

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15832

研究課題名（和文）NAFLD/NASHにおける小胞体ストレス及びオートファジー関連機序の解明

研究課題名（英文）Endoplasmic reticulum stress and autophagy-related mechanisms in NAFLD/NASH

研究代表者

林 倫留（Hayashi, Tsuguru）

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：70717785

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）：NASHの病態にはオートファジー機能異常及び小胞体ストレスが関連し、NASH患者では、糖尿病罹患率が高い。本研究では、小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルジン、ツニカマイシン、ピュロマイシンを培養細胞に負荷し、薬剤によりオートファジーの異なる反応（促進あるいは、後期段階の障害）を認める事を明らかにした。また、小胞体ストレス誘導剤単独では、Mallory-Denk Body(MDB)の形成を認めなかった。更に、インスリン抵抗性ではなく、糖単独で小胞体ストレスおよび酸化ストレスが生じた。小胞体ストレス誘導剤と高濃度の糖を同時に負荷する事で、小胞体ストレスが増悪する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の変化に伴い急増しているNASHの病態にはオートファジー機能異常及び小胞体ストレスが深く関連している事が報告されてきた。しかし、オートファジー機能異常と小胞体ストレスの相互作用に関しては不明な事が多い。また、NASH患者における高血糖が、小胞体ストレスとどのように関連しているか、明らかではなかった。今回の研究では、小胞体ストレスがオートファジー機能異常に与える影響は多様である事を示した。また、糖単独でも小胞体ストレスを悪化させる原因である事を明らかにした。これによって、NASHの病態には、小胞体ストレスや高血糖が相互に関係している事が判明した。

研究成果の概要（英文）：Autophagy dysfunction and endoplasmic reticulum stress are associated with the pathogenesis of NASH, and patients with NASH have a high incidence of diabetes mellitus. In this study, we loaded cultured cells with the endoplasmic reticulum stress inducers, thapsigargin, tunicamycin, and puromycin, and found that the drugs induce different responses in autophagy (accelerated or late-stage failure). In addition, the endoplasmic reticulum stress inducer alone did not induce Mallory-Denk body (MDB) formation. Furthermore, glucose alone, independent of insulin resistance, caused endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. ER stress was exacerbated by the simultaneous loading of ER stress inducers and high concentrations of glucose.

研究分野：肝疾患

キーワード：小胞体ストレス 酸化ストレス オートファジー

1. 研究開始当初の背景

生活スタイルの変更に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は急増している。近年の肥満やメタボリックシンドロームの流行により、全人口の約 4 分の 1 程度が NAFLD を発症していると報告されている。また、NAFLD 患者の増加に伴い、非ウイルス性の肝細胞癌 (HCC) の発生率が増加している。さらに、NAFLD は心血管イベントや他の癌のリスクとなる事が明らかになっており、NAFLD に関連する健康問題は、世界中で大きな問題になっている。しかし、NAFLD の中で 80% から 90% 程度は変化なく経過する。そのような 80% から 90% の人では、肝発癌や心血管イベントのリスクは高くない。一方で、NAFLD の中の 10% から 20% 程度の人では病態が進行して、肝硬変への進展・肝発癌・心血管イベントの発症等のリスクが高い。このように肝硬変や肝臓に進行する可能性がある病態を非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) とする。NASH の発症には様々な因子が関与しており、遺伝子因子・肥満による脂肪毒性・インスリン抵抗性による糖毒性・酸化ストレス・小胞体ストレス・オートファジー・腸管等の肝外臓器も含む臓器間ネットワーク等が関与している。NASH の病態は、これらの因子が複雑に関与している事が明らかになっているが、その詳細に関しては全て明らかになっている訳ではない。NASH の病態を明らかにする事は、肝硬変や肝発癌を減らす事につながると考えられ、肝疾患における最重要課題の 1 つである。

2. 研究の目的

NASH の発症には、オートファジーが関与している事が報告されている。オートファジーとは、オートファゴソームが細胞質の一部を取り囲み、リソソームと融合する事で分解する細胞内分解システムの 1 つである。オートファジーは、全身の臓器において、恒常性の維持に重要な役割を果たす事が報告されており、その役割は多岐にわたる。NASH との関連では、脂肪滴を蓄積した肝細胞ではオートファジーが抑制されている事が報告されている。また、異常蛋白蓄積により生じる小胞体ストレスも NASH の病態に深く関連している事が報告されている。小胞体ストレスは、肝脂肪化と悪性サイクルを形成し、インスリン抵抗性を悪化させる事で NASH の悪化を誘導する事が明らかになっている。我々は、飽和脂肪酸が小胞体ストレスを惹起し、オートファゴソームとリソソームの融合段階を阻害する事を報告した。しかしながら、小胞体ストレスとオートファジーが肝細胞でどのように関連しているか、全ては明らかではない。今回の研究の目的は、小胞体ストレスが肝細胞に対してどのようにオートファジーに影響を与えるか、明らかにする事である。また、上記に述べた因子で小胞体ストレスを増悪しうる因子についても検討する事にする。

3. 研究の方法

(1) 肝由来培養細胞 (ヒト肝癌細胞: Huh7、不死化ヒト肝細胞 OUMS29) において、小胞体ストレス誘導剤であるタブシガルジン、ツニカマイシン、ピュロマイシン投与を、時間及び濃度別に投与を行う。時間依存性や濃度依存性等ないか検討し、最適な投与濃度及び投与時間を設定する。また、Western blot で LC3 や p62 が上昇するか検討する。

