

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08473

研究課題名(和文)熱ショック蛋白Apg-2のリポファジー抑制を介した肝脂肪化、肝発がん機序の解明

研究課題名(英文)The role of heat shock protein Apg-2 in hepatic lipogenesis and hepatocarcinogenesis by the inhibition of lipophagy

研究代表者

山口 寛二 (Yamaguchi, Kanji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50381950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック蛋白Apg-2は、リポファジーを抑制する可能性がある。Apg-2ノックアウトマウスに肝細胞特異的に脂肪滴構成たんぱく質であるTip47、ADRPを強制発現させたところ、高脂肪食下であっても肝脂肪化はWildタイプマウスとの比較で、著明に抑制されていた。また、肝がん細胞株においてApg-2 SiRNAを導入すると、肝脂肪化が減少とリポファジーの亢進が確認された。ヒト脂肪肝炎の肝生検組織を用いて、Apg-2の発現パターンと脂肪化、炎症、線維化を検討したところ、脂肪肝ではApg-2のmRNAの発現が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Apg-2による脂肪滴形成とリポファジーの抑制の可能性が示唆され、肝脂肪化に及ぼす分子シャペロンの役割の一端が示された。特に脂肪化を伴う肝がんはsteatohepatitic typeと言われており、肝がんで高発現するApg-2の脂肪化促進作用とリポファジー抑制が嫌気性解糖系に依存する癌細胞の代謝環境を調整している可能性がある。今後は、Apg-2自体の発現抑制だけではなく、Apg-2分子のシャペロン活性の標的蛋白を明らかにして、その会合を阻害する化合物の開発が重要であり、代謝薬としての抗ガン治療の補助療法となり得る。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein Apg-2 may suppress lipophagy. Over expression of hepatocyte-specific lipid droplet component proteins, Tip47 and ADRP, in Apg-2 knockout mice markedly suppressed hepatic lipogenesis compared to wild-type mice, even under a high-fat diet. In addition, transfection of Apg-2 SiRNA in hepatocellular carcinoma cell lines resulted in decreased hepatic lipid accumulation and increased lipophagy. Using liver biopsy tissue from the patients with NASH, we examined the expression pattern of Apg-2 in relation to intrahepatic lipid accumulation, inflammation, and fibrosis, and found that Apg-2 mRNA expression was elevated in fatty liver.

研究分野：肝臓学

キーワード：Apg-2 脂肪肝炎 肝がん リポファジー 分子シャペロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛋白の恒常性維持に働く分子シャペロンがユビキチン・プロテアソームシステムやオートファジーシステムと共役して、種々のストレスから細胞保護的な役割を果たすことが示されたが、これらは癌細胞にとってはアポトーシス回避の手段となる。また、分子シャペロンは、嫌気性解糖系に依存する癌細胞や、脂肪化肝細胞の類洞圧排による虚血還流障害から低酸素状態に陥りやすい脂肪肝の病態では生存に必要なエネルギー供給機構をサポートする。以前から熱ショック蛋白 (Hsp: Heat shock protein) HSP70 は一般臨床において早期肝がんのマーカーとして免疫染色に用いられてきたが、bcl-2 などの抗アポトーシス分子を安定化させることが報告されている。また、分子シャペロンの発現を制御する HSF1 が肝脂肪化や肝がん促進作用があることが報告されたが (Jin X., et al. 2011 Cell Metab)、その機序はいまだ不明な点が多い。HSP70 と構造的に相同性の高い HSP110 は HSP70 の核酸交換因子として働き (Polier S., et al. Cell 2008, Bracher A., Front Mol Biosci. 2015)、そのファミリーである Apg-2 が脂肪肝や肝がんを促進させることが分かってきた。Apg-2 は、HSP70 と同様にヒト肝癌で高発現し、mTOR シグナルを活性化させる。我々は、LKB1 のユビキチン化による分解が Apg-2 の存在下に促進され、AMP-activated protein kinase (AMPK) シグナルの抑制、脂肪肝、肝がんを促進させる可能性を見出した。そこで次の段階として、AMPK シグナル下で活性化されるオートファジーに注目し、Apg-2 による細胞内の脂肪滴に焦点をおいたリポファジー制御を介した肝脂肪化、発がん制御を検討課題とした。これまでの脂肪肝における検討では、Hsp110 ファミリーに属する Apg-2 が、食餌性の非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 発症に必須の因子であることを、マウス生体を用いた実験系で同定した。また、ジエチルニトロサミン肝発がんモデルにおいて、肝がんが Apg-2 ノックアウトマウスで抑制されることを見出した。Apg-2 は mTOR シグナルを活性化し細胞増殖を正に制御することが想定されているが、その機序としては、Liver Kinase B1 (LKB1) の分解が Apg-2 の存在下に促進されることで、AMPK のリン酸が抑制され、AMPK シグナルが抑制される。さらに mTOR シグナルの活性化はオートファジーシステムの抑制を来し、脂肪肝、肝がんを促進する可能性がある。現在本邦でも、BMI25 以上の肥満人口が増加しており、その内 60% が脂肪肝を呈する。その中で、肝硬変や肝がんへ進展する脂肪肝は 20% 程度と割合としては低いが母集団の多さから近未来に爆発的に増加する可能性がある。そして、脂肪化を有する初期の肝がんの特徴的な病理像である steatohepatic type の肝がんにおいて我々の想定している機序は重要な病態解明につながる可能性があり興味深い。即ち、Apg-2 は脂肪肝を促進し、肝がんにおいても脂肪化をもたらすことで癌代謝環境を調整していると考えられる。これらの知見を背景に、本研究では、肝細胞と肝がん細胞における Apg-2 のリポファジー抑制を介した肝脂肪化、発がんの機序の解明が重要と考えた。

