

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：37116  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2023  
課題番号：18K15766  
研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝におけるオートファジー障害機序の解明-カルシウム動態の関与-  
研究課題名（英文）Mechanism of Autophagy Disruption in Nonalcoholic Fatty Liver -Involvement of Calcium Dynamics  
研究代表者  
宮川 恒一郎（Miyagawa, Koichiro）  
産業医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20566434  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）の肝においてはオートファジーが抑制されており、病態進展に寄与すると考えられている。遊離脂肪酸が肝細胞におけるオートファジーに及ぼす影響を解析したところ、不飽和脂肪酸と異なり、飽和脂肪酸はオートファゴソームとライソソームの融合を抑制し、この障害は小胞体ストレスと相関してしていることを見出した。また、小胞体内のカルシウム濃度の低下が主な要因となっており、カルシウム輸送蛋白であるSERCAが関与していることを見出した。そこで、飽和脂肪酸によるオートファジー障害の改善をSERCA活性化薬に期待したが、残念ながらその効果は認めなかった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

「遊離脂肪酸とオートファジー」の研究は肝領域のみならず様々な領域でなされているが、現在のところ、オートファジーを促進する化合物はあるものの、超選択的に促進する化合物はなく、ヒトの疾患でオートファジーをターゲットにした治療は限られている。本研究によりオートファジーの障害機序を明らかにすることで「オートファジーの誘導」ではなく、「障害されたオートファジー機能の回復」という新たな治療戦略の基盤作りが可能となることを期待している。現在食事療法や運動療法が主体であるNASHにおいても、本研究によってオートファジーのメカニズムがさらに理解できれば、NASH治療の一助になると考える。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is suppressed in the liver of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and is thought to contribute to the pathogenesis of the disease. We analyzed the effects of free fatty acids on autophagy in hepatocytes and found that, unlike unsaturated fatty acids, saturated fatty acids inhibit the fusion of autophagosomes and lysosomes, and that this defect is correlated with endoplasmic reticulum stress. We also found that a decrease in calcium concentration in the endoplasmic reticulum was the main factor, and that SERCA, a calcium transport protein, was involved. Therefore, we expected SERCA activators to ameliorate autophagy impairment caused by saturated fatty acids, but unfortunately, we did not find such an effect.

研究分野：脂肪性肝疾患 オートファジー

キーワード：脂肪性肝疾患 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態には血清遊離脂肪酸による脂肪毒性が重要な役割を担っている。脂肪毒性の分子機構として、小胞体ストレス (ER stress) やユビキチン・プロテアソーム機能の低下が挙げられる (Endocrinology 2006、Metabolism 2009)。ユビキチン・プロテアソーム系の障害は異常蛋白蓄積から ER stress を惹起し、細胞はこれに対して小胞体ストレス応答 (UPR : unfolded protein response) で対応する。UPR の活性化とは別に、プロテアソーム活性の低下はオートファジーを誘導し、異常蛋白の選択的な排除に働くことが知られている (Hepatology 2008、JBC 2014)。しかし、肥満者の肝臓においてオートファジーは抑制されており (Cell Metabolism 2010)、遊離脂肪酸が引き起こす異常蛋白蓄積に対する細胞保護機能が損なわれている。従ってオートファジーの抑制は NASH の病態進展に深く関わる因子であると考えられるが、オートファジーの抑制機序については定まった見解がなく、現在までに我々は遊離脂肪酸が autophagic flux に与える影響を解析し、以下のような結果を得た。

