

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19887

研究課題名(和文)p62によるNASH制御の分子機構の解明 脂肪酸エネルギー代謝からのアプローチ

研究課題名(英文)Understanding of molecular mechanism for inhibition of NASH development by p62-Approach in terms of fatty acid energy metabolism

研究代表者

正田 純一(Shoda, Junichi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90241827

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文): p62遺伝子欠失(p62-KO)マウスは過食肥満により単純性脂肪肝を発症する。このマウスに高脂肪食を摂餌させると高度の炎症・線維化を伴う脂肪性肝炎(NASH)を発症した。そのメカニズムとして、p62が遊離脂肪酸(FFA)への代謝に関わり、p62-KOマウス肝のFFAとfatty acyl-CoAの不均衡が生じている可能性が示唆された。p62-KO培養肝細胞(Hepa1-6)では、oleic acid投与によって野生型細胞よりも中性脂肪(TG)の蓄積が起こりやすくなっており、その原因としてp62欠失によってTGをFFAに代謝する新たな経路であるlipophagyが関わっていることが推測された。

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、単純性脂肪肝から発生し、肝硬変、肝癌へ進行する致死性の疾患にも関わらず、その発症機序は未解明で、確立された薬物治療も存在しない。本研究は、p62-KOマウスに高脂肪食を摂餌させるという簡便な方法でヒトNASHに類似する新規モデルを作製したことにより、NASHの発症メカニズム解明に寄与すると考えられる。また、p62がFFA代謝を介してNASHに対して防御的な役割を果たすことを示唆し、p62が新しいNASHの治療標的と成り得る可能性を示した点で意義が大きい。

研究成果の概要(英文): We generated p62 knockout (p62-KO) mice and demonstrated that these mice developed to simple steatosis in the livers by the obesity caused by hyperphagia. Moreover, we found that p62-KO mice developed severe steatohepatitis induced by a 60% high fat diet (HFD). We supposed the mechanism for the development of steatohepatitis in p62-KO mice fed HFD that p62 influenced free fatty acid (FFA) metabolism and resulted in the unbalance between FFA and fatty acyl-CoA in the hepatocytes. TG levels in p62-KO hepatocytes was increased compared with WT hepatocytes, and these results suggest that deletion of p62 could be associated with the functional change of lipophagy, the important and new system of the metabolism for TG to FFA. To elucidate the regulatory role of p62 in NASH more clearly, we plan to compare the phenotypes between p62-KO and p62 gene rescued mice in hepatocytes, and p62 knockout hepatocytes and WT hepatocytes.

研究分野：健康応用科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 NASH p62 脂肪酸代謝

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦の約 1000 万人は非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) と称される脂肪肝を伴う慢性進行性の肝障害に罹患している。NAFLD の 10-20% は肝硬変、肝癌へ進行する致死性疾患である Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) が含まれ、積極的な医療介入が必要である。

(2) 単純性脂肪肝を基礎に炎症、線維化を来す NASH への進展機序は十分に明らかになっていない。全身の脂肪酸代謝異常による肝細胞への脂肪沈着、脂肪毒性に加え、腸内細菌叢異常、内臓脂肪からの炎症シグナル、小胞体ストレスや酸化ストレスなど肝のみならず全身の多様な因子が関与する“ Multiple parallel hits hypothesis ”が提唱され支持されている (Hepatology, 2010)。

(3) NASH の発症進展メカニズムを探索するためには良質な動物疾患モデルが必要不可欠であるが、従来の NASH 病態動物は、肥満を伴わない、若年時から急激に病変が進展するなど、ヒトの病態とは乖離していた。

(4) 我々が作製した autophagy 制御因子である p62 の遺伝子欠失マウス ($p62$ -KO) に高脂肪食を投与すると、比較的短期間で強い肝炎症・線維化を伴う NASH を発症することを見出した。このモデルはヒト NASH に類似し、単純性脂肪肝から経時的に NASH を発症し、肝硬変し進行していく。

