

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08275

研究課題名(和文)p62の脂肪酸代謝と臓器連関を介したNASH発症進展における役割

研究課題名(英文)The role of p62 in NASH through fatty acid metabolism and organ cross-talk

研究代表者

星 拓男 (Hoshi, Takuo)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：10375503

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)：p62が肝細胞のみに発現する肝細胞特異的p62レスキュー(p62-H res)、脂肪細胞にのみ特異的に発現する脂肪細胞特異的p62レスキュー(p62-A res)、全身p62遺伝子欠失(p62-KO)、更に、野生型(WT)マウスに、60%高脂肪食を摂餌させ、NASH重症度を比較解析した。p62-KO、p62-A resは、WTと比較して高度の肝炎症線維化を伴う重症NASHへ進展したが、p62-H resでは、肝炎症、肝線維化がWTと同程度に抑制され、NASHの進行が軽減していた。これらの結果から、肝細胞のp62がNASHの発症と進展において防御的な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、単純性脂肪肝から発生し、致死的な肝硬変、肝臓へ進行する疾患である。しかし、その発症機序は完全には解明されておらず、NASH進行および肝臓発生を阻止するための薬物治療も確立していない。本研究は、ヒトNASHに類似する新規モデルにおいて、肝細胞特異的なp62発現がNASHの進展を抑制することを見出した。これらの結果から肝細胞のp62がNASHに防御的な役割を果たすと考えられ、特に肝細胞のp62の発現のコントロールが新しいNASHの治療標的と成り得る可能性を示した点で、将来的なNASH治療開発のための研究として意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：p62 knock-out mice in whole body (p62-KO) mice exhibit severe NASH fed by a high fat feeding. To elucidate the mechanism of NASH from the view of organ cross-talks, adipocyte or hepatocyte specific conditional p62 rescue mice (p62-A res or p62-H res) were analyzed in NASH development. The p62-H res mice were suppressed the development of NASH with severe hepatic inflammation and fibrosis compared with p62-KO or p62-A res mice despite their similar obese. p62 in hepatocytes was considered to play a protective role against the development of NASH. p62 of hepatocytes could be a new and promising target for treatment of NASH.

研究分野：麻酔科学

キーワード：NASH p62 臓器連関 脂肪酸代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦の約 2000 万人は非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) と称される脂肪肝を伴う慢性進行性の肝障害に罹患している。NAFLD の 10-20% には肝硬変、肝癌へ進行する NASH が含まれ、積極的な医療介入が必要である。単純性脂肪肝を基に炎症、線維化を来す NASH への進展機序は完全には解明されていないが、脂質代謝異常による肝細胞への脂肪沈着、脂肪毒性に加え、腸内細菌叢異常、内臓脂肪からの炎症シグナルなど肝のみならず全身の多様な因子の関与が指摘され、現在では肥満を基盤とする全身病、すなわちメタボリック症候群の一表現型と認識されている (Tilg H, et al. *Hepatology* 2010;52:1836-46)。

p62 は酸化ストレス応答タンパクとして見出され、以後の解析で p62 がタンパクの分解系である選択的 autophagy の調節に関与することが判明し (Komatsu M, et al. *Cell* 2007;131:1149-63), 更には、組織細胞中の中性脂肪を遊離脂肪酸に分解代謝する新たな経路である lipophagy へも関与することが明らかとなった (Singh R, et al. *Nat Med* 2009;458:1131-35)。加えて、p62 が褐色脂肪組織において全身の脂肪酸エネルギー代謝と熱産生の制御を行うことが報告され (Muller TD, et al. *J Clin Invest* 2013;123:469-78), p62 が lipophagy を介して全身の脂肪酸代謝に関わることが示唆された。