高脂肪食マウスの肝臓において、オートファゴソーム蓄積が認められたが、オートファジーの選択的基質である p62 やユビキチンも増加しており、高脂肪食マウスの肝臓においては、オートファジーの後期段階 (1. オートファゴソームとライソソームの融合、2. ライソソームでの分解) が障害されていることが示唆された。そこで、詳細に autophagic flux を解析するため、培養肝細胞を不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸それぞれで処理し、autophagic flux に与える影響を検討したところ、不飽和脂肪酸と異なり、飽和脂肪酸暴露において高脂肪食マウスと同様に肝細胞内にオートファゴソームが蓄積していた。そこで、オートファゴソームの合成能と分解能を評価したところ、オートファゴソームの合成能は飽和脂肪酸暴露により変化しないものの、オートファジーの後期段階 (分解能) が障害されていた。オートファジーの後期段階をさらに解析したところ、飽和脂肪酸暴露において、ライソソーム機能の低下は認められなかったが、オートファゴソームとライソソームの融合が抑制されていた。また、この障害は飽和脂肪酸による小胞体ストレスの程度と相関しており、飽和脂肪酸による小胞体ホメオスタシスの破綻がオートファジー機能を抑制することがわかった。また、オートファジーは非選択的な分解のみならず、細胞内凝集体や異常ミトコンドリアを選択的に分解することが知られているが、飽和脂肪酸においては細胞内凝集体に対するオートファゴソームの選択的取り込みは障害されていなかったことを見出した (Am J Pathol 2016)。したがって、オートファジー機能を回復させることで、細胞内に蓄積した異常蛋白を除去することが可能となり、NAFLD の病態進展を負に制御することが可能となることが示唆された。

## 2. 研究の目的

小胞体ストレスが NAFLD/NASH モデルにおけるオートファジー障害を惹起することを明らかにしたが、小胞体ストレスと一言でいっても、小胞体ストレス誘導は様々な機序で惹起される。代表的なものは異常蛋白の蓄積であるが、もう一つは小胞体におけるカルシウムホメオスタシスである。異常蛋白蓄積のみならず、カルシウムホメオスタシスにも注目して NAFLD/NASH におけるオートファジー障害機序を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

培養細胞 ヒト肝癌細胞 (Huh7、Hep3B)、ヒト不死化肝細胞 (OUMS29) を使用。

遊離脂肪酸 飽和脂肪酸としてパルミチン酸 (c16:0)、不飽和脂肪酸としてオレイン酸 (c18:1) を使用。

オートファジーの評価 LC3 の Western blot、GFP-LC3 や 2 種類の蛍光蛋白 (GFP と RFP) を融合した tandem fluorescent-tagged LC3 (tf-LC3) を細胞に遺伝子導入、lysotracker によるライソゾームの可視化、電子顕微鏡によるオートファゴソーム、オートライソゾームの評価 これらを組み合わせて autophagic flux を評価。

細胞内カルシウムの評価 カルシウム指示薬である FURA2 の蛍光像を超高感度テレビカメラで撮影し、培養細胞内遊離カルシウム濃度をモニタ画面上で観察し、定量解析。

ER stress の評価 eIF2 のリン酸化、XBP1、BiP、JNK のリン酸化、CHOP を Western blot により評価する。また、異常蛋白蓄積についてはユビキチン化蛋白を指標として評価。

アポトーシスの評価 cleaved PARP、K18 fragment、cleaved caspase3 の Western blot と共焦点レーザー顕微鏡を用いた核の断片化、TUNEL 法により評価。

