

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15977

研究課題名(和文)肝疾患における遊離脂肪酸のオートファジー調整機序の解明

研究課題名(英文)Effect of free fatty acids on autophagy in liver disease

研究代表者

荻野 学芳(Ogino, Noriyoshi)

高知大学・医学部・客員助教

研究者番号：70614204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：飽和脂肪酸は肝臓のオートファジーを阻害するが、不飽和脂肪酸はこれを改善する。この改善効果には肝細胞の小胞体内カルシウム濃度調整機能が関連することが培養細胞の実験で判明した。この内容は国際誌Experimental Cell Researchに掲載された。また生体内で飽和脂肪酸の濃度が上昇した場合の肝臓の変化を、マウスに飽和脂肪酸を静脈投与する実験で調べたところ、酸化ストレス関連酵素のうちHO-1のみが上昇することが判明した。そして肝培養細胞の実験で、HO-1が飽和脂肪酸の酸化ストレスを軽減することを見出した。この結果は国際誌Nutrientsに掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、特に脂肪性肝疾患における飽和脂肪酸の脂肪毒性の分子機序の一部を説明するものであり、飽和脂肪酸がもたらすオートファジーの障害には小胞体内カルシウム調整機構が、酸化ストレスにはHO-1が重要な役割を持つ可能性が確認されました。脂肪性肝疾患に対する治療薬はいまだに少なく、その病態の促進要因も明らかにはなっていません。今回の研究で確認された機序を標的とした新たな治療への応用が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Saturated fatty acids inhibit autophagy in the liver, whereas unsaturated fatty acids improve it. Experiments in cultured cells have shown that this effect is related to the ability of hepatocytes to regulate calcium levels in the sarcoplasmic reticulum. This was published in the international journal Experimental Cell Research. In addition, when the concentration of saturated fatty acids in the blood was increased in vivo, only HO-1, an oxidative stress-related enzyme, was found to be upregulated in the liver of mice treated intravenously with saturated fatty acids. In experiments on cultured cells, we found that HO-1 reduces the oxidative stress induced by saturated fatty acids. These results have been published in the international journal Nutrients.

研究分野：脂肪性肝疾患

キーワード：脂肪性肝疾患 オートファジー 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)や肝細胞癌を発症した患者では、その血中や肝の遊離脂肪酸(free fatty acid; FFA)の量や組成が変化していることが知られている。一方で、肝細胞におけるオートファジーの機能異常が、これらの肝疾患の病態進展に寄与していることが近年報告されるようになった。我々は、FFAが肝細胞のオートファジーを制御することに着目して研究を進めており、飽和脂肪酸がオートファジーの後期段階を障害し、不飽和脂肪酸の同時投与で改善すること、その機序にカルシウム輸送蛋白である sarco/ER Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA)が関与することを見出した。この現象は、飽和脂肪酸がNAFLDの病態進展を促進することを考慮すると重要な知見と考えられた。また高濃度のn-3系多価不飽和脂肪酸は肝癌細胞株のオートファジーの形成を亢進し、かつ肝癌細胞死を誘導することも確認した。癌細胞死に付随して起こるオートファジーの亢進が、細胞死の原因であるのか結果であるのかはいまだに議論の余地があり、重要な知見と考えられた。

## 2. 研究の目的

FFAの種類と肝細胞のオートファジーとの関係性や小胞体内カルシウム量との関連性について検討した研究報告はほとんどない。肝疾患モデルでこれらの項目を解析することで、肝細胞のオートファジーを介した新たな治療戦略を見出すことが本研究の最終目的である。