研究代表者らが作製した p62 遺伝子欠失マウス (p62-KO) は、中枢性のレプチン抵抗性に起因した過食による肥満を来し、加えて高血圧、耐糖能異常、単純性脂肪肝などヒトメタボリック症候群に酷似した予想外の表現型を示した (Harada H, et al. *J Neurosci* 2013;33:14767-77)。更にこの p62-KO マウスに 60% 高脂肪食を 16 週間摂餌させると、野生型マウス (WT) ではわずかな炎症のみで線維化は来さないのに比して、p62-KO は 8 週間で肝組織に脂肪滴の沈着と炎症細胞浸潤を来して NASH を発症し、16 週間で高度の肝線維化を来す。肝組織の定量的 PCR 解析では、p62-KO において遊離脂肪酸を Acyl-CoA へ代謝する *Acs11* の mRNA 発現の低下と、Acyl-CoA を脂肪酸に代謝する *Them2* の mRNA の発現の有意な増加が認められ、p62 欠損による lipophagy 障害が中性脂肪-脂肪酸-Acyl-CoA の代謝の異常を惹起した可能性が示唆された。これらの脂肪酸代謝バランス異常は、ミトコンドリアでの脂肪酸β酸化の異常を引き起こす。

2. 研究の目的

当研究課題の核心をなす学術的な「問い」は、「p62 欠損が惹起する autophagy/lipophagy 障害が、中性脂肪-脂肪酸-Acyl-CoA から脂肪酸β酸化へ至る一連の代謝をどう変化させ、どのように NASH の発症進展に関与するか」である。一方、野生型マウスでは、高脂肪食摂餌により肝組織における p62 発現は変化しないものの、白色 (内臓) 脂肪、褐色脂肪組織では p62 発現が増加しており、各組織でその挙動がそれぞれ異なっていた。組織別の p62 の役割を明らかにするため、肝細胞、脂肪細胞にのみ p62 を発現する“組織細胞特異的 p62 遺伝子レスキューマウス”を作製して全身 p62 遺伝子欠失マウスと NASH 肝病態の表現型を比較解析し、臓器連関の視点から NASH における p62 と autophagy/lipophagy の役割を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

<動物実験>

(1) p62 遺伝子のイントロンに、*LoxP* 配列で挟まれた転写終結シグナルおよび *polyA* 付加シグナル配列を挿入したノックインマウス (p62^{KI/KI}) を作製した。このマウスは、p62^{-/-}と同様全身で p62 遺伝子が欠損する。次に、全身の p62 欠損下において、組織特異的に p62 を発現させる (レスキューする) ために、上記 p62^{KI/KI} マウスと組織特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウスを交配する。これにより生まれる仔は、*Cre* が発現する組織でのみ *LoxP* で挟まれた転写終結シグナルと *polyA* 付加シグナルが除去されるため、p62 の発現が組織細胞特異的にレスキューされる。本研究では、Albumin-Cre, Adipoq-Cre マウスを用いて、肝細胞、脂肪細胞特異的 p62 遺伝子レスキューマウスを作製した。これらのマウスに、60% 高脂肪食 (オリエンタル酵母) を 4 から 16 週間摂餌させ、NASH の表現型を比較した。

(2) Lipophagy は、蓄積した組織細胞内の中性脂肪を脂肪酸に分解代謝する経路であるため、WT および全身 p62 遺伝子欠失マウス (p62-KO) に 12 週間高脂肪食を摂餌させ肝臓に中性脂肪を蓄積させたのち、1日 3g の通常食 (マウスの通常の 1日摂取量相当) に制限して (pair feeding; PF) 4 週間飼育し、一度肝組織に蓄積した中性脂肪の“抜け易さ”および NASH の表現型を解析した。

<細胞実験>

p62 を CRISPR/Cas9 system を用いてノックアウトした培養肝細胞 (Hepal-6) を作成し、実験に使用した。野生型と p62-KO 細胞の定常状態および脂肪酸 (palmitic acid; PL および oleic acid; OL) 負荷時の、p62 発現の差による細胞内の脂肪酸および中性脂肪の蓄積量の変化と、autophagy/lipophagy に関わる因子 (LC3 など) および脂肪酸代謝に関わる遺伝子