2. 研究の目的

(1) ヒト NASH に類似する高脂肪食投与 $p62$ -KO マウスを用いて、 $p62$ を介した NASH 発症メカニズムを探索する。

(2) NASH 発症機転における、 $p62$ の脂肪酸代謝を介した防御機構を解析する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験：5 週齢の野生型 (WT) および、 $p62$ 遺伝子欠失 ($p62$ -KO) マウスに 60% 高脂肪食 (HFD、オリエンタル酵母より購入) を摂餌させ、体重を経時的に測定した。HFD 摂餌 4, 8, 12, 16 週後のマウスより、血液、肝臓、白色 (内臓) 脂肪組織 (WAT)、褐色脂肪組織 (BAT) を採取した。対照は通常食摂餌マウスとした。

(2) 肝病理学的評価：肝組織について HE 染色および Sirius red 染色を行い、脂肪性肝炎の病勢を脂肪化、炎症、線維化の観点より SAF score によって評価した。

(3) 生化学的検討：AST, ALT, triglyceride (TG), LDL cholesterol (Cho), HDL-Cho, free fatty acid (FFA) を測定した (オリエンタル酵母へ測定を委託)。また、肝、WAT, BAT から脂質を抽出し、単位重量あたりの FFA と TG 量を測定した。

(4) 肝の炎症・線維化シグナル活性化：各種マウスの肝組織から mRNA を抽出し、定量的 PCR で炎症および線維化シグナル (TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1, α 1 procollagen) を解析した。

(5) 肝、WAT, BAT の脂肪酸代謝：各種マウスの肝、WAT, BAT から mRNA を抽出し、定量的 PCR で脂肪酸代謝に関わる因子を解析した。

(6) 肝細胞特異的 $p62$ 遺伝子レスキューマウスの作製： $p62$ 遺伝子のイントロンに、*LoxP* 配列で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナル配列を挿入したノックインマウス $p62^{KI/KI}$ を作製した。このマウスは、全身で $p62$ 遺伝子が欠損しており、 $p62$ -KO と同様の表現型を示す。次に、全身での $p62$ 遺伝子欠損下において、肝細胞特異的に $p62$ の発現をレスキューするために、上記マウスと、肝細胞特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現する Albumin-cre マウス (Jackson laboratory から購入) と交配した。これにより生まれる仔は、*Cre* が発現する肝細胞でのみ *LoxP* で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナルが除去されるため $p62$ の発現が肝細胞特異的にレスキューされる (最終的な遺伝子型は、 $p62^{KI/KI; Alb-cre/+}$)。

(7) 肝細胞の $p62$ ノックアウトによる脂肪酸代謝における $p62$ の機能解析：培養肝細胞 (マウス Hepa1-6 細胞) の $p62$ を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトし、脂肪酸 (oleic acid, palmitic acid) を投与し、中性脂肪の蓄積、 $p62$ の発現、脂肪酸代謝に関わる因子について、比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) $p62$ -KO マウスは HFD 摂餌により重症の脂肪性肝炎を発症する： $p62$ -KO は HFD 摂餌により WT よりも高度の肥満を呈した (図 1)。

更に、WT マウスより早期 (4 週) に肝の脂肪化が出現し、それに引き続いて 8 週で肝小葉の炎症と線維の伸びだし・線維化の進行が認められた (図 2)。当初 HFD 摂餌は 24 週間を予定していたが、16 週の時点で $p62$ -KO マウスの一部は偽小葉が完成し、肝硬変像を呈していた。

(2) $p62$ -KO マウスは強い肝障害を来す：血液生化学検査では、 $p62$ -KO で WT よりも有意な AST, ALT の上昇を認め、強い肝障害が認められた。一方、血中の脂質については、TG, FFA の基礎値は $p62$ -KO で軽度上昇していたものの、HFD 摂餌群では $p62$ -KO と WT 群で大きな差は認められなかった (図 3)。

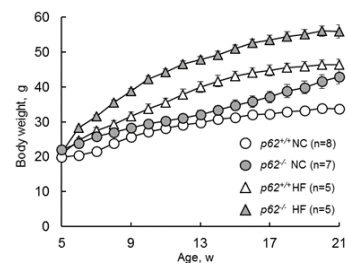


図1 $p62$ -KOマウスは肥満を呈す

また、肝組織では、*p62*-KO で肝重量の増加、FFA および TG 量の有意な増加が認められた。WAT, BAT は *p62*-KO で有意に重量が増加したが、単位重量あたりの FFA, TG 量については有意な差は認められなかった (図 4)。

