

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09192

研究課題名(和文) 高度脂肪肝再生過程で生じる広汎細胞死の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of focal cell death during liver regeneration in severe fatty liver

研究代表者

稲葉 有香 (INABA, YUKA)

金沢大学・新学術創成研究機構・准教授

研究者番号：20571970

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)：肝臓は強靱な再生力を持つ臓器であるが、脂肪肝ではその再生力が障害される。特に高度脂肪肝における肝再生障害は、肝切除術後合併症の誘因となっている。我々は、高度脂肪肝での切除後再生過程では孤発性の細胞死と広汎な細胞死(壊死)が発症すること、この広汎細胞死が肝再生障害の誘因として重要であることを明らかにしている。本研究課題では、高度脂肪肝再生過程における広汎細胞死の発症メカニズムの解明を行い、ストレス誘導性転写因子ATF3が重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の核心は、「高度脂肪肝において、肝切除術後合併症の誘因となる再生障害が、どのようなメカニズムにより発症するのか？」という学術的問いである。肝切除後合併症の発症に関与する広汎細胞死の誘導メカニズムは、現在までに明らかにされていない。本研究は、広汎細胞死の制御メカニズムを明らかにしたものであり、高度脂肪肝における術後合併症の病態・病因の理解とともに、新規な治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The liver has robust regenerative potential in response to damage, but this potential is impaired in hepatic steatosis. In particular, impaired liver regeneration in severe fatty liver is a trigger for complications after hepatectomy. We have found that solitary cell death and focal cell death (necrosis) occur in regenerating severe fatty liver after hepatectomy, and that this focal cell death is an important trigger for impaired fatty liver regeneration. In this study, we found that the stress response gene activating transcription factor 3 (ATF3) is important for regulation of focal cell death during liver regeneration in severe fatty liver.

研究分野：肝臓学、代謝学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 細胞ストレス 肝再生 肝細胞死 FRET

1. 研究開始当初の背景

高度脂肪肝(60%以上の肝細胞で脂肪滴)における肝切除術後の再生障害は、肝不全などの術後合併症を引き起こす。肝再生は、肝細胞増殖と肝細胞死により制御される。脂肪肝再生障害は、肝細胞増殖の低下よりも、肝細胞死の増加により惹起される。実際、代表者らは、脂肪肝での70%肝切除後再生過程の検討を行い、肝細胞増殖障害の改善がない状態でも、肝細胞死が抑制することにより肝再生が改善することを、明らかにしている(業績 1; Hepatology 2015, 業績 2; Antioxid Redox Signal 2014)。肝再生過程の細胞死として、中等度脂肪肝(30~60%の肝細胞で脂肪滴)では孤発性細胞死が、高度脂肪肝では孤発性肝細胞死と広汎細胞死(壊死)の両者が誘導される。代表者は、広汎細胞死の抑制によって、高度脂肪肝の切除後肝再生障害が軽減することを見出している。このことは、広汎細胞死の発症が、高度脂肪肝の再生障害の誘因であることを示している。一方で、肝再生過程における広汎細胞死の発症機序は明らかではなく、高度脂肪肝の再生過程で生じる広汎細胞死の予防・治療法も解明されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、高度脂肪肝再生過程で生じる広汎細胞死の発症メカニズムを解明することを目的とした。具体的には、1)広汎細胞死誘導における ATF3 の役割の解明、2)ATF3 による広汎細胞死制御メカニズムの解明、に取り組む。

3. 研究の方法

小課題 1) では、高度脂肪肝の再生障害の誘因となる広汎細胞死誘導における ATF3 の役割を明らかにするため、ATF3 の機能阻害・機能獲得モデルを用いて行った。機能阻害による検討は、肝 ATF3 ノックアウトマウス及びその同腹仔に対し、16 週間の高脂肪食負荷により高度脂肪肝を誘導し、70%肝切除術を施し、切除後再生過程の検討を行った。機能獲得による検討は、高度脂肪肝マウスに対し、アデノウイルスによる ATF3 の過剰発現を行い検討した。肝障害を血中アミノトランスフェラーゼにより評価した。肝細胞死は、細胞死の指標となる TUNEL 染色と、アポトーシス実行因子である活性型 Caspase-3 染色による組織学的解析、及び細胞死関連因子の遺伝子発現解析・タンパク発現解析により行った。