(FAS, PPAR α , PPAR γ など)の発現変化を immunoblot, qPCR で比較解析した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞, および脂肪細胞の *p62* レスキューは, 体重, 体組成に影響を及ぼさない
 全身 *p62* 遺伝子欠失マウス (*p62*-KO), 肝細胞特異的 *p62* レスキューマウス (*p62*-H res), 脂肪細胞特異的 *p62* レスキューマウス (*p62*-A res) に通常食または高脂肪食を摂餌させ, 体重および体組成(肝重量, 精巣上体周囲内臓脂肪; WAT)を比較した(図1). 野生型(WT)と比較すると3系統の *p62* 遺伝子改変マウスはいずれも肥満を呈したが3群間では差がなく, 肝細胞および脂肪細胞の *p62* 遺伝子発現は体重に影響を与えなかった. 同様に, 肝組織重量, 内臓組織脂肪重量も高脂肪食によって増加するものの, 3群内で差は認められなかった.

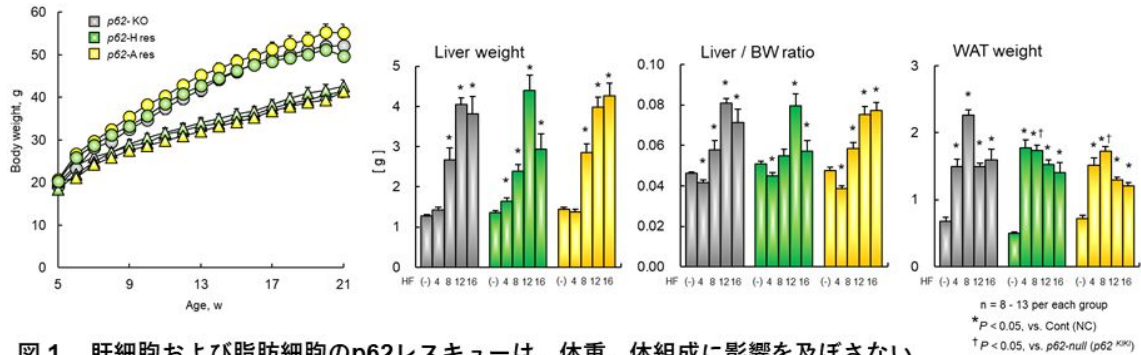


図1 肝細胞および脂肪細胞の*p62*レスキューは, 体重, 体組成に影響を及ぼさない.

(2) 肝細胞の *p62* レスキューは, NASH の進行を抑制する.

3群のマウスの NASH 進行度について病的に解析した. 肝脂肪化と炎症を H.E. 染色によって(図2), 肝線維化を sirius red 染色によって(図3)評価した. また, NASH の病理学的重症度を steatosis activity fibrosis (SAF) score によってスコアリングして比較した(図2&3の下段パネル). *p62*-KO と *p62*-A res では, 高脂肪食摂餌8週間ころから高度の脂肪沈着と炎症細胞浸潤が出現・増悪したが *p62*-H res ではこれらの変化が軽度であった(図2). 更に, *p62*-KO と *p62*-A res では, 高脂肪食摂餌12週間ころから線維化(sirius red 染色の赤部分)が出現し進行したが *p62*-H res では線維化が軽度に抑制されていた(図3). SAF score による重症度判定でも同様の結果であったが, 特に, *p62*-H res では肝線維化が顕著に抑制されていた(図3下段).

