

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15748

研究課題名(和文)オートファジーの多面的作用に着目したアルコール性肝障害の病態改善機序の解明

研究課題名(英文)Targeting autophagy to improve alcoholic liver disease

研究代表者

坂根 貞嗣 (Sakane, Sadatsugu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30817515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス培養肝細胞に対しエタノールを投与すると、オートファジー抑制を伴うアポトーシスの亢進と肝細胞脂肪蓄積が生じることを明らかにした。この表現型はオートファジー必須タンパクAtg7の欠損下では消失し、オートファジー亢進薬ラパマイシンの投与によって軽減したが、オートファジー抑制タンパクRubiconの欠損下では改善しなかった。また、マウスにエタノールを負荷する2種類のモデルにおいても、肝組織のオートファジー抑制を伴うアポトーシスの亢進と肝細胞脂肪蓄積を確認した。しかし、肝細胞特異的Rubicon欠損マウスにおいてはエタノール負荷によるオートファジー抑制は改善せず、肝病態も改善しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は過去に非アルコール性脂肪肝炎においてはオートファジー抑制タンパクRubiconが病態形成に関与し、Rubiconの抑制が非アルコール性脂肪肝炎を改善させることを報告した。本研究により、アルコール性肝障害においても非アルコール性脂肪肝炎同様にオートファジー抑制による肝脂肪蓄積および肝細胞死が生じていた一方で、アルコール性肝障害においてはRubiconの関与に乏しいことが明らかになった。今回明らかになったアルコール性肝障害と非アルコール性脂肪肝炎のオートファジー抑制機序の違いは、今後の脂肪肝治療を目指した研究において重要な知見となると考える。

研究成果の概要(英文)：Ethanol administration to cultured mouse hepatocytes resulted in enhanced apoptosis and lipid accumulation with suppression of autophagy. This phenotype disappeared in the absence of Atg7, which is an autophagy essential protein, and was relieved by the autophagy enhancer rapamycin. However, the phenotype did not disappear in the absence of Rubicon, which is an autophagy inhibitor. In two ethanol-loaded mouse models, enhanced apoptosis and hepatocyte lipid accumulation with suppression of autophagy in the liver were also observed. However, hepatocyte-specific Rubicon knockout mice showed no change in autophagy suppression, lipid accumulation, and hepatocyte apoptosis owing to alcohol treatment compared with wild type controls.

研究分野：消化器内科学

キーワード：アルコール性肝障害 オートファジー 細胞死 脂肪蓄積 脂肪肝 エタノール

1. 研究開始当初の背景

アルコール性肝障害において、エタノールは様々な機序により肝障害を増悪させる。エタノールの中間代謝産物であるアセトアルデヒドは肝細胞にとって毒性が極めて強く、細胞変性を来す。この際、細胞内には多くの非機能の変性蛋白質が蓄積し、組織学的に風船様変性と呼ばれる形態に至り、最終的に細胞死に至る。また、アルコール性肝障害においてはアセトアルデヒドの影響による脂肪酸合成の亢進やミトコンドリア酸化系の異常により肝脂肪蓄積を来し、肝障害の一因となっている。さらに、アルコール性肝障害においては、肝細胞からのエクソソームの放出が増加し、これが免疫細胞を活性化して炎症を惹起させる機序が報告されている。このように、変性蛋白質の増加、脂肪蓄積増悪、エクソソームを介した免疫反応増悪といった複数の機序が同時に併発しているため、ある一つの機序をターゲットとした薬剤を作成しても、アルコール性肝障害の改善に寄与する効果は限定的であり、現状では禁酒以外の有効な治療法は存在しない。

2. 研究の目的

オートファジーは様々な作用により肝病態を改善させ得る。オートファジーは細胞内の不要蛋白質を分解・除去する機能を持つため、オートファジーの亢進によって変性蛋白質を除去することができれば、細胞内の恒常性を維持し、肝細胞死を回避できる可能性が期待される。また、オートファジーは肝細胞において脂肪滴分解にも寄与している。申請者は過去に、肝臓でオートファジー亢進を来すマウスを作成し、高脂肪食摂取による肝脂肪蓄積と肝障害の軽減が見られることを報告した。オートファジー亢進により肝内脂肪分解を促進することでアルコール性および栄養過多の両者の結果として生じる脂肪蓄積を軽減し、病態改善に寄与する可能性がある。以上から本研究課題は、オートファジーの亢進によって、アルコール性肝障害における複数の肝障害増悪機序をコントロールすることで病態改善に寄与するかどうかを検討し、オートファジー促進によるアルコール性肝障害治療の可能性について検討するものである。

