

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20174

研究課題名(和文)酸化HDLに焦点を当てたNASHの発症機序の解明と診断マーカーの探索

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenic mechanism of NASH and developments for diagnostic markers focusing on oxidized HDL

研究代表者

櫻井 俊宏 (Sakurai, Toshihiro)

北海道大学・保健科学研究所・准教授

研究者番号：60707602

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)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)と酸化HDLの関連は未解明である。本課題ではヒト培養肝細胞を用いる生化学実験により、酸化HDLがNASHの発症機序にどのように関係するかを検証することを目的とした。その結果、以下を見いだした：(1)酸化HDLが肝培養細胞で脂肪滴を形成させ、その脂肪滴は酸化されていること；(2)脂肪酸合成及び脂肪滴合成が抑制される可能性；(3)ミトコンドリア形態の変化；(4)炎症関連遺伝子の発現促進。以上より、酸化HDLは脂質代謝のみならずミトコンドリア代謝の変化をもたらす可能性があることが示唆された。今後も酸化HDL刺激に対する肝細胞の応答についての全容解明に繋げたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト肝培養細胞を用いた研究で、酸化HDL刺激では脂肪滴の形成や炎症、酸化ストレスを促進することだけでなく、ミトコンドリア生合成に関連する遺伝子群の低下が見られ、ミトコンドリアの形態も変化することを明らかにすることができた。これらの結果は本研究で得た重要な知見であり、今後の酸化HDL研究の進展を加速させるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The link between nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and oxidized HDL remains unclear. The purpose of this task was to verify how oxidized HDL is involved in the pathogenic mechanism of NASH by biochemical experiments using cultured human hepatocytes. As a result, we found the following: (1) Oxidized HDL forms lipid droplets in cultured liver cells, and the lipid droplets are oxidized; (2) Fatty acid synthesis and lipid droplet synthesis may be suppressed; (3) Changes in mitochondrial morphology; (4) Promotion of expression of inflammation-related genes. From the above, it was suggested that oxidized HDL may bring about changes in mitochondrial metabolism as well as lipid metabolism. In the future, we would like to continue to elucidate the full picture of the response of hepatocytes to oxidative HDL stimulation.

研究分野：健康科学

キーワード：HDL 酸化 ミトコンドリア NASH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は栄養過多や肥満、インスリン抵抗性等によって肝臓に脂肪が蓄積し (脂肪肝) さらに酸化ストレスや炎症等が加わり発症する。NASH は肝線維化、肝硬変、肝癌へと進展するため予後不良であり、肝移植の対象となる。NASH 患者は増加しているが、その背景には NASH の発症・進展の機序が未だ複雑で不明瞭であること、NASH と単純性脂肪肝の鑑別のための有用な血中バイオマーカーが無いこと、有効な治療法が未だ確立されていないこと、などがあり、最適な NASH 診断マーカーの開発は急務である。

一方で近年、高比重リポタンパク質 (HDL) の質的な研究が盛んであるが、「酸化 HDL は NASH の発症機序に関与するか」「酸化 HDL は NASH において酸化ストレスを反映する鋭敏な血中バイオマーカーになるか」という点は不明であった。我々の初期検討で、肝培養細胞に対して人工酸化 HDL を刺激すると、未酸化 HDL では見られない、明らかな過酸化脂質陽性の脂肪滴の形成が認められた。これは酸化 HDL が脂肪肝あるいは NASH の発症に関わる可能性を示唆した。以上から、酸化 HDL と NASH 発症の関連性について解明することは意義深い。

2. 研究の目的

- (1) 酸化 HDL が NASH の発症に寄与する可能性を検証するために、酸化 HDL がヒト培養肝細胞に及ぼす影響を生化学的に実験し、酸化 HDL 測定の臨床的意義を解明すること。
- (2) 人工的に酸化した HDL で高値を示す酸化修飾タンパク質の種類を特定すること。
- (3) ヒト血清で単純性脂肪肝と NASH を鑑別するために有用な酸化修飾タンパク質を探索すること。