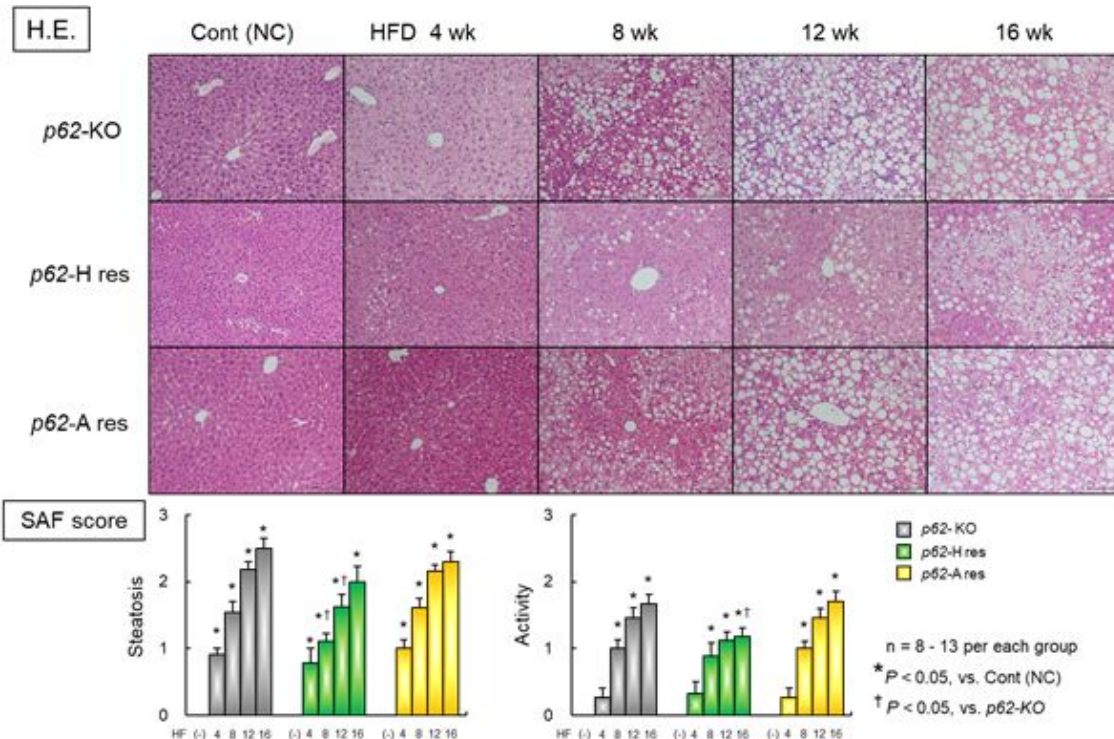


図2 肝細胞の*p62*レスキューは, NASH進行を抑制する.