(2) 最適な濃度や時間を元に、オートファジーの後期段階を抑制する Bafilomycin を投与して、タブシガルジン、ツニカマイシン、ピュロマイシン等によるオートファジーの亢進あるいは低下を LC-3 及び p62 を用いた Western blot で検討する。同時に、小胞体ストレスの評価目的に p-eIF2、XBP-1、CHOP を Western blot で検討する。アポトーシスの評価も cleaved PARP、K18、cleaved caspase 3 で行う。

(3) 高濃度の糖を肝由来培養細胞に負荷し、小胞体ストレス・酸化ストレス・オートファジー・アポトーシスがどのように変化するか、Western blot 及び免疫染色で検討する。また、小胞体ストレス誘導剤を高濃度の糖と併用した際に、小胞体ストレスがどのように変化するか、Western blot で検討する。

4. 研究成果

(1) タブシガルジンは、投与時間 12 時間以上・投与濃度 1 μ M 以上で小胞体ストレスは誘導される事を確認した。ツニカマイシンは、投与時間 12 時間以上・投与濃度 1 μ M 以上で小胞体ストレスは誘導される事を確認した。ピュロマイシンは、投与時間 12 時間以上・投与濃度 1 μ M 以上で小胞体ストレスが誘導される事を確認した。また、それらの条件下で、p62 及び LC3- の上昇を確認した。また、小胞体ストレス誘導剤単独では、Mallory-Denk Body (MDB) の形成を認めなかった。

(2) バフィロマイシンを併用する事で、オートファジーの動きを確認した。タブシガルジンにより小胞体ストレスが誘導されている状態では、オートファジーの後期段階の障害されている

事を確認した。また、mRFP-GFP-LC3 を用いて、autophagic flux の解析を行い、上記を確認した。一方で、ツニカマイシン及びピュロマイシンを併用し、小胞体ストレスが誘導されている状態では、オートファジーが亢進されている事を確認した。

(3) 時間依存性及び濃度依存性に、高濃度の糖は小胞体ストレス及び酸化ストレスを惹起し、アポトーシスを誘導した。また、過剰な糖による酸化ストレスは、抗酸化剤 (NAC) で改善したが、化学シャペロン (PBA) では改善しなかった。また、過剰な糖による小胞体ストレスは、化学量シャペロンで改善したものの、抗酸化剤では改善しなかった。また、小胞体ストレス誘導剤と高濃度の糖を併用すると、小胞体ストレスが増悪した。

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 4件）

1. 著者名 Hayashi Tsuguru, Tamaki Nobuharu, Kurosaki Masayuki, Wang Wan, Okada Mao, Higuchi Mayu, Takaura Kenta, Takada Hitomi, Yasui Yutaka, Tsuchiya Kaoru, Nakanishi Hiroyuki, Itakura Jun, Harada Masaru, Izumi Namiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Use of the Serum Wisteria floribunda Agglutinin-Positive Mac2 Binding Protein as a Marker of Gastroesophageal Varices and Liver-Related Events in Chronic Hepatitis C Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 173 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10030173	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 Hayashi Tsuguru, Tamaki Nobuharu, Kurosaki Masayuki, Wang Wan, Okada Mao, Higuchi Mayu, Takaura Kenta, Takada Hitomi, Yasui Yutaka, Tsuchiya Kaoru, Nakanishi Hiroyuki, Itakura Jun, Harada Masaru, Izumi Namiki	4. 巻 10
2. 論文標題 Use of the Serum Wisteria floribunda Agglutinin-Positive Mac2 Binding Protein as a Marker of Gastroesophageal Varices and Liver-Related Events in Chronic Hepatitis C Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 173 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics10030173	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 Hayashi Tsuguru, Shibata Michihiko, Oe Shinji, Miyagawa Koichiro, Honma Yuichi, Harada Masaru	4. 巻 15
2. 論文標題 C-reactive protein can predict dose intensity, time to treatment failure and overall survival in HCC treated with lenvatinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0244370 ~ 0244370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244370	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 Hayashi Tsuguru, Watanabe Tatsuyuki, Shibata Michihiko, Kumei Shinsuke, Oe Shinji, Miyagawa Koichiro, Honma Yuichi, Harada Masaru	4. 巻 11
2. 論文標題 Endoscopic injection sclerotherapy improves liver function compared with endoscopic variceal ligation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99855-z	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 林 倫留、大江 晋司、原田 大
2. 発表標題 糖による肝細胞障害機序の検討
3. 学会等名 第51回 臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 倫留、大江 晋司、原田 大
2. 発表標題 糖による肝細胞障害機序の検討
3. 学会等名 第56回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 倫留、柴田道彦、原田 大
2. 発表標題 Effect of antiplatelet therapy for HCC patients
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 林 倫留、柴田道彦、原田 大
2. 発表標題 Child-Pugh grade deterioration stratified by the etiology after transcatheter arterial chemoembolization as initial treatment for hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第2回 International Liver Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 倫留 渡邊龍之 原田 大
2. 発表標題 慢性肝疾患における大腸腫瘍の局在
3. 学会等名 第23回 日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 倫留、大江 晋司、原田 大
2. 発表標題 Mallory-Denk体による肝細胞保護作用
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 倫留、柴田道彦、原田 大
2. 発表標題 CRPはlenvatinibの内服期間及び予後を予測する
3. 学会等名 第56回 肝癌研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 倫留、柴田道彦、原田 大
2. 発表標題 Antiplatelet therapy improves the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 欧州肝臓学会 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
---------	---------