3. 研究の方法

(1) 酸化 HDL の性状解析

酸化 HDL 自身の脂質/過酸化脂質の組成を明らかにするために、酸化及び未酸化 HDL の脂質分子を質量分析で分析した。HDL の酸化時間は 2、8、24 時間とした。

(2) ヒト肝由来培養細胞における酸化 HDL 刺激に対する応答

酸化 HDL が NASH 発症機序にどのように関わるか、特に肝細胞に対して酸化 HDL は炎症や線維化を惹起するのか、どのように取り込まれて脂肪滴形成に寄与するのかを明らかにするために、生化学的実験を行った。具体的には、ヒト肝培養細胞 C3A をウェルに播種し、24 時間銅酸化させた人工酸化 HDL または未酸化 HDL を添加し、24 時間刺激した。その後、以下の実験を行った。

WST-1 試薬を用いる細胞生存能試験で酸化 HDL の肝細胞に対する毒性を確認した。

同条件で脂肪染色および過酸化脂質染色で脂肪滴の観察を行った。

同条件で刺激後、細胞の RNA または脂質を抽出した。RNA を用いる実験では、Real-time PCR による遺伝子解析で標的遺伝子の発現量の増減を確認した。脂質を用いる実験では、酸化 HDL および細胞内脂肪滴の脂質/過酸化脂質を、質量分析を用いるリピドミクスにより分析した (文献)。MitoTracker Green を用いてミトコンドリアを蛍光染色し、蛍光顕微鏡でミトコンドリアの形態を観察した。

(3) 臨床検体を用いるプロテオミクス解析

ヒト血清を用いた検討で、単純性脂肪肝群に比べて NASH 群で高値を示した酸化修飾ペプチドを Orbitrap 質量分析計にて分析した。また、分離した HDL を人工酸化させた酸化 HDL を同様の手法で分析した。酸化で増加する酸化修飾ペプチドを探索した。

4. 研究成果

(1) 酸化 HDL の脂質/過酸化脂質解析

酸化 HDL 自身の脂質/過酸化脂質の組成を質量分析で分析した。HDL の酸化時間を 2、8、24 時間と長くすることで、HDL 中の TG-OOH や TG(-OOH)₂ (いずれも中性脂肪の過酸化物)、PC-OOH や PC(-OOH)₂ (代表的なリン脂質であるホスファチジルコリンの過酸化物) の量が増加することを明らかにした。本実験では十分な酸化時間条件として、酸化 24 時間を採用した。

(2) C3A における酸化 HDL 刺激に対する応答

酸化 HDL または未酸化 HDL の最適な添加濃度を決定するために、細胞生存率試験で酸化 HDL の細

胞に対する毒性を確認した。その結果、酸化 HDL 0.02 mg/mL の添加で細胞生存率が 20%程度低下したが毒性は大きくなかった。未酸化 HDL ではその濃度で細胞生存率は低下しなかった。

脂肪滴及び過酸化脂質に対する蛍光染色の実験で、酸化 HDL 群でのみ有意な脂肪滴及び過酸化脂質の増加が確認された。炎症性サイトカインの *TNF α* の発現も増加し、炎症惹起作用も確認した。

その条件と同じく、0.02 mg/mL の酸化 HDL あるいは未酸化 HDL で刺激した C3A では、脂肪滴内に局在する TG(-OOH)₂ や細胞全体に存在する PC(-OOH)₂ を測定して解析した結果、酸化 HDL 添加で TG(-OOH)₂ 及び PC(-OOH)₂ の増加が確認できた(図 1)。したがって、酸化 HDL は脂肪滴の形成を促すだけでなく、脂肪滴内及び細胞全体に含まれる過酸化脂質の増加を促し、酸化ストレス亢進状態を引き起こすことを見いだした。また、その細胞の脂質代謝の変化を理解するために、同条件で刺激した細胞の各種遺伝子の発現量を測定した結果、酸化 HDL 群では、PBS 群と比べて *SCD1* 及び *SREBP1* (脂肪酸合成) の発現が有意に減少した。*DGAT1* 及び *ACAT* (脂肪滴形成) は有意に減少し、*ATGL* (脂肪滴分解) は減少傾向を示した。未酸化 HDL 群と比べると、*SREBP1* (脂肪酸合成) が有意に減少した。このことから、酸化 HDL で刺激された細胞では過剰な脂肪蓄積を防ぐために、脂肪酸合成及び脂肪滴形成が抑制された可能性が示唆された。