小課題 2) では、ATF3 による広汎細胞制御メカニズムを明らかにするため、初代培養肝細胞に対し、アデノウイルスによる ATF3 の過剰発現を行い、細胞死関連因子の検討を行った。また、小課題 1) で特定した、広汎細胞死の誘因となる細胞死様式を、モニター可能な FRET プローブ安定発現肝細胞株を作成し、ATF3 による作用を検討した。

4. 研究成果

小課題 1) 「広汎細胞死誘導における ATF3 の役割の解明」に関して、高度脂肪肝を誘導した肝 ATF3 ノックアウトマウスへの 70%肝切除術を行い、肝再生過程の検討を行った。肝 ATF3 ノックアウトマウスでは、高度脂肪肝切除後の血漿 ALT 値の持続的な上昇が改善し、ネクロトーシス誘導因子 RIPK3 の発現増強が阻害され、肝細胞死が減少すると共に広汎細胞死が消失した(図 1)。TUNEL・活性型 Caspase-3 二重染色による解析から、アポトーシ

スと非アポトーシス細胞死の判別を行い、ATF3 が非アポトーシス細胞死の誘導に重要であることが明らかとなった。細胞死関連因子の検討により、この非アポトーシス細胞死が RIPK3 により制御されるネクロトーシスである可能性が示唆された。一方、高度脂肪肝マウスへの ATF3 過剰発現は、血漿 ALT 値の上昇、肝細胞死の増加、RIPK3 の発現増強を来した(図 2)。TUNEL・活性型 Caspase-3 二重染色による解析では、ATF3 により非アポトーシス細胞死が増加することが示された。すなわち、高度脂肪肝の再生過程における広汎細胞死が、RIPK3 依存的に制御された細胞死であるネクロトーシスの惹起に起因し、ネクロトーシスの誘因として、ATF3 発現が重要な役割を担う可能性を見出した。

小課題 2) 「ATF3 による広汎細胞死制御メカニズムの解明」に関しては、小課題 1) で明らかにしたネクロトーシス発症における ATF3 による制御メカニズムに関して検討を行った。初代培養肝細胞への ATF3 過剰発現は、ネクロトーシス制御因子である RIPK3 の発現・リン酸化を増加させた(図 3)。クロマチン免疫沈降法・Ripk3 プロモーターアッセイにより、ATF3 が Ripk3 プロモーターに直接結合することにより、その発現を制御することが明らかとなった。次に、ATF3 誘導性の Ripk3 発現の増加が、ネクロトーシスを引き起こすかを明らかにするため、ネクロトーシスを検出可能な FRET プローブを安定して発現させる培養細胞株の作製を行った。当該 FRET プローブ発現細胞株への ATF3 過剰発現は、ATF3 がネクロトーシスを惹起することを示した。