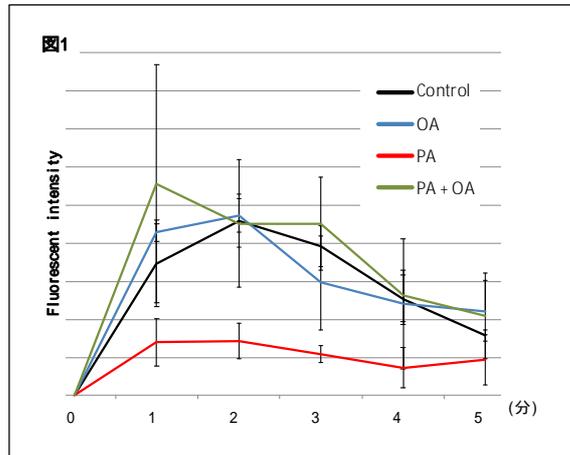
## 3. 研究の方法

培養細胞として、不死化肝細胞株 OUMS29 と肝癌細胞株 Huh7 および HepG2 を使用した。飽和脂肪酸としてパルミチン酸、不飽和脂肪酸としてオレイン酸、多価不飽和脂肪酸としてエイコサペンタエン酸を用いた。小胞体ストレス誘導剤としてツニカマイシンとピューロマイシン、SERCA 阻害剤としてタプシガルギンとシクロピアゾン酸、オートファジー阻害剤としてパフィロマイシン A1 を使用した。オートファジーの解析は、オートファゴソーム膜特異的タンパク質である LC3- と分解されるタンパク質 p62 の発現量をウエスタンブロットで比較と、赤色蛍光タンパク質 (mRFP) および緑色蛍光タンパク質 (GFP) で標識された LC3 を発現するプラスミド (tf-LC3; Addgene, Cambridge, MA, USA) を、FFA 投与前にトランスフェクションさせ、4%PFA で固定して共焦点顕微鏡で解析した。細胞障害の指標として LDH release assay と cleaved caspase3 の免疫染色をおこなった。小胞体ストレスについては spliced XBP-1 とリン酸化 eIF2 のウエスタンブロットで評価した。小胞体内カルシウム濃度の相対的な評価方法として、タプシガルギン投与後の細胞質での Fluo4-AM の蛍光強度の変化率をマイクロプレートリーダーで測定した。*In vivo*の検討は、NAFLD モデルマウスとして12週間の高脂肪食(リサーチダイエット)をC57BL/6雄マウスに食餌し、採取した血液と肝臓を解析した。また血中パルミチン酸濃度のみを上昇させるマウスモデルとして、既報文献(Eguchi K et al., 2012 Cell Metab)を参照し、超音波で乳化させたパルミチン酸エチル・レシチン・グリセロール水溶液を Balb-C 雄マウスの尾静脈より投与し、24 時間後に採取した血液と肝臓を解析した。

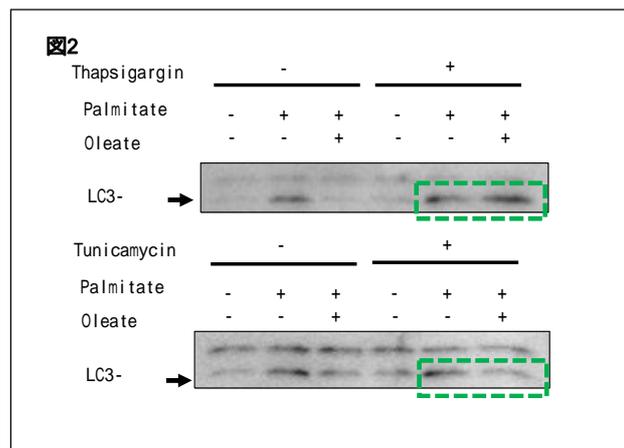
## 4. 研究成果

OUMS29 と Huh7 に対してパルミチン酸 500  $\mu$ M を投与すると、若干の脂肪滴形成とともにオートファジーの後期段階の障害と、小胞体ストレス、細胞障害が惹起された。一方、オレイン酸 500

$\mu\text{M}$  は著名な脂肪滴形成がみられたものの、オートファジーや小胞体ストレスに変化はなかった。エイコサペンタエン酸は  $500\ \mu\text{M}$  投与で Huh7 にのみオートファジーの亢進、小胞体ストレスと細胞障害を引き起こしたが、 $25\ \mu\text{M}$  では変化がなかった（生理的な濃度は  $200\ \mu\text{M}$  以下）。エイコサペンタエン酸(n-3 系多価不飽和脂肪酸)による肝癌細胞死については、容量依存性が見られなかったこと、オートファジーの解析結果の再現性が乏しかったことから、他の実験を優先的に行う方針とした。OUMS29 において、パルミチン酸によるオートファジーの障害や小胞体ストレス、細胞障害は  $25\ \mu\text{M}$  のオレイン酸、エイコサペンタエン酸で軽減した。この実験系で小胞体内のカルシウム量の変化を計測すると、パルミチン酸(PA)で低下し、オレイン酸(OA)やエイコサペンタエン酸で改善していることが判明した(図 1)。次に細胞質から小胞体へとカルシウムを取り込む唯一の ATP アーゼである SERCA の阻害剤タプシガルギンおよびシクロピアゾン酸を投与すると、オレイン酸やエイコサペンタエン酸のオートファジーへの改善効果が消失した。ここで小胞体カルシウム濃度の調整障害ではなく、異常蛋白の蓄積を主とする小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンおよびピューロマイシンを投与すると、オレイン酸やエイコサペンタエン酸のオートファジーへの改善効果は保たれたまま

