

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03643

研究課題名(和文) 脂肪肝の発症・病態を制御する新規脂肪酸代謝システム

研究課題名(英文) Fatty acid metabolic system that controls the pathophysiology of steatohepatitis

研究代表者

紙谷 聡英 (KAMIYA, AKIHIDE)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30321904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は脂肪酸代謝の重要器官であり、食事の欧米化などによるメタボリックシンドロームの進行は、非アルコール性脂肪肝、肝腫瘍などにつながる。我々は肝機能を制御する転写因子の一つであるBcl6が脂肪肝の病態制御に関わることを見出している。そこで本研究では、アデノ随伴ウイルスとゲノム編集酵素によるin vivo迅速遺伝子欠損誘導系を用いて、Bcl6の下流因子の機能解析を行った。また、ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いたin vitro脂肪肝誘導系の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、我々が見出した脂肪肝制御因子としてのBcl6の機能に着目し、その下流因子と病態との関連について解析した。Bcl6の下流で脂肪肝の病態を悪化させる可能性のある因子を複数同定しており、今後これらの因子の活性を阻害するような薬剤を見出すことで、現在増加しつつある非アルコール性脂肪肝の治療等に役立つと考えている。

研究成果の概要(英文)：The liver is an important organ for fatty acid metabolism, and the progression of metabolic syndrome leads to non-alcoholic steatohepatitis, liver tumors, and the like. We have found that Bcl6, one of the transcription factors that control liver function, is involved in the pathological control of steatohepatitis. Therefore, in this study, we analyzed the function of downstream factors of Bcl6 using an in vivo rapid gene deletion induction system using adeno-associated virus and genome editing enzyme. We also constructed an in vitro steatohepatitis induction system using human iPS cell-derived hepatocytes.

研究分野：肝臓生物学

キーワード：肝細胞 非アルコール性脂肪肝 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肥満などを介するメタボリックシンドロームは、高カロリー食の過剰摂取や運動不足等による全身のエネルギー代謝の悪化が原因となり、内臓脂肪の過度な蓄積や炎症・インスリン抵抗性による血糖値コントロール不良からなる糖尿病症状等を発症する。肝臓では脂肪の過剰蓄積に伴う脂肪肝や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)がメタボリックシンドロームの症状として知られる。内臓脂肪の炎症による血中遊離脂肪酸の増加に伴う肝臓への流入や肝臓における脂肪酸合成の促進によって過剰な脂肪の蓄積が生じ、脂質の過酸化等に伴う酸化ストレスが誘導される。機能細胞である肝細胞の壊死と再生が繰り返されることで、臓器の変性や細胞外マトリクスの蓄積による機能低下(肝硬変)・肝臓の発症へと進行する。一方で、過剰に脂肪が蓄積した脂肪肝の状態でも8割程度は肝臓を発症しないことから、単純な脂肪の蓄積以外にNASHを発症する機構が存在すると推察される。抗ウイルス薬の開発の一方で、非B、C型肝炎ウイルス由来のNASH等を原因とする肝硬変・肝臓が増加しており、この治療法開発が喫緊の重要課題となっている。

肝臓では取り込んだ脂質成分や余剰グルコースから脂肪酸を合成し、トリグリセリドとして肝内に蓄積する、またはコレステロール合成を通じて末端組織への放出を行っている。体内には食事摂取に加えて、合成・不飽和化などの修飾によって種々の脂肪酸が存在する。細胞質内のマロニル-CoA等が脂肪酸合成酵素の作用により、パルミチン酸へと合成される。その後、ミトコンドリア・小胞体内で Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1)等の作用による不飽和化や Elovl ファミリーによる長鎖伸長反応を受けて、様々な炭素数の脂肪酸が合成される。NASH患者のコホート解析から、肝臓内の脂肪蓄積量に加えてその質(脂質プロファイル変化)がメタボリックシンドロームやNASH病態と関連することが示された(Yamada et al., 2015など)。また、SCD1やElovlファミリーの一つであるElovl6欠損マウスを用いた解析から、肝臓等に蓄積される脂質プロファイルがこれらの脂肪酸修飾酵素の発現の有無で変化する一方で、インスリン耐性や糖代謝異常、脂肪肝の発症などのメタボリックシンドローム症状への影響が報告されている(Cohen et al., 2002, Matsuzaka et al., 2012など)。つまり、脂肪酸の量と質、その両方を制御することで脂肪肝からNASHへの発症抑制や治療できる可能性がある。

