

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06656

研究課題名(和文) NASH/NAFLD病態におけるミトコンドリア因子MAIP1の機能解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of a mitochondrial protein MAIP1 in NASH/NAFLD.

研究代表者

酒井 英子(小河英子)(SAKAI, EIKO)

大阪大学・薬学研究科・特任研究員

研究者番号：60359859

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)：我々は以前にNASH/NAFLD患者で発現上昇が認められるmiR-27bの新規標的遺伝子MAIP1を同定し、MAIP1の発現低下は培養肝細胞への脂質蓄積および細胞の酸化的リン酸化機能低下を招くことを見出した。本検討では、MAIP1の発現低下がミトコンドリア機能の低下および電子伝達系複合体1機能の低下と活性酸素種の増大を招くこと示した。複合体1の障害は活性酸素の産生を増大させゲノム損傷や炎症を誘導すると考えられることから、NASH/NAFLD病態との関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、MAIP1の発現低下が脂質蓄積だけではなくミトコンドリア機能の低下および酸化ストレスの発生を誘導することを明らかとした。さらに、その原因として電子伝達系機能の阻害があることを示した。これにより、NASH/NAFLD病態に対して、ミトコンドリア機能の抑制と酸化ストレスを介してMAIP1が寄与する可能性を示した。これらの知見はMAIP1を標的とした創薬・治療法の開発に向けた基盤をなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have previously identified a novel target gene of miR-27b, MAIP1. miR-27b is reported to be unregulated in NASH/NAFLD patients. Also we have shown that knockdown of MAIP1 in a cultured hepatocarcinoma cell line induced lipid accumulation as well as down-regulation of oxidative phosphorylations. In this study, we observed that knockdown of MAIP1 resulted in defects of a variety of mitochondrial functions, such as membrane potentials, oxygen consumption rate of complex 1, resulting in increased ROS production and increased lesion in mitochondria genomes. These results suggested potential contribution of decreased MAIP1 expression in NASH/NAFLD.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝臓 脂質 酸化ストレス マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

NASH/NAFLD はメタボリックシンドロームを背景に近年罹患率が増大の一途をたどる疾患であり、世界的な問題となっている。NAFLD の初期は肝臓への脂質沈着を主症状とする単純脂肪肝であるが、細胞への過剰な脂質蓄積が長期間持続することにより炎症性病態 NASH へと進行し、一部は肝繊維化が進み肝硬変へと移行する。肝硬変までに進行した場合の病態改善は困難であり、高い確率で肝がんを発症し死に至るため、早期治療が求められる。しかしながら、進展のメカニズムは明らかではなく有効な治療法は未だ確立されていない。

NASH/NAFLD 病態にはミトコンドリア機能が深く関わる。ミトコンドリア機能が障害を受けると、酸化の過程が阻害されるため肝細胞への脂質沈着が誘導され、また、ミトコンドリアで行われる酸化的リン酸化反応が阻害されると著しい酸化ストレスの亢進が起きるため、ミトコンドリア機能の不全は肝障害・肝繊維化の要因となる。

miR-27b は様々な脂質代謝異常症との関連が注目されるマイクロ RNA であり、NASH/NAFLD においても患者血清中のレベルが上昇することが報告されている (Tan et al., 2014)。申請者はこれまでに、miR-27b が培養肝細胞への脂質蓄積作用を持ち、miR-27b の標的遺伝子 MAIP1 がその作用を媒介することを観察した。一方 MAIP1 の発現抑制は酸化的リン酸化を阻害することを観察し、酸化的リン酸化の阻害に伴って発生すると推測される ROS による肝繊維化との関連が示唆された。MAIP1 はミトコンドリア局在タンパク質であり、カルシウム輸送複合体サブユニットのミトコンドリア内膜局在に働くことが知られるが (Koenig T et al., 2016)、それ以外の機能については未知である。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、まず、肝細胞の脂肪酸の酸化と電子伝達系反応における MAIP1 の作用機序を明らかとし、MAIP1 の脱制御が脂質代謝と酸化ストレスの異常を導く分子基盤を解明することである。また、マウスを用いて生体肝における MAIP1 発現低下と肝臓機能との関連について評価を行い、NASH/NAFLD 病態形成における MAIP1 の寄与を明らかとすることである。