2. 研究の目的

Apg-2 が脂肪肝や肝がんを促進させる事実に基づき、脂肪肝から肝硬変、肝がんにつながる機序の病態解明と、生活習慣病としての肥満、脂肪肝の予防治療の標的としての Apg-2 の重要性を証明することを本研究の目的とした。そして、今回はこの目的を達成するために、Apg-2 のリポファジーに及ぼす影響を検討することとした。Apg-2 は AMPK 抑制による mTOR シグナルの活性化から、ライソゾーム関連遺伝子の抑制に関与している可能性がある。近年、脂肪滴膜上に Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC-3) が存在しリポファジーの概念が

提唱されたことから、Apg-2 によるリポファジーの抑制が脂肪肝及び肝がんの病態に關与すると着想した。分子シャペロン Apg-2 による脂肪滴形成とリポファジーのバランスの制御を明らかにすることで、Burn-out non-alcoholic steatohepatitis(NASH)を含めた advanced NASH から肝がんの病態や、高分化から中分化肝がんへ進展する中で脂肪化が減弱する肝がんの代謝状況の把握に繋がると考えられる。

3 . 研究の方法

Apg-2 が mTOR シグナルを活性化、AMPK シグナルを抑制すると想定される pathway 解析を、Apg-2 ノックアウトマウスを用いた肝がんモデル、脂肪肝モデル、において Wild-type マウスと比較してリポファジーについて解析する。次に、肝がん細胞株を用いて同様の検討を行う。また、肝生検で得られた脂肪肝炎の組織における Apg-2 発現と、リポファジー関連遺伝子発現の関連性を臨床プロファイルと比較して検討する。

まず、Apg-2 ノックアウトマウスにジエチルニトロサミンで肝がんモデルを作成し、40 週間、高脂肪食、高脂肪高コレステロール食で脂肪肝、脂肪肝炎を誘導し、肝がんの発現頻度を検討する。また、肝細胞特異的に Apg-2 を発現するプラスミドをハイドロダイナミックス法で導入し、肝がんにも及ぼす抑制効果を検討する。さらに、Apg-2 ノックアウトマウスに高脂肪食かつ肝細胞特異的に脂肪滴構成たんぱく質である Tip47, adipose ADRP を強制発現するプラスミドを導入し、肝脂肪化にも及ぼす影響を検討する。Apg-2 ノックアウトマウスに Tip47, ADRP を投与した後に肝細胞を単離し同様の検討を行う。さらに、肝がん細胞株において Apg-2 mRNA を SiRNA で silencing し Apg-2 のリポファジーにも及ぼす影響を *in vitro* の系で検討する。京路府立医科大学の倫理委員会で申請許可された、課題名「慢性肝疾患における肝内の脂質代謝、酸化ストレス、シャペロン関連遺伝子発現解析」(決定通知番号 ERB-C-392-3)で、約 200 検体のヒト脂肪肝の肝生検組織を用いて、肝内 Apg-2 の発現パターンと脂肪化、炎症、線維化、臨床パラメーターとの比較検討を行うことで、ヒト NASH における発現意義を検討する。また、基礎的検討で得られたシグナル及び分子に注目し、その発現を Real-time PCR または免疫組織学的検討で解析する。