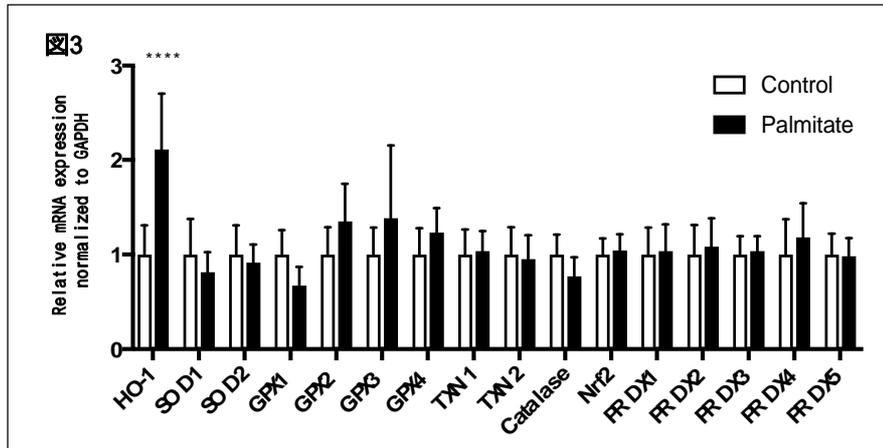


であった(図 2)。この結果は、飽和脂肪酸が惹起するオートファジーの障害に対する不飽和脂肪酸の改善効果については、特に SERCA による小胞体カルシウム調整機構が重要である可能性が示唆された。この結果は 2018 年の第 3 回 G-PLUS 研究会で発表し、国際誌 Experimental Cell Research に掲載された。次に Balb-c 雄マウスの静脈からパルミチン酸溶液を投与し、パルミチン酸の血中濃度を上昇させる研究成果について述べる。



パルミチン酸の投与によって有意な肝酵素の上昇はみられなかったものの、肝に若干の脂肪滴形成をみとめるとともに、興味深いことに抗酸化酵素のうち H0-1 のみが上昇することが判明した(図 3)。高脂肪食食餌による NAFLD モデルマウスの肝臓でも H0-1 が上昇傾向であったことから、パルミチン酸による NAFLD の病態進展に H0-1 が深く関与している可能性が示唆された。H0-1 の役割をより詳細に検討するために、肝培養細胞 HepG2 に対して H0-1 の loss of function (SiRNA による H0-1 のノックダウン)および gain of function(H0-1 誘導剤である  $\text{SnCl}_2$ )を施行した条件でパルミチン酸を暴露すると、酸化ストレスはノックダウンで上昇し、 $\text{SnCl}_2$  で低下した。この研究結果から、H0-1 は、特に飽和脂肪酸による酸化ストレスを軽減する役割をもつことが示唆され、国際誌 Nutrients に掲載された。

遊離脂肪酸が惹起する肝細胞のオートファジーへの影響は、その種類によって全く異なり、とくに飽和脂肪酸による小胞体ストレスとオートファジー障害には小胞体内カルシウム調整



機構が強く関わっていることが明らかになった。また飽和脂肪酸は *in vivo* の条件下であっても、血中濃度の上昇が肝臓での酸化ストレスを惹起しており、これらを軽減するためには、HO-1 が重要な役割を持つことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogino Noriyoshi, Miyagawa Koichiro, Kusanaga Masashi, Hayashi Tsuguru, Minami Sota, Oe Shinji, Honma Yuichi, Harada Masaru	4. 巻 385
2. 論文標題 Involvement of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase-mediated calcium flux in the protective effect of oleic acid against lipotoxicity in hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.111651	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 -
1. 著者名 Oe Shinji, Honma Yuichi, Yabuki Kei, Morino Kahori, Kumamoto Keiichiro, Hayashi Tsuguru, Kusanaga Masashi, Ogino Noriyoshi, Minami Sota, Shibata Michihiko, Abe Shintaro, Harada Masaru	4. 巻 59
2. 論文標題 Importance of a Liver Biopsy in the Management of Wilson Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 77 ~ 81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.3440-19	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Kusanaga Masashi, Oe Shinji, Ogino Noriyoshi, Minami Sota, Miyagawa Koichiro, Honma Yuichi, Harada Masaru	4. 巻 20
2. 論文標題 Zinc Attenuates the Cytotoxicity of Some Stimuli by Reducing Endoplasmic Reticulum Stress in Hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2192 ~ 2192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20092192	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Honma Yuichi, Shibata Michihiko, Hayashi Tsuguru, Kusanaga Masashi, Ogino Noriyoshi, Minami Sota, Kumei Shinsuke, Oe Shinji, Miyagawa Koichiro, Senju Michio, Matsuoka Hidehiko, Watanabe Tatsuyuki, Hiura Masaaki, Abe Shintaro, Harada Masaru	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of direct acting antivirals on platelet associated immunoglobulin G and thrombocytopenia in hepatitis C virus related chronic liver disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 1641 ~ 1651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/liv.14120	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 -