(3) *p62*-KO マウスでは、肝の炎症・線維化シグナルの強い活性化が認められる：HFD 摂餌 *p62*-KO は約 8 週で肝 TNF- α , IL-1 β の mRNA が有意に増加し、経時的に増悪した。線維化シグナルについては、HFD 摂餌 *p62*-KO マウスにおいて軽度の TGF- β 1 発現増加、高度の α 1 procollagen 発現増加が認められた (図 5)

(4) *p62*-KO マウスでは、FFA と fatty acyl-CoA 代謝の不均衡が惹起される：*p62*-KO マウスでは、肝細胞の FFA の細胞外からの取り込み (CD36), 内因性脂肪酸合成 (FAS), 中性脂肪合成 (PPAR γ), 脂肪融解 (PGC1 α , HTGL), VLDL 分泌 (MTP) について、WT マウスと mRNA 発現の大きな差は認められなかった。一方、FFA を fatty acyl-CoA へ代謝する *Them2* が *p62*-KO マウスで有意に発現が増加し、逆に fatty acyl-CoA を FFA へ代謝する *ACSL1* の発現が *p62*-KO マウスで有意に発現が低下していた。更に、fatty acyl-CoA をミトコンドリア内へ移送し脂肪酸 β 酸化の原料として供する *CPT-1* の発現も *p62*-KO マウスで有意に発現が低下していた (図 6)。これらの結果は、*p62*-KO マウスでは、FFA と fatty acyl-CoA 代謝の不均衡が存在することを示唆し、*p62* の欠失が FFA への代謝を阻害している可能性が示唆された。

(5) HFD 摂餌で *p62* のタンパク、mRNA 発現は変化しないが、autophagy 調節因子である LC3 のタンパク発現低下が認められる：HFD 摂餌により、WT における肝組織の *p62* の発現は、タンパク、mRNA レベルとも変化を認めなかった。一方、autophagy の制御因子である LC3 が HFD 摂餌によりタンパク発現が低下しており (図 7), autophagy もしくは最近その存在が報告された lipophagy (中性脂肪を遊離脂肪酸へ代謝する新たな経路) の脂肪性肝炎における関与が示唆された。肝細胞における *p62* の役割をより明確にするために、肝細胞特異的 *p62* 遺伝子レスキューマウスと全身 *p62* 欠損マウスの特に肝組織での表現型を比較することを計画した。現在、肝細胞特異的 *p62* 遺伝子レスキューマウスの繁殖のため、*p62*^{K1/K1; Alb-cre/+} マウスと *p62*^{K1/K1} マウスの交配を行っている。

(6) *p62* の脂肪酸代謝における機能：当初は初代培養肝細胞を WT マウスおよび *p62*-KO マウスより分離して比較解析を行う計画であったが、分離を予定した 8 週齢の時点で *p62*-KO では既に全身の炎症が軽度ながら存在し、初代培養肝細胞がその影響を受け *p62* 遺伝子発現の有無を純粋に評価できない可能性があった。このため、マウスの正常肝細胞である Hepa1-6 細胞の *p62* を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトし実験に使用することとした。Hepa1-6 細胞に脂肪酸である oleic acid または palmitic acid を投与すると、*p62*-KO 肝細胞では中性脂肪の蓄積が WT と比較して軽度ではあるが、有意に増加していた。一方、FFA の蓄積は明らかでなく、また *p62*-KO による変化も明らかではなかった。

以上の研究から、*p62*-KO マウスに HFD を摂餌させると高度の脂肪性肝炎を発症した、この脂肪性肝炎では、高度の肝障害を来し、肝組織における炎症・線維化シグナルの強い活性化が認められた、脂質代謝のうち、特に FFA