4 . 研究成果

Apg-2 ノックアウトマウスにジエチルニトロサミンで肝がんモデルを作成し、40 週間、高脂肪食、高脂肪高コレステロール食で脂肪肝、脂肪肝炎を誘導したところ、ノックアウトマウスでの肝がんは頻度、サイズともに普通食よりは増加したが、Wild タイプとの比較では著明に抑制された。また、肝細胞特異的に Apg-2 を発現するプラスミドをハイドロダイナミックス法で導入したところ、肝がんが増加傾向を示した。また、Apg-2 ノックアウトマウスに高脂肪食かつ肝細胞特異的に脂肪滴構成たんぱく質である Tail interacting protein 47 (Tip47), adipose differentiation-related protein (ADRP)を強制発現するプラスミドを導入したところ、肝脂肪化は増加したが Wild タイプマウスとの比較では著明に抑制されていた。また、これらのマウスから肝臓を単離して初代培養したところ、Apg-2 ノックアウトマウス由来の肝細胞では LC-3 の発現がクロロキン投与で増加した。次に、ヒト、マウス肝がん細胞株 (Hep1-6, HepG2, Huh7, HLE, PLC/PR5, Hep3B) において Apg-2 mRNA を SiRNA で silencing し Apg-2 のリポファジーにも及ぼす影響を検討したところ、肝脂肪化の改善とともにリポファジーの亢進が確認された。さらに、Hep3B の Apg-2 をゲノム編集でノックアウトした細胞株を 3 種類樹立して検討したところ、オレイン酸負荷や Tip47 や ADRP で誘導される細胞内の脂肪滴が減少していること、細胞増殖能が低下していることが確認された。最後に、ヒト脂肪肝の肝生検組織を用いて、Apg-2 の

発現パターンと脂肪化、炎症、線維化を検討したところ、脂肪肝では Apg-2 の mRNA の発現が上昇していること、その発現レベルが肥満と関連していることが分かったが、脂肪肝のグレードとの相関は見られなかった。また、線維化関連遺伝子の発現との関連は、正の相関は傾向に留まり、明らかではなかった。免疫染色では、中心静脈付近の脂肪化肝細胞を中心に Apg-2 の発現が高いことが分かった。現在は、血中の Apg-2 濃度の測定にむけて ELSIA の系の作成を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okishio Shinya, Yamaguchi Kanji, Ishiba Hiroshi, Tochiki Nozomi, Yano Kota, Takahashi Aya, Kataoka Seita, Okuda Keiichiroh, Seko Yuya, Liu Yu, Fujii Hideki, Takahashi Daiki, Ito Yusuke, Kamon Junji, Umemura Atsushi, Moriguchi Michihisa, Yasui Kohichiroh, Okanoue Takeshi, Itoh Yoshito	4. 巻 10
2. 論文標題 PPAR agonist and metformin co-treatment ameliorates NASH in mice induced by a choline-deficient, amino acid-defined diet with 45% fat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75805-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 該当する

1. 著者名 Yano Kota, Yamaguchi Kanji, Seko Yuya, Okishio Shinya, Ishiba Hiroshi, Tochiki Nozomi, Takahashi Aya, Kataoka Seita, Okuda Keiichiroh, Liu Yu, Fujii Hideki, Umemura Atsushi, Moriguchi Michihisa, Okanoue Takeshi, Itoh Yoshito	4. 巻 102
2. 論文標題 Hepatocyte-specific fibroblast growth factor 21 overexpression ameliorates high-fat diet-induced obesity and liver steatosis in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 281 ~ 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00680-9	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口寛二, 瀬古裕也, 伊藤義人.
2. 発表標題 FGF21-FGFR1/ -klotho 経路を介した 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の治療戦略
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会. パネルディスカッション
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢野航太, 山口寛二, 高橋 彩, 置塩伸也, 片岡星太, 奥田佳一郎, 瀬古裕也, 榎村敦詩, 森口理久, 伊藤義人.
2. 発表標題 進行マウス NASH モデルにおける FGF21 の発現意義の検討
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会. 一般口演
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 置塩伸也, 山口寛二, 矢野航太, 高橋 彩, 片岡星太, 奥田佳一郎, 瀬古裕也, 榎村敦詩, 森口理久, 伊藤義人
2. 発表標題 HF-CDAA 食誘導性 NASH モデルマウスにおける Metformin 及び PPAR agonist 併用療法 の有用性について
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会. 一般口演
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 置塩伸也, 山口寛二, 伊藤義人ら
2. 発表標題 Metformin および PPAR agonist の併用による NASH 治療の検討
3. 学会等名 第 56 回 日本肝臓学会総会. 一般口演
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口寛二, 石破 博, 伊藤義人
2. 発表標題 メタボリックシンドロームとしての脂肪肝. 分子シャペロンAPG-2による肥満及び脂肪肝発症機序の解析
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口寛二, 石破 博, 伊藤義人
2. 発表標題 分子メカニズムと最新の治療. 分子シャペロンApg-2 が制御する脂肪肝形式と肝発がん機序の検討
3. 学会等名 第6回肝臓と糖尿病・代謝研究会 シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口寛二, 石破 博, 伊藤義人
2. 発表標題 Apg-2による肝脂肪化及びmTORシグナルを介した肝発がん機序の解析
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会. パネルディスカッション
4. 発表年 2019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	伊藤 克彦 (Itoh Katsuhiko) (90281097)	京都先端科学大学・教育開発センター・特任教授 (34303)	

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