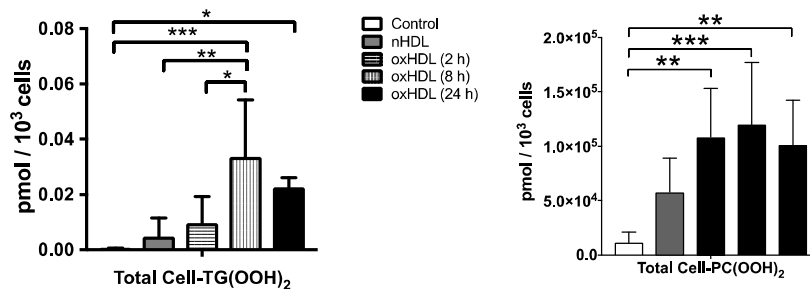


図1. 様々な条件で作製された酸化HDLはC3A細胞内過酸化脂質を増加させた。

同様の細胞実験の条件で、酸化 HDL がミトコンドリアに与える影響を調査したところ、酸化 HDL 群では *NRF1* (エネルギー産生に関与) は有意に減少し、*PPARGC1A* (エネルギー産生に関与) は減少傾向を示した。また、ミトコンドリア染色による形態観察において、コントロール群ではミトコンドリアが線状であったのに対して(図 2A) 酸化 HDL 群では球状を示した(図 2B)。球状のミトコンドリアは脂肪肝で見られるという過去の報告と一致し、球状のそれはエネルギー代謝が低下する場合に起こると考えられる。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返すが、融合に関与する *MFN2* の発現が酸化 HDL 群で有意に低下したことから、この低下が融合の抑制に働いてミトコンドリアが球状を示した可能性があるかと推察された。したがって、酸化 HDL は脂質代謝のみならずミトコンドリア代謝にも変化をもたらす可能性があることが示唆された。

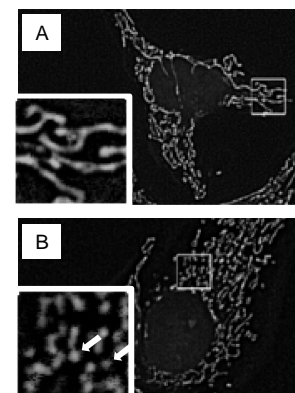


図2. 酸化HDLはミトコンドリア(矢印)を分裂させた

(3) 酸化 HDL を標的とする NASH バイオマーカーの探索

単純性脂肪肝群に比べて NASH 群で有意に高値を示した酸化修飾 apoA-I ペプチドを Oribtrap 質量分析計にて見だし、国内及び国際特許出願に至った(文献、)。ROC 曲線による鑑別能の解析によると、酸化修飾 apoA-I と total apoA-I の比率は最も良好な鑑別バイオマーカーであることを示唆した(図 3)。また、そのペプチドは、人工酸化させた酸化 HDL で増加する酸化修飾 apoA-I ペプチドであることを見いだした。よって、この酸化修飾 apoA-I は酸化ストレスの亢進で増加することを示唆し、NASH における酸化ストレス亢進を反映する血中バイオマーカーになり得ると考えられた。