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞を用いた実験では、ADH 活性を有しエタノールを代謝可能と考えられているマウス肝細胞株 AML12 に対してエタノール投与を行った際の細胞死、肝脂肪蓄積について検討した。細胞死については、Caspase 3/7 活性と WST-8 assay により評価した。脂肪蓄積については、脂質取り込みのトランスポーターの発現、脂質合成系関連遺伝子発現、酸化活性について評価すると共に、BODIPY™ 493/503 と Hoechst33342 により脂肪滴と核を染色し、一細胞あたりの脂肪含有量を測定した。また、パフィロマイシンを用いた LC3 flux assay により Autophagy flux を測定することによりオートファジーの変化を評価し、オートファジー関連タンパク発現を検討することによりオートファジー変化の機序を検討した。さらに、AML12 のオートファジーを変化させた際の細胞死や脂肪蓄積の変化につき検討した。
- (2) マウスを用いた実験では、マウスにアルコールを負荷する方法としては、アルコール食を一定期間摂取後に大量のエタノール摂取を行うモデル(NIAAA モデル Bartola A, et al. Nat Protoc. 2013)と、気化したエタノールを連日暴露するモデル(気化エタノール暴露モデル Watanabe Y, et al. Int J Neuropsychopharmacol. 2014)を用いて、肝臓におけるオートファジーの変化と、肝細胞アポトーシスの変化、肝脂肪蓄積の有無につき検討した。続いて、オートファジー亢進薬として知られるラパマイシンの投与によりアルコール負荷モデルの表現型が変化するかどうかを検討した。また、肝臓においてオートファジー亢進を来す Alb-Cre Rubicon 1/1 マウスを作成し、アルコール負荷モデルにおける表現型を検討した。さらに、タモキシフェン誘導性に肝臓でオートファジー必須遺伝子 Atg7 をノックアウトできる Albumin-Cre ER Atg7 flox/flox マウスを作成し、肝臓における表現型につき検討した。

4. 研究成果

- (1) マウス肝細胞株 AML12 にエタノール投与を行うと、投与濃度依存的、投与期間依存的に Caspase 3/7 活性の上昇を伴う生細胞数の低下を認めた。エタノールによる肝細胞アポトーシスの亢進が示唆された。また同時に、投与濃度依存的な脂質合成系遺伝子発現の増加と、酸化関連遺伝子発現の増加を認め、細胞内脂肪滴蓄積の増加が観察された。そこで、AML12 に対するエタノール投与時のオートファジーの変化を検討するために LC3 flux assay を行ったところ、Autophagy flux の低下を認め、オートファジーの抑制が示唆された(図1)。エタノール負荷は肝臓にアポトーシスの誘導と脂肪蓄積、オー

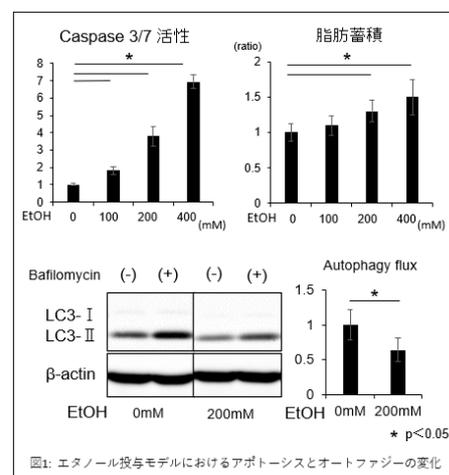
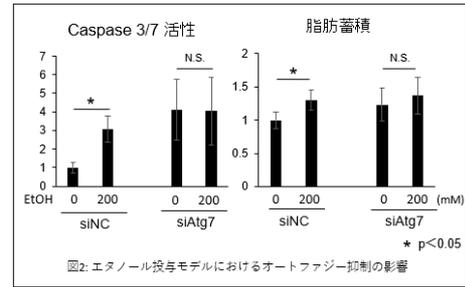