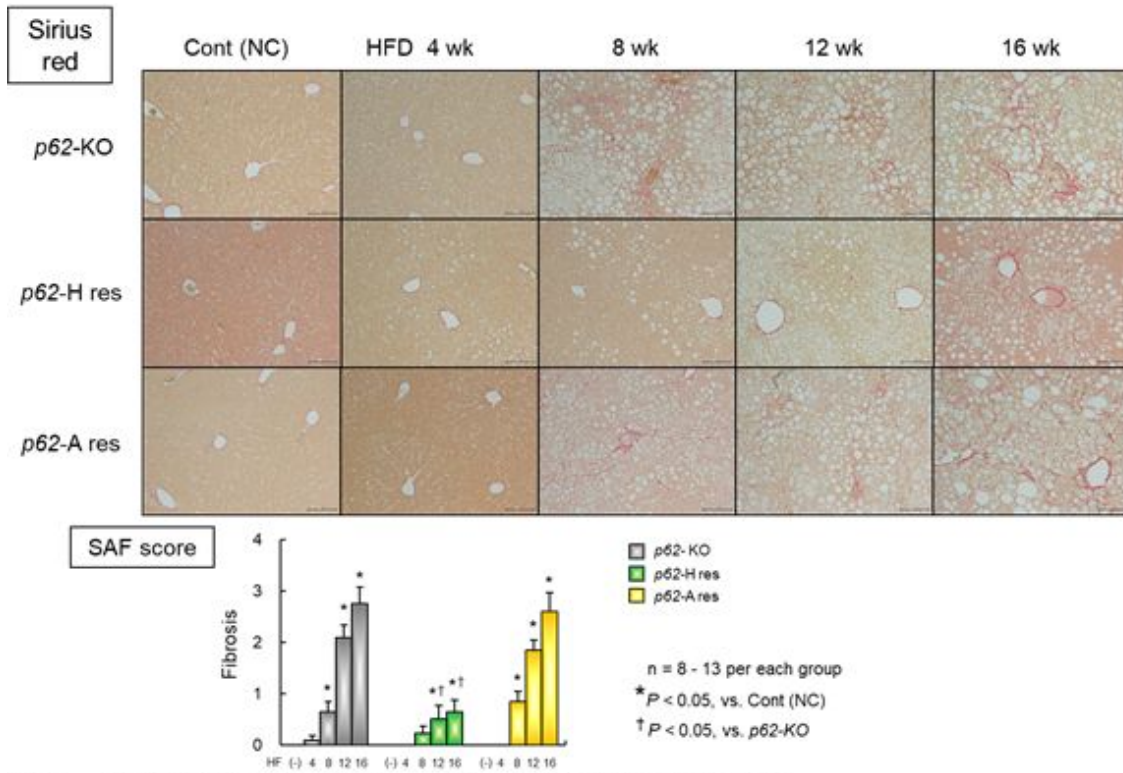


図3 肝細胞のp62レスキューは、肝線維化を抑制する。

血液生化学検査でも同様に、*p62-KO* と *p62-A res* と比較して *p62-H res* では AST および ALT の上昇が軽度であり、肝障害が抑制されていた (図4 上段)。

これらの結果から、肝細胞の p62 の遺伝子発現、すなわちレスキューは高脂肪食によって惹起される NASH を抑制することが明らかとなった。

一方、血液生化学検査で、中性脂肪 (TG)、コレステロール (HDL-C および LDL-C)、遊離脂肪酸 (FFA) について 3 群の間で差は認められなかった (図4 下段)。

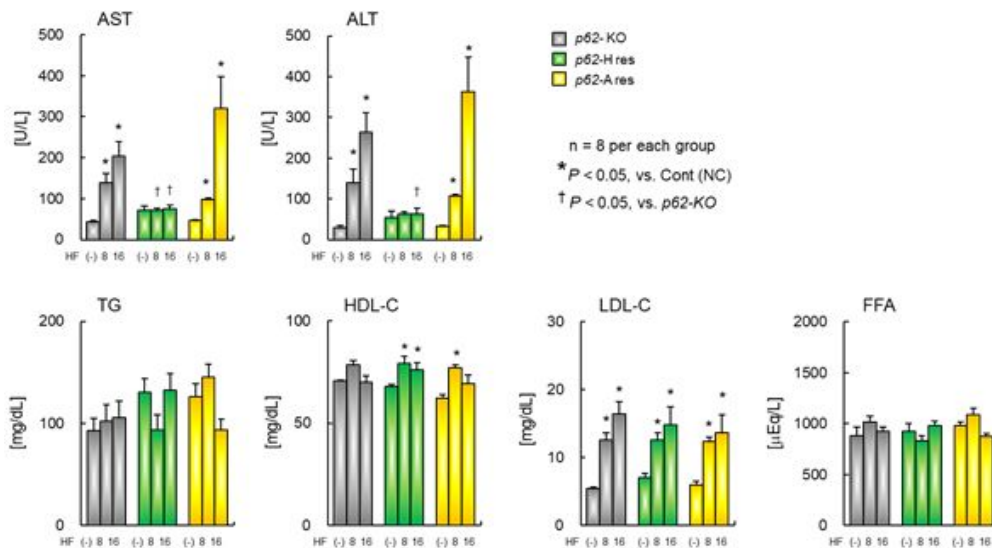


図4 肝細胞のp62レスキューは、肝障害を抑制する。

(3) 摂食制限は、p62 遺伝子欠失による NASH を回復させる。

WT と全身 p62 遺伝子欠失マウス (*p62-KO*) に高脂肪食を 12 週間摂餌させたのち、1 日 3g の通常食に制限する PF を行い、体重変化、体組成、肝病理を比較解析した。

PF 開始後は、WT、*p62-KO* とともに体重減少が認められ、解剖時の肝重量、WAT 重量も低下したが、なお WT と比較して *p62-KO* は体重、肝重量、WAT 重量は高値であった (図 5A&B)。肝病理では、PF 後も *p62-KO* の肝脂肪化、炎症、線維化が残存するものの、PF によって有意に改善しており (図 5C)、脂肪性肝炎の病態は p62 遺伝子欠失下においても可逆的であることが明らかとなった。

