

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16983

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝炎における肝細胞内のミトコンドリアDNAコピー数と機能評価

研究課題名（英文）Evaluation of mitochondrial DNA copy number and function in hepatocyte of non-alcoholic steatohepatitis in mice

研究代表者

荒生 祥尚（Arao, Yoshihisa）

新潟大学・医歯学総合病院・特任准教授

研究者番号：40870142

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：マイトファジーレポーターマウスを用いて、通常食、MCD、HFDを投与し、脂肪や線維化を評価したが、有意な変化は認めなかった。マイトファジーを示唆するmCherry単独の観察については、クエンチング処理を行ったが自家蛍光の影響で安定した観察が確立できなかった。q-PCRによりBNIP3、BNIP3Lを評価したところ、HFDとMCDでは発現が低下していた。機能評価としてATP assayを行ったが、こちらもHFDとMCDでは低下傾向であった。ウエスタンブロッティング、免疫蛍光染色画像で、BNIP3など評価したが、有意な差は認めなかった。これ以上の研究継続は困難と判断し、研究を終了とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボリック症候群や肥満の増加に伴って日本でも代謝機能不全に関連した脂肪肝炎（MASH：Metabolic dysfunction associated steatohepatitis）が増加している。脂肪肝炎から肝硬変への進展における肝細胞において、活性酸素による酸化ストレスは原因の一つであり、その影響を受けやすいミトコンドリアDNA（mtDNA）コピー数の変化は、病態のマーカー、重症度などとの関連が示唆されているが、未だ明らかとなっていない。mtDNAコピー数による効率的なMSAHの新規マーカーの有用性を見出そうとしたが、今回の研究では探索することが困難であった。

研究成果の概要（英文）：Mitophagy reporter mice were treated with normal diet, MCD, and HFD to evaluate fat and fibrosis, but no significant changes were observed. For observation of mCherry alone, which suggests mitophagy, quenching treatment was performed, but stable observation could not be established due to autofluorescence. q-PCR was used to evaluate BNIP3 and BNIP3L, and their expression was decreased in HFD and MCD. ATP assay was performed as a functional evaluation, showing a decreasing trend in HFD and MCD. Western blotting and immunofluorescence stained images were used to evaluate BNIP3 and other proteins, but no significant differences were observed. The study was terminated because it was deemed difficult to continue the study any further.

研究分野：肝臓病学

キーワード：MASH ミトコンドリア DNA copy number

### 1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群や肥満の増加に伴って日本でも代謝機能不全に関連した脂肪肝炎 (MASH : Metabolic dysfunction associated steatohepatitis) が増加している。脂肪性肝炎の病態形成には、インスリン抵抗性、エンドトキシン、脂質過酸化、酸化ストレスが並行して起こることが広く受け入れられている [1] が、その中に活性酸素 (Reactive Oxygen Species : ROS) やフリーラジカルによる酸化ストレスがある。ミトコンドリアは好気呼吸により ATP の産生を担うと同時に、その副次的な影響として常に活性酸素にさらされる。ミトコンドリア DNA (mtDNA) はヒストンとの複合体を形成することがなく、酸化ストレスの影響を直に受けやすく、変異や欠失・mtDNA コピー数を減少させる。mtDNA コピー数の変化は、脂肪酸代謝を含むエネルギー代謝や ROS の発生量を変化させることが予想され、NASH の病態にも関与している可能性があるが脂肪肝炎から肝硬変への進展における肝細胞において、活性酸素による酸化ストレスは原因の一つであり、その影響を受けやすいミトコンドリア DNA (mtDNA) コピー数の変化は、病態のマーカー、重症度などとの関連が示唆されているが、未だ明らかとなっていない。

[1] Tilg H, Moschen AR. Hepatology. 2010; 52: 1836-1846

### 2. 研究の目的

申請者らはこれまでの予備検討で、高脂肪食を投与させたマウス (HFD) や、メチオニンコリン欠乏食を投与させたマウス (MCD) などのいわゆる NAFLD モデルマウスで mtDNA コピー数を測定し、MCD では、HFD と比較して肝臓における mtDNA コピー数が減少していることを認めた。しかし、mtDNA コピー数の減少の機序については、ROS による DNA 損傷生成物質の 8-OHdG の発現量を調べたものの、MCD 群と HFD 群では有意な差は認めなかった。またミトコンドリアの形態はどちらもメガミトコンドリアという形態異常を示したものの、膜電位などミトコンドリアの機能は評価していなかった。

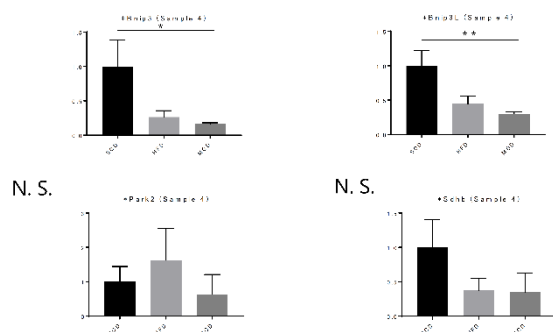
種々の NASH のモデルマウスを用いて肝組織や全身の状態変化と mtDNA コピー数、ミトコンドリアの形態・機能や、ミトコンドリアの品質保持マイトファジーの経時的な変化を検証、コピー数とミトコンドリア機能が NASH の病態との関連を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

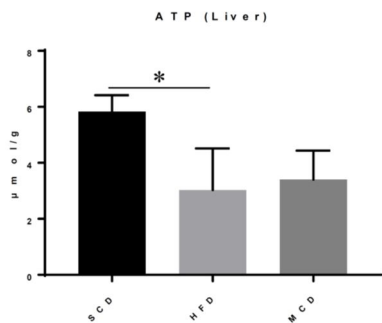
マイトファジーレポーターマウスを用いて、通常食、高脂肪食 (HFD)、メチオニンコリン欠乏食を飼育させて、mtDNA コピー数の変化とメカニズムの解析を行う。ミトコンドリアの機能評価として、ATP assay を行った。マイトファジーに関連している BNIP3 や BNIP3L を RT-PCR や、ウエスタンブロッティング、免疫蛍光染色画像で評価した。

### 4. 研究成果

マイトファジーレポーターマウスを用いて、通常食、MCD、HFD を投与し、脂肪や線維化を評価したが、有意な変化は認めなかった。マイトファジーを示唆する mCherry 単独の観察については、クエンチング処理を行ったが自家蛍光の影響で安定した観察が確立できなかった。q-PCR により BNIP3、BNIP3L を評価したところ、HFD と MCD では発現が低下していた。



機能評価として ATP assay を行ったが、こちらも HFD と MCD では低下傾向であった。



ウエスタンブロッティング、免疫蛍光染色画像で、BNIP3 など評価したが、有意な差は認めなかった。これ以上の研究継続は困難と判断し、研究を終了とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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