我々は発生過程の肝成熟を制御する転写因子群の網羅的スクリーニングの結果から、転写抑制因子 B cell Lymphoma 6 (Bcl6)に着目した。Bcl6はB細胞分化に重要な一方で、全身性欠損マウスの解析から肝臓や脂肪細胞における脂質代謝に関与することが知られる(LaPensee et al., 2014)。しかしこのマウスは短命であり、肝臓におけるBcl6の機能は不明であった。そこで、申請者らはBcl6<sup>Flox</sup>マウスと肝特異的Cre発現マウスであるAlbumin-Creマウスの交配により、肝特異的Bcl6欠損(Bcl6<sup>LKO</sup>)マウスを作成した(Chikada et al., 2018)。このマウスは正常に発生し野生型と同様の生殖能力を保持する。そこで、メチオニン・コリン欠乏性高脂肪食(CDAHFD食、肝臓への脂質の過剰蓄積を誘導する)を長期間給餌し、病態の解析を行った。野生型マウスではNASHに起因する肝障害や肝臓腫瘍の形成が誘導されるが、Bcl6肝臓欠損によってそれが抑制された(図1)。この際、Bcl6欠損によって、SCD1やElovl3といった脂肪代謝関連遺伝子の発現が減少することや肝臓での脂肪酸の蓄積量やプロファイルが変化することを見出している。

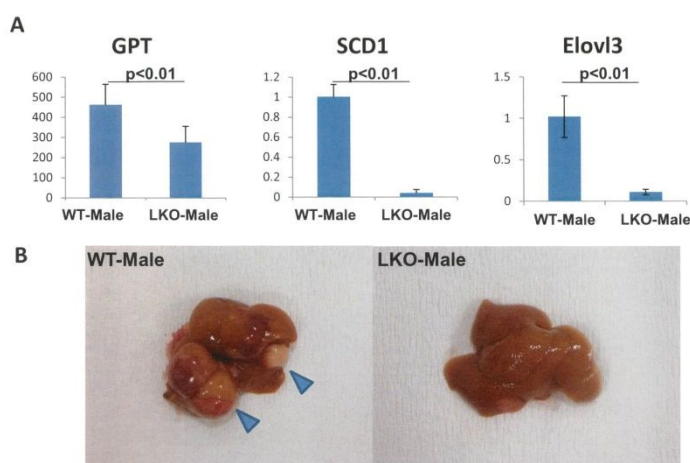


図1 (A)CDAHFD食の長期負荷による脂肪肝炎の誘導。肝特異的Bcl6欠損マウス(LKO)では肝障害(GPT)や脂肪酸修飾酵素の発現が抑制されている。(B)長期脂肪肝炎による発癌誘導。野生型マウスでのみ、大型の腫瘍(矢印)が多数観察される。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に発見したBcl6-LKOマウスの解析結果から、Bcl6下流シグナルが脂肪酸蓄積量や蓄積される脂肪酸組成の変化の制御を通じて病態に影響を与えるという新しい仮説を検証するために、*in vivo*マウスモデルを用いた、NASH発症過程における肝内脂肪酸の蓄積量の調整メカニズムの解明やNASH様肝障害・肝硬変を再現する*in vitro*ミニ肝臓組織の構築を目的として研究を推進する。

Bcl6下流シグナルの解析から肝臓内の脂肪酸の量や質を制御できるマウスモデルを構築しNASH病態解析を行うことで、メタボリックシンドロームによる臓器変性の鍵となる肝内のシグナル伝達機構を同定する。また遺伝子改変ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いたミニ肝臓組織を構

築し in vitro での NASH 様肝障害の誘導系を構築する。以上の in vivo, in vitro 両方の系を元に、Bcl6 下流経路の活性を制御する低分子化合物のスクリーニングなどを通じて新規 NASH 治療薬の開発、知的財産の取得への発展を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) アデノ随伴ウイルスを用いた迅速な肝特異的遺伝子発現・遺伝子欠損マウスの作製法

我々は、Bcl6 によって発現調節される複数の転写調節因子や NASH・脂肪酸代謝関連遺伝子を同定している。この遺伝子群と NASH 病態との関連性の正確な評価のためには個体レベルの病態モデル解析が必須と考えられる。我々はアデノ随伴ウイルスと肝特異的プロモーター・エンハンサーを用いて Bcl6 およびその下流因子を、マウス in vivo 肝臓で効率的に発現誘導することを可能にした。

一方で、CRISPR/Cas9 を用いた Triple CRISPR 法 (Sunagawa et al., 2015) などが報告されて、受精卵で直接に目的遺伝子欠損の高効率な誘発が可能となり、全身性の遺伝子欠損マウス作製は、ES 細胞を使用する以前の方法と比較して容易になった。しかし、臓器特異的欠損マウスの作製や既存の遺伝子改変マウスで別の遺伝子を新たに欠損させた多重遺伝子欠損マウスの作製には様々な生殖工学的な手技や交配などに長期間の時間を要する。