1. 著者名 Nagaoka Kenjiro, Ogino Keiki, Ogino Noriyoshi, Ito Tatsuo, Takemoto Kei, Ogino Shihona, Seki Yuka, Hamada Hiroki, Fujikura Yoshihisa	4. 巻 34
2. 論文標題 Human albumin augmented airway inflammation induced by PM2.5 in NC/Nga mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Environmental Toxicology	6. 最初と最後の頁 836 ~ 843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tox.22751	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 -

1. 著者名 Honma Y, Sumida K, Ogino N, Kusanaga M, Minami S, Kumei S, Matsuoka H, Watanabe T, Hiura M, Abe S, Shibata M, Harada M.	4. 巻 12
2. 論文標題 A Young Adult Patient with Nonalcoholic Steatohepatitis Developed Severe Gastroesophageal Varices Associated with Severe Obesity and Diabetes Mellitus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Case Rep Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 487-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000492423.	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 -

1. 著者名 Ogino K, Nagaoka K, Ito T, Takemoto K, Okuda T, Nakayama SF, Ogino N, Seki Y, Hamada H, Takashiba S, Fujikura Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Involvement of PM2.5-bound protein and metals in PM2.5-induced allergic airway inflammation in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inhal Toxicol.	6. 最初と最後の頁 498-508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/08958378.2018.1561769.	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 -

1. 著者名 Miyake Y, Eguchi E, Ito H, Nakamura K, Ito T, Nagaoka K, Ogino N, Ogino K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Association between Occupational Dysfunction and Metabolic Syndrome in Community-Dwelling Japanese Adults in a Cross-Sectional Study: Ibara Study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijerph15112575.	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 -

1. 著者名 Noriyoshi Ogino, Koichiro Miyagawa, Kenjiro Nagaoka, Yuki Matsuura-Harada, Shihona Ogino, Masashi Kusanaga, Shinji Oe, Yuichi Honma, Masaru Harada, Masamitsu Eitoku, Narufumi Suganuma, and Keiki Ogino	4. 巻 13
2. 論文標題 Role of HO-1 against Saturated Fatty Acid-Induced Oxidative Stress in Hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 993-993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13030993	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 草永 真志, 大江 晋司, 荻野 学芳, 南 創太, 宮川 恒一郎, 本間 雄一, 原田 大
2. 発表標題 過剰な銅と脂肪酸による肝細胞障害と亜鉛の保護作用
3. 学会等名 第4回G-PLUS
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Honma Y, Kusanaga M, Ogino N, Minmai S, Oe S, Miyagawa K, Harada M.
2. 発表標題 Hepatitis C virus infection inhibits autophagic flux via induction of endoplasmic reticulum stress.
3. 学会等名 AASLD 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間 雄一, 林 倫留, 草永 真志, 荻野 学芳, 南 創太, 宮川 恒一郎, 大江 晋司, 原田 大
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染によるオートファジーの抑制と細胞ストレス
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本間 雄一, 草永 真志, 荻野 学芳, 林 倫留, 南 創太, 大江 晋司, 日浦 政明, 原田 大
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス感染による小胞体ストレスの誘導とオートファジーの抑制
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 草永 真志, 大江 晋司, 荻野 学芳, 南 創太, 宮川 恒一郎, 本間 雄一, 原田 大
2. 発表標題 銅による細胞障害に対する亜鉛の保護作用
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 荻野 学芳, 草永 真志, 南 創太, 宮川 恒一郎, 大江 晋司, 本間 雄一, 原田 大
2. 発表標題 エイコタペンタエン酸はオートファジーを介して飽和脂肪酸による肝細胞障害を軽減する
3. 学会等名 第53回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荻野 学芳, 草永 真志, 南 創太, 宮川 恒一郎, 大江 晋司, 本間 雄一, 日浦 政明, 原田 大
2. 発表標題 パルチミン酸で惹起される肝細胞障害に対するエイコサペンタエン酸の効果
3. 学会等名 第49回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荻野 学芳, 宮川 恒一郎, 草永 真志, 南 創太, 大江 晋司, 本間 雄一, 原田 大
2. 発表標題 肝での遊離脂肪酸によるオートファジーの変化と小胞体ストレスの解析
3. 学会等名 第3回G-PLUS ホテルイースト21(東京)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriyoshi Ogino, Hidekazu Takahashi, Koichiro Miyagawa, Shinji Oe, Masashi Kusanaga, Yuichi Honma, Masaru Harada, Narufumi Suganuma and Keiki Ogino.
2. 発表標題 HIGH GLUCOSE INDUCED SECRETION OF ARGINASE-1 FROM HEPATOCYTE AS AN EXOSOMAL PROTEIN IN A MICE MODEL OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE (NAFLD)
3. 学会等名 AASLD 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------