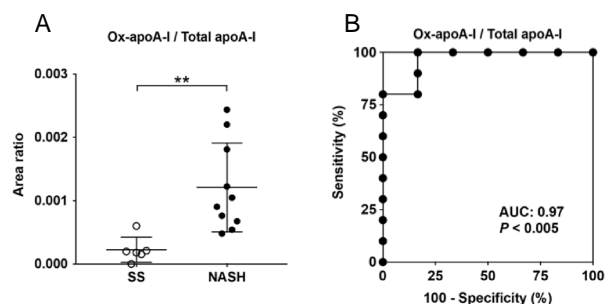


図3. Ox-apoA-I/Total apoA-I 比はNASH鑑別のためのバイオマーカーになり得る。

以上の成果から、酸化 HDL が肝細胞における脂肪滴形成促進作用、酸化ストレス亢進作用、炎症惹起作用、ミトコンドリア形態異常作用などを持ち、非アルコール性脂肪性肝障害の病態を悪化させる可能性は高いことが予測された。日本国民の約 1 割が脂肪肝を持ち、その内の 200 万人は NASH と推定されている。欧米では成人の 3 割は脂肪肝を持つと報告され、世界中に罹患者とその予備群が大勢存在する危機的な状況である(文献)。今回見いだされた酸化修飾 apoAI ペプチドが血中の新規 NASH 診断バイオマーカーの可能性を持った。このバイオマーカーの研究が進めば、患者の身体的負担の軽減や医療費の削減に貢献できるため、本研究は国内外で大きな役割を果たすと考えられる。本研究で得た重要な知見は、今後の酸化 HDL 研究の進展を加速させるものと考えられた。

<引用文献>

Sakurai T, Sakurai A, Vaisman BL, Amar MJA, Liu C, Gordon SM, Drake SK, Pryor M, Sampson ML, Yang L, Freeman LA, Remaley AT. Creation of ApoC-II Mutant Mice and Correction of their Hypertriglyceridemia with an ApoC-II Mimetic Peptide. *J Pharmacol Exp Ther*, 356:341-53, 2016.

出願人：櫻井俊宏、恵淑萍、千葉仁志。非アルコール性脂肪性肝炎の診断方法。特許出願番号：特願 2020- 149798。出願日：2020. 9. 7.

出願人：櫻井俊宏、恵淑萍、千葉仁志。非アルコール性脂肪性肝炎の診断方法。国際出願番号：PCT/JP2021/022648。出願日：2021. 6. 15.

Bellentani S. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*, 37: 81-84, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上野朱音, 櫻井俊宏, 関島将人, 山端ありさ, 陳 震, 千葉仁志, 惠 淑萍.
2. 発表標題 酸化HDLにより誘導された肝細胞過酸化脂質プロファイルの変動
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山端ありさ, 櫻井俊宏, 関島将人, 上野朱音, 千葉仁志, 惠 淑萍.
2. 発表標題 酸化HDLの肝脂質代謝及びミトコンドリアへの影響
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 茂木すみれ, 櫻井俊宏, 上野朱音, 山端ありさ, 陳 震, 千葉 仁志, 惠 淑萍.
2. 発表標題 酸化HDL刺激による肝細胞中のリン脂質過酸化物の変動
3. 学会等名 第54回日本臨床検査医学会北海道支部総会・第30回日本臨床化学会北海道支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sekijima M, Sakurai T, Chiba H, Hui SP
2. 発表標題 Oxidized high-density lipoproteins promote fibrosis in hepatocytes
3. 学会等名 FHS symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山端ありさ, 櫻井俊宏, 関島将人, 上野朱音, 布田博敏, 千葉仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 肝細胞の脂質代謝とミトコンドリア代謝への酸化HDLの影響
3. 学会等名 第53回日本臨床検査医学会北海道支部総会・第29回日本臨床化学会北海道支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井俊宏, 関島将人, 田村宥人, 仲門菜月, 津久井隆行, 布田博敏, 千葉仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 酸化HDLに焦点を当てた非アルコール性脂肪性肝炎の発症機序の解明
3. 学会等名 第4回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井俊宏, 関島将人, 田村宥人, 仲門菜月, 津久井隆行, 布田博敏, 千葉仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎発症に対する酸化HDLの関与
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関島将人, 櫻井俊宏, 千葉仁志, 惠 淑萍
2. 発表標題 ヒト肝培養細胞における酸化HDLの線維化促進作用
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 非アルコール性脂肪性肝炎の診断方法	発明者 櫻井俊宏、惠淑萍、 千葉仁志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/022648	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 非アルコール性脂肪性肝炎の診断方法	発明者 櫻井俊宏、惠淑萍、 千葉仁志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020- 149798	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------