図1: エタノール投与モデルにおけるアポトーシスとオートファジーの変化

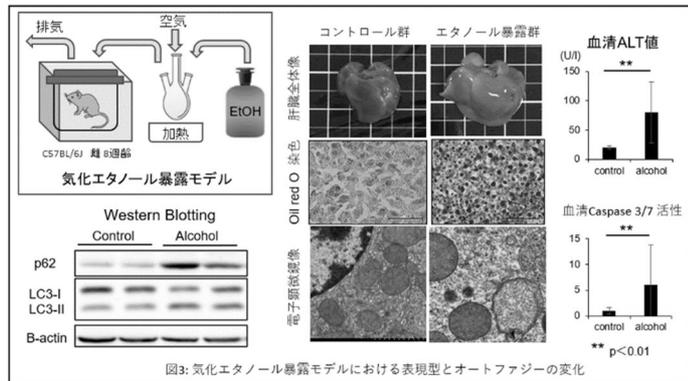
トファジの抑制を引き起こすことが示唆された。

- (2) マウス肝細胞株 AML12 にエタノール非投与下で siRNA を用いて Atg7 をノックダウンしてオートファジーを抑制させたところ、エタノール投与時と同程度のアポトーシスの亢進と脂肪滴蓄積増加が観察された。さらに、Atg7 ノックダウン下でエタノール投与を行うと、コントロール群で見られるアポトーシスの亢進と脂肪滴蓄積増加は観察されなかった(図2)。このことからエタノール投与による肝細胞オートファジー抑制が、アポトーシスの誘導と脂肪蓄積に関与している可能性が示唆された。



- (3) マウス肝細胞株 AML12 に対し、エタノール負荷後にラパマイシンを投与したところ、オートファジーの抑制は改善し、Caspase 3/7 活性上昇は軽減した。一方で、siRNA を用いてオートファジー抑制タンパク Rubicon をノックダウンさせたところ、オートファジーの抑制も改善されず、細胞死の軽減も認めなかった。この結果から、エタノール負荷によるオートファジー抑制が Rubicon 非依存的であること、オートファジー抑制の改善はアポトーシスの軽減につながることを示唆された。
- (4) 野生型マウス C57BL/6J に、NIAAA モデルを用いてアルコール負荷を行ったところ、肝脂肪蓄積の増加とアポトーシスの亢進を認めたのに加え、オートファジー関連蛋白 LC3- および p62 の蓄積を認め、電子顕微鏡によりオートファゴソーム様構造物の蓄積を認め、オートファジーの抑制が示唆された。

- (5) 野生型マウス C57BL/6J に、気化エタノール暴露モデルを用いてアルコール負荷を行ったところ、本モデルにおいても肝脂肪蓄積の増加とアポトーシスの亢進を認めたのに加え、オートファジー関連蛋白 LC3- および p62 の蓄積を認め、電子顕微鏡によりオートファゴソーム様構造物の蓄積を認め、オートファジーの抑制が示唆された(図3)。異なる2つのマウスモデルにおいてアルコール負荷が肝細胞アポトーシスの誘導、肝脂肪蓄積、そしてオートファジー抑制を引き起こすことが示された。



- (6) Albumin-Cre Rubicon flox/flox マウスに対して NIAAA モデルと気化エタノール暴露モデルを用いて表現型を検討したところ、肝細胞オートファジーの抑制は改善されず、細胞死の軽減や脂肪蓄積軽減を認めなかった。培養細胞の結果と同様に、マウスモデルでのアルコール負荷のオートファジー抑制も Rubicon 非依存的であることが示唆された。
- (7) 野生型マウスに対する NIAAA モデルと気化エタノール暴露モデル中にラパマイシンを経口投与したが、mTOR 経路の抑制が見られたものの肝細胞オートファジーの改善を認めず、細胞死の軽減や脂肪蓄積軽減も認めなかった。mTOR 経路の抑制のみではアルコール負荷によるアポトーシスの改善には至らないことが示された。
- (8) タモキシフェン誘導性に肝細胞で Atg7 をノックアウトできる Albumin-Cre ER Atg7 flox/flox マウスを作成し、通常飼育したでタモキシフェン誘導後2週間および4週間の表現型を検討したところ、肝腫大を認め、培養細胞の検討と同様に、肝細胞アポトーシスの亢進を認めた。マウスにおいてもオートファジー抑制が肝細胞アポトーシス誘導と肝脂肪蓄積の一因となっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kumiko Shirai, Hayato Hikita, Sadatsugu Sakane, Yoichi Sasaki, Shinnosuke Kudo, Kenji Fukumoto, Yuta Myojin, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Rubicon-independent autophagy suppression causes liver injury in alcoholic liver disease.
3. 学会等名 The Liver Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hikita Hayato, Shirai Kumiko, Sakane Sadatsugu, Takehara Tetsuo
2. 発表標題 Change of hepatocyte autophagy in alcoholic liver disease
3. 学会等名 第39回アルコール医学生物学研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂根 貞嗣、疋田 隼人、竹原 徹郎
2. 発表標題 脂肪性肝疾患の病態における肝細胞オートファジーの関与
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白井 久美子、小玉 尚宏、竹原 徹郎
2. 発表標題 アルコール性肝疾患と非アルコール性肝疾患における肝細胞オートファジーの違い
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
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 協力 者	白井 久美子 (Shirai Kumiko)	大阪大学・医学部付属病院・医員 (14401)	