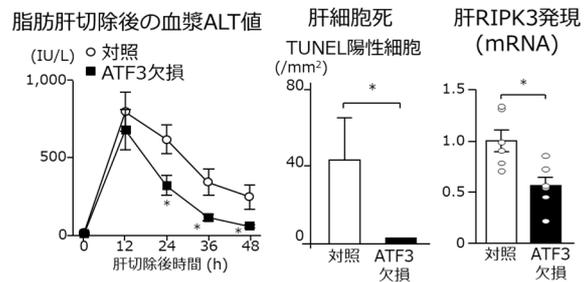


図 1) 高度脂肪肝切除ATF3欠損マウス

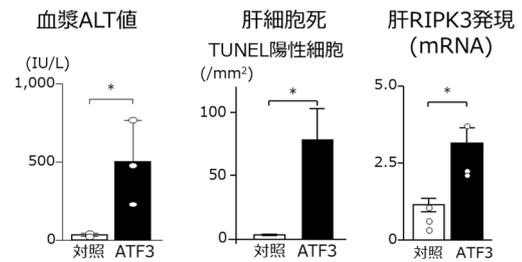


図 2) 高度脂肪肝マウスへのATF3過剰発現

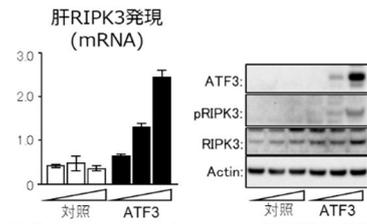


図 3) ATF3はRIPK3発現を誘導

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 2件）

1. 著者名 Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Matsumoto M, Inoue H, Inaba Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Diet intake control is indispensable for the gluconeogenic response to sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in male mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 35 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13319	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 Kanno A, Asahara S, Furubayashi A, Masuda K, Yoshitomi R, Suzuki E, Takai T, Kimura-Koyanagi M, Matsuda T, Bartolome A, Hirota Y, Yokoi N, Inaba Y, Inoue H, Matsumoto M, Inoue K, Abe T, Wei F, Tomizawa K, Ogawa W, Seino S, Kasuga M, Kido Y	4. 巻 5
2. 論文標題 GCN2 regulates pancreatic cell mass by sensing intracellular amino acid levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e128820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.128820	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 Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Sato M, Kobayashi M, Matsumoto M, Kitamura T, Kasuga M, Inoue H	4. 巻 160
2. 論文標題 Hepatic gluconeogenic response to single and long-term SGLT2 inhibition in lean/obese male hepatic G6pc-reporter mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 2811-2824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2019-00422	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 Kimura K, Inaba Y, Watanabe H, Matsukawa T, Matsumoto M, Inoue H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 659-666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12964	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 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 稲葉有香
2. 発表標題 The steatosis severity grade and cell death in liver regeneration
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉有香、井上啓
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患における肝再生障害と細胞死
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、土屋康介、井上啓
2. 発表標題 高度脂肪肝で生じる細胞死誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋内咲実、稲葉有香、井上啓
2. 発表標題 肝糖新生応答に対するSGLT2阻害剤の作用における食事量制御の重要性
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、井上啓
2. 発表標題 脂肪肝再生過程で生じる細胞死の様式制御メカニズム
3. 学会等名 令和2年自然科学研究機構生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉有香
2. 発表標題 Impaired liver regeneration and cell death in NAFLD
3. 学会等名 2020 International Congress on Obesity and Metabolic Syndrome (ICOMES 2020); JKT symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、小川千尋、渡邊一史、井上啓
2. 発表標題 脂肪肝再生過程で生じる細胞死の新規誘導メカニズム
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋内咲実、稲葉有香、井上啓
2. 発表標題 SGLT2阻害薬の肝糖新生応答に対する作用の検討
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、春日雅人、井上啓
2. 発表標題 脂肪肝再生過程における細胞死様式とその選択メカニズム
3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hashiuchi E, Inaba Y, Inoue H
2. 発表標題 Hepatic gluconeogenic response to SGLT2 inhibition in hepatic G6pc-reporter mice with NAFLD
3. 学会等名 The Keystone Symposium on Obesity and NAFLD: Mechanisms and Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inaba Y, Hashiuchi E, Inoue H
2. 発表標題 Hepatic Gluconeogenic Response to SGLT2 inhibition in Lean and Obese mice
3. 学会等名 The University of Pittsburgh Center for Pharmacogenetics Symposium: From Pharmacogenetics to Molecular Medicine and Pharmaceuticals (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、春日雅人、井上啓
2. 発表標題 脂肪肝再生過程における細胞死様式とその選択メカニズム
3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋内咲実、稲葉有香、渡邊一史、小川千尋、井上啓
2. 発表標題 肝糖新生応答に対するSGLT2阻害薬の作用の検討
3. 学会等名 第34回糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉有香、橋内咲実、渡邊一史、井上啓
2. 発表標題 脂肪肝再生過程における新規細胞死制御機構の検討
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋内咲実、稲葉有香、渡邊一史、小川千尋、井上啓
2. 発表標題 SGLT2阻害剤による肝糖新生応答への作用の検討
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋内咲実、稲葉有香、渡邊一史、小川千尋、井上啓
2. 発表標題 SGLT2阻害剤による肝糖新生応答への作用の検討
3. 学会等名 第24回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲葉有香
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患における肝再生障害誘導メカニズム
3. 学会等名 第37回内分泌代謝学サマーセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上啓、稲葉有香	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ「肥満 外科治療と基礎研究の最新情報」	

〔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