そこで我々は、成体マウスの肝臓特異的な遺伝子欠損を簡便・迅速に誘発可能な系を独自に確立した。ゲノム編集酵素 SaCas9 タンパク質を肝臓特異的なプロモーター搭載型 AAV を用いて成体マウスに導入するとともに、目的の 1 遺伝子あたり 3 種類の gRNA を同時に遺伝子導入することで、成体肝臓特異的に目的遺伝子の欠損を誘導する。実際に、従来法 (Cre-LoxP 配列を用いて遺伝子工学的に作製した) の Bcl6LKO マウスと同様の表現型 (標的遺伝子の発現変化) を示すマウスを、AAV を用いて SaCas9 と Bcl6gRNA を野生型マウスに導入することで短期間に作製できた (図 2)。

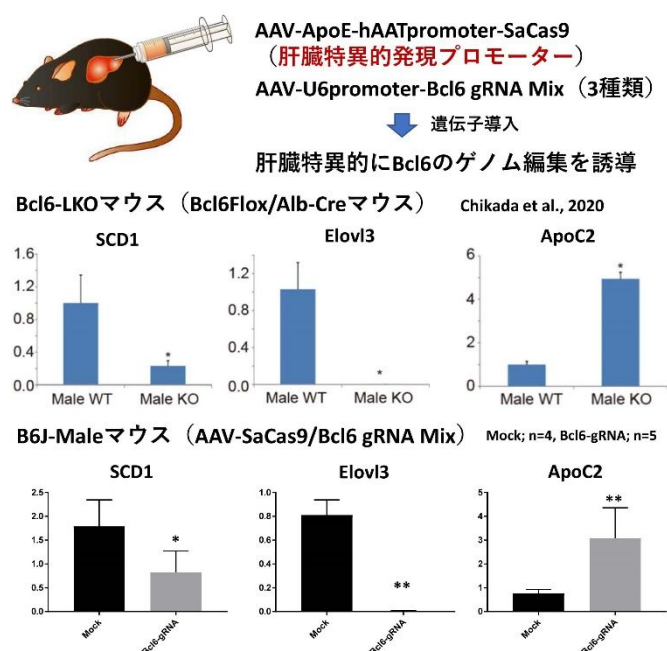


図2 AAVによる迅速な肝特異的遺伝子欠損マウスの作製

### 4. 研究成果

#### (1) NASH 肝癌発症過程における肝内脂肪酸の蓄積量の調整メカニズムの解明

Bcl6 は、BCOR や HDAC などのポリコム・エピジェネティック関連因子との結合を介して、ターゲット遺伝子の発現を抑制する転写調節因子として知られている。そこで、Bcl6LKO および野生型マウス肝臓でのマイクロアレイ発現解析を行い、Bcl6 によって制御される脂質代謝遺伝子や転写調節因子を網羅的に探索した。その結果、SCD1 や Elovl3 のような脂肪酸代謝関連酵素群に加えて、Bcl6 によって発現制御される複数の転写調節因子を同定した。さらに、PNPLA3, TM6SF2, HSD17B13 といった GWAS により NASH 発症リスクとの関連が報告された遺伝子群 (Romeo et al., 2008 等) の発現が Bcl6 欠損によって変化することを見出している。そこで、野生型マウス肝臓にアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて Bcl6 強制発現を行った結果、短期間で NASH 様の過剰な肝臓内脂肪酸の沈着や肝傷害マーカーが誘導され、過剰な Bcl6 発現が直接 NASH 病態を促進することを見出した (図 3)。このことから、Bcl6 下流で制御される肝機能遺伝子が直接肝臓における脂肪酸蓄積や炎症の誘導に関与することが明らかとなった。

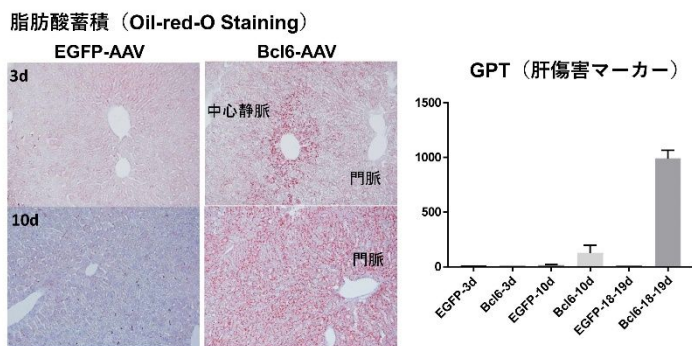


図3 Bcl6過剰発現によるNASH誘導

成体マウス肝臓にAAVを用いてBcl6を強制発現した結果、コントロール (EGFP-AAV) と比較して、発現誘導後3-10日で急速な脂肪肝の進展が見られるとともに、18日以降には強い肝傷害が誘導された。