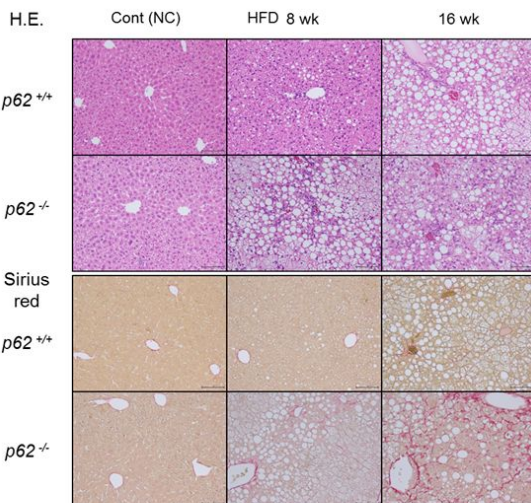


図2 *p62*-KOマウスは重症NASHを発症する

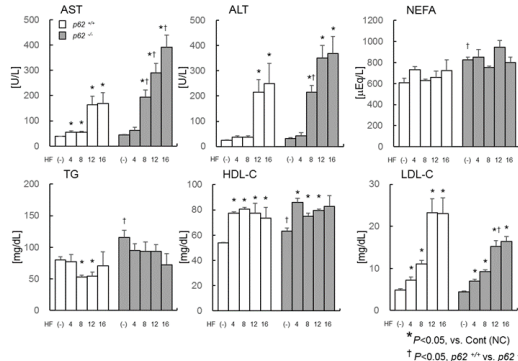


図3 *p62*-KOマウスは強い肝障害を呈す

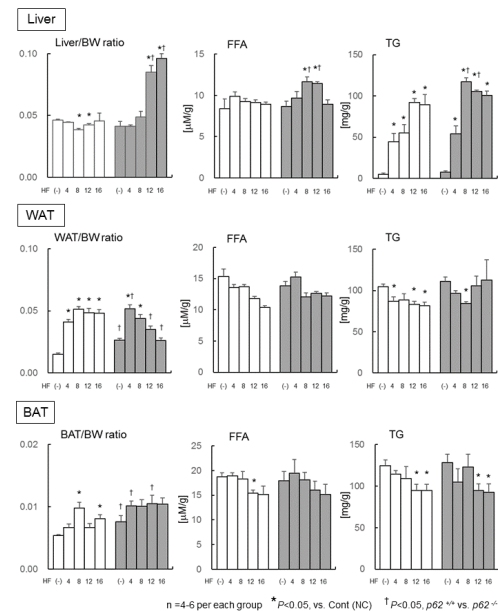


図4 *p62*-KOマウス肝には、TG, FFAが蓄積する

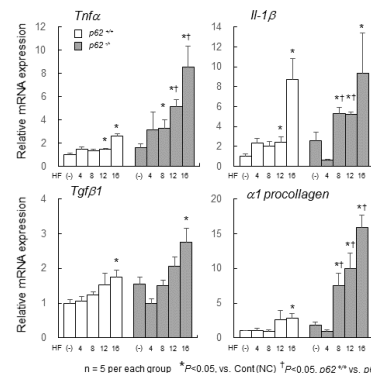


図5 *p62*-KOマウス肝では炎症・線維化シグナル活性化が認められる

の代謝経路に不均衡が認められた，肝組織と肝細胞での結果は必ずしも一致していないが，ともに lipophagy 調節因子である LC3 の発現が変化しており，p62 の欠失が中性脂肪を遊離脂肪酸に代謝する経路である lipophagy に影響を与えた結果 NASH 病変の発症および進展に關与することが示唆された．今後，肝細胞特異的 p62 レスキューマウスの表現型を比較解析することにより，肝細胞，特に脂肪酸代謝と lipophagy における p62 の役割を明らかにする．更に，p62-KO 肝細胞における脂肪酸β酸化の変化・異常を，細胞外フラックスアナライザーを用いて細胞レベルで検討し p62 の脂質代謝異常 lipophagy 異常への関連を探求し，最終的には NAFLD の病態を明らかにすることを目標とする．