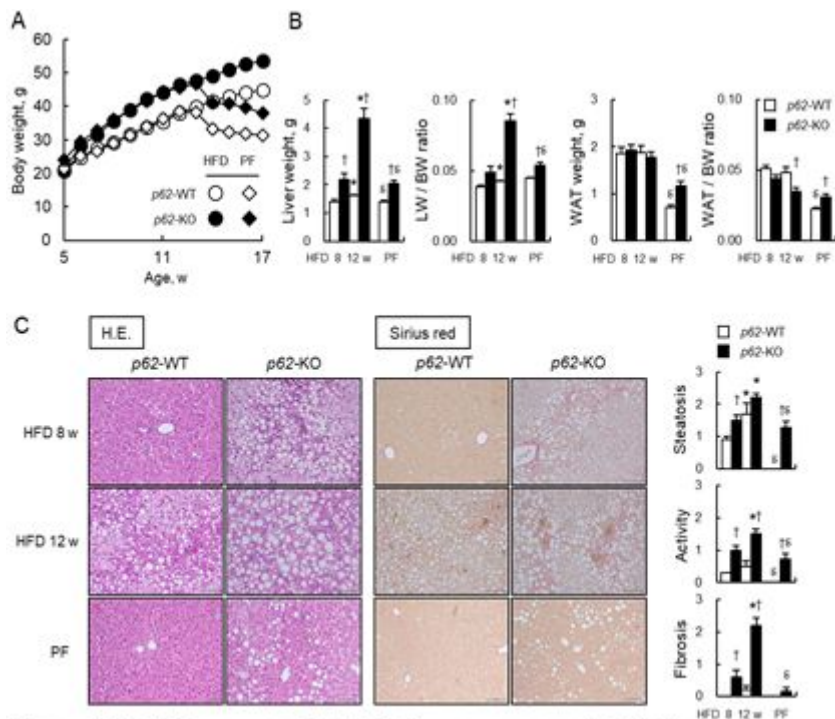


図5 摂食制限は、p62遺伝子欠失によるNASHを回復させる

(4) 脂肪酸は、肝細胞の p62, LC3, rubicon の発現を変化させる。

野生型 (WT) と p62-KO 培養肝細胞に PL または OL を暴露し p62, LC3 (autophagosome 形成), rubicon (autophagy 抑制因子) の変化を immunoblot にて解析した。

WT 細胞では、PL および OL 双方の暴露によって p62 のタンパク発現は増加し、LC3 の発現も WT, p62-KO でともに増加したが、LC3 の基礎発現は p62-KO で増加しており、p62-KO 細胞では、autophagy/lipophagy の障害が惹起・増悪しやすい状態であると考えられた。また、rubicon の発現は脂肪酸の暴露によって軽度増加したが、WT と p62-KO 細胞の間で差はなく、p62 とは非依存的な変化と考えられた (図6)。

一方、FAS, PPAR α , PPAR γ などの脂肪酸代謝に関わる遺伝子発現を qPCR で解析したが、脂肪酸の暴露によって増加するものの、p62 の発現の有無で差は認められなかった (data not shown)。

<考察>

(1) 動物実験の結果から、肝細胞特異的 p62 遺伝子レスキューマウスは、高脂肪食によって誘導される全身 p62 遺伝子欠失による NASH 進展を抑制することが明らかとなり、この結果は、脂肪細胞ではなく、特に肝細胞の p62 発現が NASH に対して防御的に機能していることを示した。一方、PF によって NASH が軽快した事実は、p62 欠失によって生じる脂肪性肝炎が不可逆的ではなく、治療の余地があることを示唆する。

(2) 細胞実験の結果から、p62 の欠失が脂肪酸による autophagy/lipophagy 障害を修飾・増悪させることが示唆された。

以上の結果から、肝細胞の p62 は NASH において autophagy/lipophagy を介して防御的な役割を演じていることが示唆された。p62 は、NASH 進展防御のための新規標的として有望であると考えられた。