Bcl6 は転写抑制因子として知られ、様々な遺伝子や miRNA の発現抑制に関わることが報告されている。そこで、Bcl6LKO マウス肝臓および AAV による Bcl6 強制発現マウス肝臓を用いて、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行った。その結果、Bcl6 によって制御される脂肪酸代謝関連因子を複数同定した。これらの遺伝子が Bcl6 による NASH 病態を制御する候補因子と考え、上記の系を用いて遺伝子発現または欠損マウスの作製を進めている。

## (2) NASH 様肝障害・肝硬変を再現する in vitro ミニ肝臓組織の構築

NASH 等の慢性肝炎等が進行した重篤な肝疾患に対しては肝移植が根治療法となるがドナー不足等が問題であり、増殖性と分化能に富んだヒト多能性幹細胞を用いた再生医療が注目されている。我々は、以前に同定した肝前駆細胞マーカー CD13 および 133 を用いてヒト iPS 細胞からの肝幹・前駆細胞の分離・培養を行った。得られたヒト iPS 細胞由来肝前駆細胞は通常条件下では長期増殖や凍結保存が可能な一方で、細胞外マトリクスの添加などで成熟化を任意に誘導可能である。

そこで、この系を用いて NASH 様の肝細胞死を in vitro で誘導する系を構築した。ヒト iPS 細胞より分化誘導した肝前駆細胞・肝細胞を用いた脂肪酸添加実験では、脂肪酸の過剰蓄積だけでは細胞死の誘導は見られず、単純脂肪肝の状態を再現していると考えられた。そこで、この培養系に炎症性サイトカインやストレス誘導剤などを添加し、脂肪酸添加と共同して細胞死を誘導できるかスクリーニングを行った。その結果、脂質の蓄積に加え小胞体 (ER) ストレスを付加することで、ヒト iPS 細胞由来肝細胞の細胞死が効率的に誘導されることを見出した。次に、この NASH 病態モデルの細胞死誘導に伴い発現上昇するタンパク質の発現解析、網羅的プロテオーム解析を行った。その結果、ER ストレスや炎症応答に関わるタンパク質などの上昇が確認された。以上の結果より、ヒト肝細胞の脂肪肝誘導には、脂肪酸の過剰蓄積に加えて ER ストレスが重要な因子であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Hamada T, Nakamura A, Soyama A, Sakai Y, Miyoshi T, Yamaguchi S, Hidaka M, Hara T, Kugiyama T, Takatsuki M, Kamiya A, Nakayama K, Eguchi S.	4. 巻 16
2. 論文標題 Bile duct reconstruction using scaffold-free tubular constructs created by Bio-3D printer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regen Ther.	6. 最初と最後の頁 81-89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.02.001.	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 Kasahara D, Sumiyoshi H, Endo H, Yanagawa T, Nakano Y, Matsuki Y, Nakao S, Kamiya A, Kimura H, Inagaki Y.	4. 巻 528
2. 論文標題 Visualization and isolation of zone-specific murine hepatocytes that maintain distinct cytochrome P450 oxidase expression in primary culture.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 420-425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.202.	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 Chikada H, Ida K, Nishikawa Y, Inagaki Y, Kamiya A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Liver-specific knockout of B cell lymphoma 6 suppresses progression of non-alcoholic steatohepatitis in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 9704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66539-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 -
1. 著者名 Sato A, Kakinuma S, Miyoshi M, Kamiya A, Tsunoda T, Kaneko S, Tsuchiya J, Shimizu T, Takeichi E, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Vasoactive Intestinal Peptide Derived from Liver Mesenchymal Cells Mediates Tight Junction Assembly in Mouse Intrahepatic Bile Ducts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 235-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1459.	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 Tsunoda T, Kakinuma S, Miyoshi M, Kamiya A, Kaneko S, Sato A, Tsuchiya J, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Sogo T, Komatsu H, Mukouchi R, Inui A, Fujisawa T, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Loss of Fibrocystin Promotes Interleukin-8-Dependent Proliferation and CTGF Production of Biliary Epithelium.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hepatol.	6. 最初と最後の頁 143-152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2019.02.024.	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 Miyoshi M, Kakinuma S, Kamiya A, Tsunoda T, Tsuchiya J, Sato A, Kaneko S, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M.	4. 巻 9
2. 論文標題 LIM homeobox 2 promotes interaction between human iPS-derived hepatic progenitors and iPS-derived hepatic stellate-like cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37430-9.	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 1件)

1. 発表者名 紙谷聡英
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来肝前駆細胞の増殖・成熟化を制御する内在性因子の探索
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihide Kamiya
2. 発表標題 Maturation of hepatic progenitor cells regulated by Kruppel-like transcription factors
3. 学会等名 CSH Asia Liver conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海大・医・紙谷聡英研究室  
<https://akihkamiya.wixsite.com/tokai-u-kamiya-lab>

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		
カナダ	the McGill University Health Center		