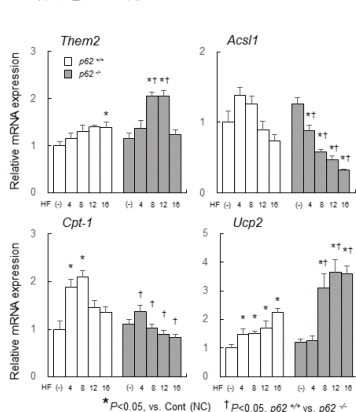


図6 p62-KOマウス肝では，FFA代謝が変化する

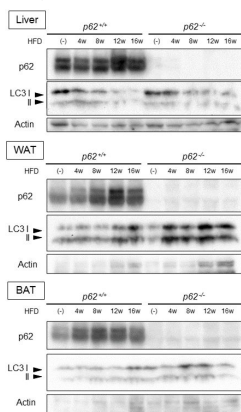


図7 p62の発現変化は，組織によって異なる

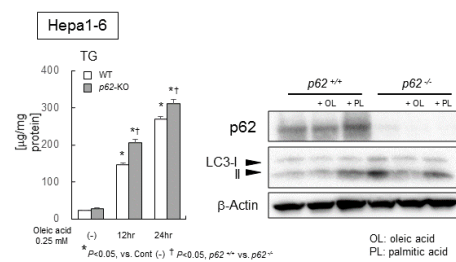


図8 p62-KO肝細胞では中性脂肪が蓄積し易くなる

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- (1) Yamashita-Kashima Y, Yoshimura Y, Fujimura T, Shu S, Yanagisawa M, Yorozu K, Furugaki K, Higuchi R, Shoda J, Harada N. Molecular targeting of HER2-overexpressing biliary tract cancer cells with trastuzumab emtansine, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Chemother Pharmacol.* 83(4): 659-671, 2019. (査読有)
- (2) Yamada M, Iwata M, Warabi E, Oishi H, Lira VA, Okutsu M. p62/SQST1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle. *FASEB J* 2019, *in press.* (査読有)
- (3) Ishii T, Warabi E. Mechanism of rapid nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) activation via membrane-associated estrogen receptors: Roles of NADPH oxidase 1, neutral sphingomyelinase 2 and epidermal growth factor receptor (EGFR). *Antioxidants (Basel).* 8(3): E69, 2019. (査読有)
- (4) Ishii T, Warabi E, Mann GE. Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to alternate activation of Nrf2 and c-Rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor. *Free Radic Biol Med.* 133: 169-178, 2019. (査読有)
- (5) Akiyama K, Warabi E, Okada K, Yanagawa T, Ishii T, Kose K, Tokushige K, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K, Ariizumi S, Yamamoto M, Shoda J. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously results in the development of nonalcoholic steatohepatitis. *Exp Anim.* 67(2): 201-218, 2018. (査読有)
- (6) Sumimoto A, Yukitake H, Hirai K, Horike K, Ueta K, Chung Y, Warabi E, Yanagawa T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Narumiya S, Hirano T, Niwa M, Sibille E, Hikida T, Sakurai T, Ishizuka K, Sawa A, Tomoda T. Ulk2 controls cortical excitatory-inhibitory balance via autophagic regulation of p62 and GABAA receptor trafficking in pyramidal neurons. *Hum Mol Genet.* 27(18): 3165-3176, 2018. (査読有)
- (7) Omori T, Uchida F, Oh S, So R, Tsujimoto T, Yanagawa T, Sakai S, Shoda J, Tanaka K, Bukawa H.: Exercise habitation is effective for improvement of periodontal disease status: a prospective intervention study. *Ther Clin Risk Manag* 14: 565-74, 2018. (査読有)
- (8) 正田純一 性差による臨床像の差違 - 胆石症- 胆と膵 39(6), 2018 . (査読有)
- (9) Oh S, Komine S, Warabi E, Akiyama K, Ishii A, Ishige K, Mizokami Y, Kuga K, Horie M, Miwa Y, Iwakaki T, Yamamoto M, Shoda J. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles. *Sci Rep.* 7(1):12902, 2017. (査読有)
- (10) Komine S, Akiyama K, Warabi E, Oh S, Kuga K, Ishige K, Togahi S, Yanagawa T, Shoda J. Exercise training enhances in vivo clearance of endotoxin and attenuates inflammatory responses by potentiating Kupffer cell phagocytosis. *Sci Rep.* 7(1):11977, 2017. (査読有)
- (11) Shida T, Akiyama K, Oh S, Sawai A, Isobe T, Okamoto Y, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K, Onizawa K, Tanaka H, Iijima H, Shoda J. Skeletal muscle mass to visceral fat area ratio is an important determinant affecting hepatic conditions of non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 53(4):535-547, 2017. (査読有)
- (12) Oh S, So R, Shida T, Matsuo T, Kim B, Akiyama K, Isobe T, Okamoto Y, Tanaka K, Shoda J.

