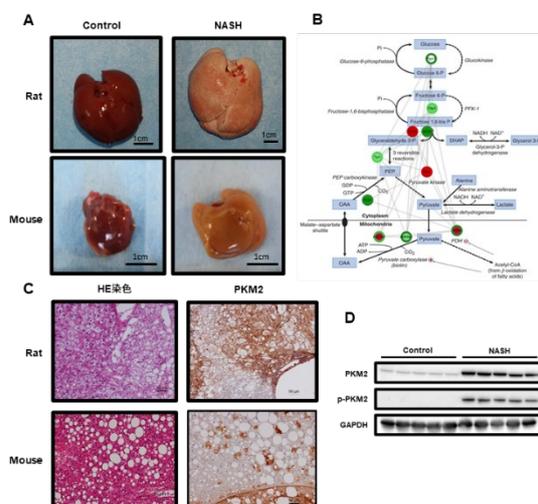


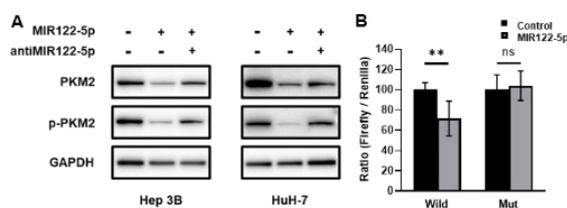
図 1: NASH 発症モデルとタンパク発現

ラット及びマウスより食餌性 NASH 発症モデルを作成した。A. NASH 肝のマクロ変化。B. ラットモデルのプロテオーム解析。解糖系の亢進を確認した。C, D. PKM2 の発現更新を WB 法・IHC 法で確認した。

WB 法・IHC 法による PKM2 の発現を解析した。両モデルにおいて PKM2 及びその活性型であるリン酸化型 PKM2 (p-PKM2) が著名に上昇していた (図 1 CD)。またマウスモデルにおいては NASH 発症早期よりこの変化を認めた。以上より、NASH 肝において Warburg 効果が活性化していることが示唆された。

## (2) MIR122-5p による PKM2 の発現調節の解析

NASH における PKM2 の発現変化を microRNA の観点より解析を行った。データベース (Target Scan Human) で MIR122-5p が PKM2 の 3' 側非翻訳領域 (3' UTR) に結合することが想定された。HCC 細胞株 (Hep3B, HuH-7) に MIR122-5p を導入したところ PKM2・p-PKM2 の発現が著名に低下した。また MIR122-5p インヒビターとともに導入したところ PKM2・p-PKM2 の発現は回復した (図 2A)。さらにルシフェラーゼレポーターアッセイでは、Wild タイプのみ PKM2 のルシフェラーゼ活性が優位に低下した (図 2B)。これらの実験結果より、MIR122-5p は直接 PKM2 の 3' UTR に結合し PKM2 の発現を制御していることが示唆された。

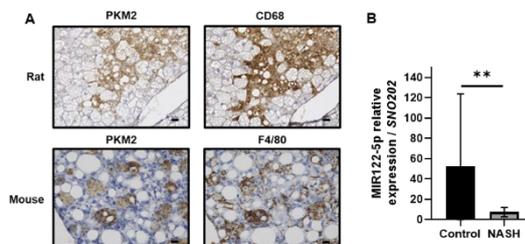


**図 2: MIR122-5p と PKM2 の発現関連性**

A. 肝細胞癌株に MIR122-5p を導入すると PKM2 の発現が抑制された。B. ルシフェラーゼレポーターアッセイにより MIR122-5p は PKM2 の 3' UTR に直接結合した。

## (3) PKM2 発現部位の同定解析

HE 染色で PKM2 の発現部位が Kupffer 細胞であることが示唆された。また IHC 法で PKM2 と Kupffer 細胞マーカー (ラット: CD68、マウス: F4/80) が同一部位で発現していることが確認された (図 3A)。さらに Kupffer 細胞における MIR122-5p 発現量を測定するために、コラゲナーゼ還流法で Kupffer 細胞のみを分離した。その結果、NASH 群の分離された Kupffer 細胞では MIR122-5p の発現が優位に低下していた (図 3B)。以上より、Kupffer 細胞において MIR122-5p の発現低下が PKM2 発現上昇につながり、Warburg 効果の獲得に寄与していることが示唆された。



**図 3: Kupffer 細胞における PKM2 発現**

A. IHC 法により NASH 群の Kupffer 細胞において PKM2 が高発現していることを確認した。B. 分離した Kupffer 細胞では、NASH 群において優位に MIR122-5p が低下した。

NASH において Kupffer 細胞の表現型が M2 タイプから M1 タイプへと変化する報告が散見しており、本研究で使用したモデルにおいて表現型が変化していることを示唆する結果を得た。現在、Kupffer 細胞の表現型変化と Warburg 効果の関連性を探求している。本研究結果や現在進行中の研究により、今後 Kupffer 細胞の代謝機構を標的とする NASH の治療につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miyaoaka Yuta, Jin Denan, Tashiro Keitaro, Masubuchi Shinsuke, Ozeki Maiko, Hirokawa Fumitoshi, Hayashi Michihiro, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 67
2. 論文標題 A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 239 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozeki Maiko, Jin Denan, Miyaoaka Yuta, Masubuchi Shinsuke, Hirokawa Fumitoshi, Hayashi Michihiro, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 14
2. 論文標題 Comparison of a chymase inhibitor and hyaluronic acid/carboxymethylcellulose (Septrafilm) in a novel peritoneal adhesion model in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0211391	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yosuke Inomata, Kohei Taniguchi, Jae Won Oh, Nobuhiko Sugito, Fumitoshi Hirokawa, Shinji Takai, Kwang Pyo Kim, Yukihiro Akao, Kazuhisa Uchiyama
2. 発表標題 Warburg effect is gained through the dysregulation of MIR122 at the early phase of NASH
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔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	高井 真司  (Takai Shinji)  (80288703)	大阪医科大学・医学研究科・教授    (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	猪俣 陽介  (Inomata Yosuke)	大阪医科大学・医学研究科・大学院生  (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	Kyung Hee University			