### 4. 研究成果

小胞体ストレスは様々な細胞内外からの刺激によって、小胞体内に異常蛋白質が蓄積することで引き起こされる。小胞体ストレス誘導剤としては tunicamycin、puromycin、thapsigargin などがある。Tunicamycin は糖鎖修飾を、puromycin は翻訳のプロセスを阻害することで蛋白質合成を阻害し、小胞体内に異常蛋白質の蓄積を惹起する。Thapsigargin は小胞体膜 SERCA の阻害剤であり、小胞体へのカルシウムイオンの取り込みを阻害すると同時に、小胞体から細胞質へのカルシウム漏出を引き起こし、小胞体ストレスを惹起する。これら 3 つの薬剤が肝細胞のオートファジーに及ぼす影響を検討したところ、tunicamycin と puromycin はオートファゴソームの合成を促進した。一方、thapsigargin はオートファゴソームの合成は促進せず、オートファゴソームとライソゾームの融合を阻害し、オートファジーに対して飽和脂肪酸と同様の影響を及ぼした。そこで、飽和脂肪酸暴露時の小胞体内カルシウム濃度を測定したところ、有意な低下を認めた。一方で不飽和脂肪酸暴露では変化がなかった。これらのことから、飽和脂肪酸は肝細胞において小胞体のカルシウムホメオスタシスを変化させ、小胞体ストレスの誘導、オートファゴソームとライソゾームの融合阻害を惹起している可能性が示唆された。飽和脂肪酸暴露によって引き起こされた小胞体ストレス誘導とオートファジー障害は、不飽和脂肪酸を投与することでレスキューされ、同時に小胞体内のカルシウム濃度低下も改善した。加えて、このレスキュー効果は SERCA を阻害することでキャンセルされることがわかった。また、飽和脂肪酸によるオートファジー障害、小胞体ストレス、細胞死、小胞体内のカルシウム量低下を不飽和脂肪酸が改善し、飽和脂肪酸のオートファジー障害に対する不飽和脂肪酸の保護効果は小胞体内のカルシウムを減少させると消失した。これらのことから、不飽和脂肪酸は小胞体内のカルシウム量を維持することにより脂肪毒性軽減効果を発揮すると考えられた。そこで、SERCA の活性化が飽和脂肪酸によるオートファジー障害や細胞障害を改善するとの仮説を立て、様々な SERCA 活性化薬を使用し飽和脂肪酸による脂肪毒性のレスキュー効果を評価したが、その効果は不十分であった。

一方で SERCA 活性化薬の一つの 6-gingerol には興味深い現象が見られた。6-gingerol は生姜に含まれる有機化合物であるが、肝癌由来細胞株の細胞増殖を抑制する効果を偶然発見した。機序としては mTORC1 および Akt Ser473 のリン酸化発現の抑制であることを *in vitro* で確認した。通常、mTORC1 の阻害は S6K の発現を低下させるが、S6K には mTORC2 に対する negative

feedback 機能があるため、mTORC1 阻害薬は mTORC2 の活性化を引き起こす。その結果 Akt Ser473 のリン酸化が惹起され、肝細胞癌の増殖抑制効果が発揮されないばかりか、肝発癌を助長する。しかし、6-gingerol にその現象は見られなかった。これは、mTORC1 阻害薬である rapamycin とは異なる現象であり、現在までに報告はされていない。6-gingerol の肝癌由来細胞株に対する作用をさらに解析し、臨床につながる新たな側面の探索を *in vitro* で現在行っている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sumida K, Doi T, Obayashi K, Chiba Y, Nagasaka S, Ogino N, Miyagawa K, Baba R, Morimoto H, Hara H, Terabayashi T, Ishizaki T, Harada M, Endo M.	4. 巻 695
2. 論文標題 Caspase-4 has a role in cell division in epithelial cells through actin depolymerization.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	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） 10.1016/j.bbrc.2023.149394.	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 Ogino N, Miyagawa K, Nagaoka K, Matsuura-Harada Y, Ogino S, Kusanaga M, Oe S, Honma Y, Harada M, Eitoku M, Suganuma N, Ogino K	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
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 -
1. 著者名 Ogino N, Miyagawa K, Kusanaga M, Hayashi T, Minami S, Oe S, Honma Y, Harada M.	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 Exp Cell Res	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 Kusanaga M, Oe S, Ogino N, Minami S, Miyagawa K, Honma Y, Harada M.	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 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 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 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮川恒一郎、隅田和広、草永真志、大江晋司、本間雄一、原田大
2. 発表標題 肝癌細胞株に対する6-gingerolの抗腫瘍効果の新たな側面
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2022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
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
---------------------------	-----------------------	----

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