High-intensity aerobic exercise improves both hepatic fat content and stiffness in sedentary obese men with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled study. *Sci Rep.*7, 43029, 2017. (査読有)

- (13) Tazuma S, Unno M, Igarachi Y, Inui K, Uchiyama K, Kai M, Tsuyuguchi T, Maguchi H, Mori T, Yamaguchi K, Ryozaawa S, Nimura Y, Fujita N, Kubota K, Shoda J, Tabata M, Mine T, Sugano K, Watanabe M, Shimosegawa T. Evidence-based clinical practice guidelines for cholelithiasis 2016. *J Gastroenterol.*52(3):276-300, 2017. (査読有)
- (14) Shoda J, Matsuda A, Shida T, Yamamoto M, Nagino M, Tsuyuguchi T, Yasaka T, Tazuma S, Uchiyama K, Unno M, Ohkohchi N, Nakanuma Y, Kuno A, Narimatsu H. Wisteria floribunda Agglutinin-Sialylated Mucin Core Polypeptide 1 is a Sensitive Biomarker for Biliary Tract Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multicenter Study. *J Gastroenterology.*52(2), 218-228, 2017. (査読有)
- (15) Le Q, Tabuchi K, Warabi E, Hara A. The role of peroxiredoxin I in cisplatin-induced ototoxicity. *Auris Nasus Larynx.* 44(2):205-212, 2017. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 押田夏海, 小峰昇一, 岡田浩介, 鈴木英雄, 正田純一. 慢性肝疾患における筋損傷マーカー-Titin N-fragment の尿中測定とその臨床的意義. 第 42 回肝臓学会東部会. 2018 年 12 月 7 日, 東京.
- (2) 小峰昇一, 岡田浩介, 藤 栄治, 正田純一. 過食肥満マウスにおける継続的走運動は Kupffer 細胞の異物貪食能の増大と形質変化を誘導する. 第 42 回肝臓学会東部会. 2018 年 12 月 7 日, 東京.
- (3) 呉 世昶, 正田純一. NAFLD の運動療法による病態改善効果とヘパトカイン, マイオカイン, アディポカインの変動. 第 42 回肝臓学会東部会. 2018 年 12 月 7 日, 東京.
- (4) 岡田浩介, 志田隆史, 正田純一. 骨格筋減少と内臓脂肪増加の体組成異常は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を悪化進展させる. 第 54 回肝臓学会総会. 2018 年 6 月 14 日, 大阪.
- (5) 岡田浩介, 志田隆史, 正田純一. 骨格筋減少と内臓脂肪増加による体組成異常は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を悪化させる. 第 104 回消化器病学会総会. 2018 年 4 月 20 日, 東京.
- (6) 秋山健太郎, 藤 栄治, 正田純一. NASH 自然発症マウスにおける腸内細菌叢と腸管上皮バリア機能の異常. 第 21 回日本肝臓学会総会. 2017 年 10 月 12 日~2017 年 10 月 15 日, 福岡.
- (7) 志田隆史, 押田夏海, 秋山健太郎, 呉 世昶, 磯辺智範, 岡本嘉一, 正田純一. 体組成異常が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の肝病態に及ぼす影響. 第 103 回日本消化器病学会総会. 2017 年 4 月 20 日~2017 年 4 月 22 日, 東京.

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 正田純一 中山書店 消化器診療マニュアル: 胆石の形成機序, 2018.
- (2) 正田純一 中山書店 膵・胆道疾患診療の最前線: 胆石の形成機序 80-83, 2018.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

藤 栄治 (WARABI Eiji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 70396612

(2) 岡田 浩介 (OKADA Kosuke)

筑波大学附属病院・病院講師

研究者番号: 80757526