## 3. 研究の方法

細胞レベルでの検討のために、肝がん細胞株 Huh-7 細胞に siRNA を 10nM でトランスフェクションすることによりノックダウンし、3 日目に各種評価を行った。ミトコンドリア形態は、生細胞を MitoHunt Green でミトコンドリアを染色し観察した。ミトコンドリア量は、Western blotting により HSP60 を定量、また、ミトコンドリア ND1 遺伝子に対する qPCR によりミトコンドリアゲノムコピー数を定量し評価した。ミトコンドリア膜電位は生細胞に対して JC-10 アッセイにより評価した。ミトコンドリア ROS 産生は、生細胞を MitoSox Red を用いて染色し評価した。ミトコンドリアゲノムの損傷について、回収したミトコンドリアゲノムを用いて Lehle らによる LORD-Q アッセイに従って評価した。ミトコンドリア機能について細胞外フラックスアナライザーを用いた酸素消費量の測定により評価した。個別の電子伝達系複合体機能は、透過処理し各種基質を加えた細胞に対し、細胞外フラックス

アナライザーを用いた酸素消費量測定を行い評価した。マウス個体における機能の評価するために、siDIRECTを用いてマウス Maip1 に対する shRNA 配列を設計し、これを U6 プロモーター制御下に発現するカセットを作成したのちアデノウイルスベクターに搭載した。ウイルスの機能の検討は、アデノウイルス感染受容体 CAR を発現させたマウスメラノーマ細胞株 B16 に対して 2000vp/cell でウイルスを作用させ行った。また、C57B6J マウスに静脈内投与を行い、肝臓組織の内在性発現を評価した。

#### 4. 研究成果

【結果】 MAIP1の発現低下がミトコンドリア機能に及ぼす影響について細胞レベルでの検討を行った。Huh-7細胞でMAIPをノックダウンしたところ、細胞内ミトコンドリアの形態、ミトコンドリアマーカータンパク質量、ゲノムコピー数に顕著な変化は観察されなかった。一方、ミトコンドリア膜電位の低下が観察され、ミトコンドリア機能の低下が示唆された。また、ミトコンドリア由来ROSについて有意なROSの増大が認められた。これに伴い、ミトコンドリアゲノムの損傷の増加が観察された。ゲノムの損傷は長期的なミトコンドリア品質維持に影響を及ぼすことが予想され、病態への寄与が推察される。さらに、酸素消費量測定の低下が認められ、MAIP1の発現低下によるミトコンドリア機能の低下が支持された。膜透過処理を施した細胞をさらに解析した結果、電子伝達系複合体1の機能が有意に低下していた。複合体1はROSの産生に大きく寄与していることから、この機能低下によるROSの増大がミトコンドリアゲノム損傷を引き起こし、連鎖的に長期的なミトコンドリア機能低下を導く経路が示唆される結果となった。

一方、マウスMaip1に対するshRNAをsiDIRECTを用いて設計し、U6プロモーター制御下に発現するプラスミドを構築した。作成したプラスミドをマウス細胞株にトランスフェクションしノックダウン効率を検討したところ50%の抑制を示したため、これを搭載したアデノウイルスベクターを作製した。しかしながら、Car発現B16細胞に作用させたところ70%程度の内在性Maip1発現が残存しておりノックダウンは不十分であった。これをマウスに静脈投与を行なったが肝臓における十分なノックダウンが認められなかったため、本手法によるin vivoの機能評価は困難であると判断した。

【考察】 本研究により、MAIP1の発現低下が脂質蓄積だけではなくミトコンドリア機能の低下および酸化ストレスの発生を誘導することを明らかとした。さらに、その原因として電子伝達系機能の障害があることを示した。これにより、NAHS/NAFLD病態に対して、ミトコンドリア機能の抑制と酸化ストレスを介してMAIP1が寄与する可能性を示した。今後はノックアウトマウスの解析を通じて創薬標的としてのMaip1の可能性について明らかとすることが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本淳暉、酒井英子、鈴木瑠々香、櫻井文教、水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27bの新規標的遺伝子の脂質代謝制御機構に関する検討
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本淳暉、酒井英子、鈴木瑠々香、櫻井文教、水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27bの新規標的遺伝子の脂質分解制御機構に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 TARACENA Marcos、今泉務、酒井英子、櫻井文教、水口裕之
2. 発表標題 Functional analysis of a novel target gene of NASH/NAFLD-related microRNA miR-27b
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marcos Taracena, 今泉務, 酒井英子, 櫻井文教, 水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27bの新規標的遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第65回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marcos Taracena, 今泉務, 酒井英子, 櫻井文教, 水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27bの新規標的遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本淳暉、鈴木瑠々香、酒井英子、今泉務、櫻井文教、水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27b 新規標的遺伝子の脂質分解制御に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤本淳暉、酒井英子、鈴木瑠々香、今泉務、Marcos Taracena、櫻井文教、水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27b 新規標的遺伝子の脂質分解制御に関する検討
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田有香、酒井英子、Taracena Marcos、櫻井文教、水口裕之
2. 発表標題 NASH/NAFLD関連マイクロRNA miR-27b標的遺伝子MAIP1の機能解析
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会
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
---------	---------