今後の展望として、治療的な観点から、p62 の過剰発現が NASH を防御し得るかの検討 (p62 は賦活化剤が知られていないため、ウイルスによる過剰発現を検討)、autophagy/lipophagy の阻害剤あるいは賦活化剤を用いて、細胞の挙動や脂肪酸代謝の検討、を行うことを計画している。また、研究開始当初に計画したフラックスアナライザーを用いた細胞レベルでのミトコンドリア機能については未解析のため、今後の課題としたい。

最終的には、p62 を介した NASH に対する治療薬の臨床応用を目指したい。

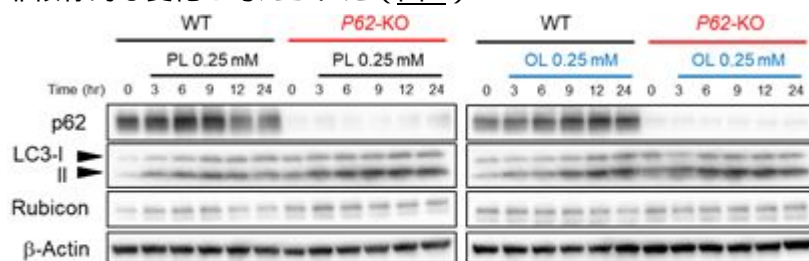


図6 培養肝細胞のp62およびLC3の発現は、脂肪酸の暴露によって変化する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aya Daisuke, Hoshi Takuo, Yamaguchi Hiroshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Predicting the amount of flumazenil needed to antagonize remimazolam	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Gastroenterology & Hepatology	6. 最初と最後の頁 1335 ~ 1336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MEG.0000000000002201	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 Hoshi Takuo, Tadokoro Yu, Nemoto Masaru, Honda Junya, Matsukura Shihori	4. 巻 7
2. 論文標題 Platypnea?orthodeoxia syndrome associated with COVID-19 pneumonia: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-021-00471-7	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 Miura Ikuru, Komine Shoichi, Okada Kosuke, Wada Shota, Warabi Eiji, Uchida Fumihiko, Oh Sechang, Suzuki Hideo, Mizokami Yuji, Shoda Junichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Prevention of non alcoholic steatohepatitis by long term exercise via the induction of phenotypic changes in Kupffer cells of hyperphagic obese mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14814/phy2.14859	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 綿引隆久, 岡田浩介, 正田純一
2. 発表標題 レドックスナノ粒子（RNP）はNASHモデルの肝線維化および肝癌を抑制する。
3. 学会等名 JDDW 2021, 神戸
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦征, 石井亜紀子, 綿引隆久, 岡田浩介, 和田聖大, 正田純一
2. 発表標題 継続的走運動は筋-肝連関を介して脂肪性肝炎の炎症・線維化を改善する
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会 (オンライン開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 脂肪酸代謝制御因子p62はマウス脂肪性肝炎を防御する - 組織細胞特異的p62遺伝子レスキューマウスの解析より
3. 学会等名 JDDW2020 (神戸)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 p62は肝臓-脂肪組織の連関による脂肪酸代謝の制御を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第56回肝臓学会総会 (大阪)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田浩介, 綿引隆久, 正田純一
2. 発表標題 p62は肝臓-脂肪組織の連関による脂肪酸代謝の制御を介してマウス脂肪性肝炎を防御する
3. 学会等名 第106回消化器病学会総会 (広島)
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
研究 分担者	柳川 徹 (Yanagawa Toru) (10312852)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	遺伝子改変マウスへの高脂肪食摂餌実験とその解析を行った。
研究 分担者	岡田 浩介 (Okada Kosuke) (80757526)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	研究計画立案に協力した。また、マウスの摂餌制限実験、細胞実験を実施した。
研究 分担者	正田 純一 (Shoda Junichi) (90241827)	筑波大学・医学医療系・客員教授 (12102)	遺伝子改変マウスの繁殖と供給を行った

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