

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16990

研究課題名(和文)肝トランスポーターに基づいたNASH発症機序の解明

研究課題名(英文)The new mechanism of Non-alcoholic steatohepatitis based on the liver transporters.

研究代表者

谷口 達哉(TANIGUCHI, Tatsuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任講師

研究者番号：70518232

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): アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者の肝トランスポーターの発現変化や機能異常を明らかにすることにより、NASHの原因を解明し、治療創薬につなげることを目的とする。NASH症例の血清と肝臓組織を30検体、非NASH症例の検体を30検体ずつ集積した。NASH症例は非NASH症例と比較し、肝トランスポーター(OATP1, OATP3, MRP2, MRP3, NTCP)はmRNAの発現量に差はないものの、タンパクの産生量においては、NASH症例が有意に低下していることを確認した。細胞壁在トランスポーター蛋白を抽出したところ、NASH症例では非NASH症例と比較して減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH肝組織において細胞壁在肝トランスポーターの発現は健常組織と比較して優位に低下していた。このことから、細胞質内での翻訳後修飾の異常が、肝トランスポーターの細胞膜発現低下に関与していると考えられた。近年、胆汁酸をリガンドとするFXR(Farnesoid X receptor)アゴニストやTHR(Thyroid hormone receptor)アゴニストの臨床試験が行われている。これら胆汁酸と甲状腺ホルモンはOATPやNTCPによって肝細胞に取り込まれる。したがって、NASHにおける肝トランスポーターの機能変化が明らかになれば、これらNASH治療薬の効果予測が可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文): In this study, we focused on the disfunction of liver transporters in Non-alcoholic steatohepatitis(NASH) and purposed the drug development for NASH. We initially collected 30 tissues each of NASH and non-NASH, extracted the protein from these tissue. The protein of liver transporters(OATP1, OATP3, MRP2, MRP3, NTCP) in NASH liver are significantly decreased compared to non-NASH liver. In addition, the liver transporter protein on the cell surface are also significantly decreased. These results could clear the mechanism of NASH.

研究分野：肝臓

キーワード：肝トランスポーター 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疾患 (NAFLD: Nonalcoholic Fatty Liver Disease) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と言われ、その中で NASH は炎症・線維化を特徴とし、肝硬変や肝細胞癌に進展する疾患として注目されている。肥満人口の増加に伴い、今後 NASH を基盤とする肝硬変・肝癌の増加が予想されるが、食事・運動療法による減量以外に確立した治療法が存在しない。また、これまで肝硬変、肝癌の原因の大部分を占めていた B 型肝炎、C 型肝炎と異なり、患者の囲い込みが難しいため、フォローアップや治療介入が遅れることが問題となっている。そのため、NASH 進展の早期予測や有効な治療法が必要とされている。

一方、肝細胞膜に存在する肝トランスポーターは、多くの生命維持に必要なあるいは不要な化合物(ビリルビン、胆汁酸、LPS、ステロイド)の細胞内取り込み・排出を担っている。肝細胞への取り込みは NTCP と OATP family によって行われ、毛細胆管への排泄は BSEP と MRP2、また MRP3 および MRP4 は、肝内から類洞への排泄に関与する。最近、これらの肝トランスポーターの機能異常が NASH 肝組織で認められることが次々に報告されており、肝トランスポーターと NASH が密接に関係していることが示唆されている。しかし、*in vitro* で培養可能な肝細胞には正常トランスポーターがほとんど発現していないことや、特に OATP family はヒトとげっ歯類では存在する OATPs が一致しないことから、十分な解析が行なわれておらず、どのトランスポーターがどのような異常で NASH に関与しているかは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、NASH 肝細胞内における肝トランスポーターの機能変化について明らかにし、同環境下においた肝オルガノイドが NASH 及び肝硬変に進展するのか検討することを目的とする。NASH 成因に深く関わりとされる胆汁酸、LPS と、これらの化合物を肝細胞へ取り込み・排泄する肝トランスポーターの関連はいまだ明らかにされていない。胆汁酸や LPS の腸肝循環異常が、肝トランスポーターの細胞膜上発現低下によるものであり、それらが翻訳後修飾(グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化)機能異常によって引き起こされることが証明されれば、NASH 成因の一部として今後新たな診断や治療に結び付く可能性が高い。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト肝臓組織を収集、肝トランスポーターの細胞内局在と発現量の解析

当施設で肝生検や肝切除を施行された 50 例を対象にヒト肝組織を収集し、凍結保存する。ヒト肝組織からタンパク抽出を行い、細胞膜上のタンパクを Biotinalation 法で分離する。各種肝トランスポーター(OATP family, NTCP, MRP2, MRP3, MRP4, BSEP)の一次抗体を用いて Western Blot を行い、内在及び細胞膜上の肝トランスポーターの発現量を定量化する。また、病理組織学的検討にて各種トランスポーターの発現、細胞内局在を明らかにする。

### (2) 肝トランスポーターの翻訳後修飾(グリコシル化、リン酸化、ユビキチン化)異常の解析

50 例のヒト肝組織から抽出したタンパクをトリプシンで分解し、一部を PNGase F を用いて脱グリコシル化する。それぞれを LC-MS/MS で解析し、NASH 肝組織における内在及び細胞膜上のグリコシル化/非グリコシル化肝トランスポーターの定量及び糖付加

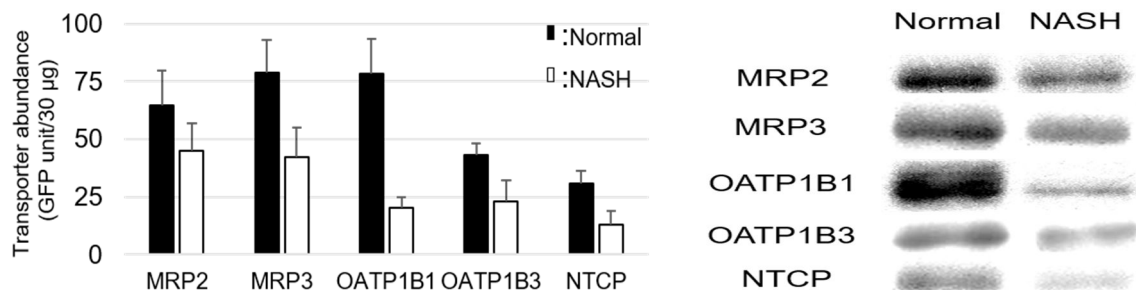
結合部位を解析する。

また、肝トランスポーターのリン酸化機能を検討するため、同患者肝組織検体 50 例を用い、リン酸化タンパクをトラップする 2 価金属イオン(Phos-tag®)を混合したゲルで電気泳動を行い、リン酸化/非リン酸化肝トランスポーターを分離する。Western Blot あるいは LS-MS/MS にてリン酸化/非リン酸化肝トランスポーターの定量及び結合部位を行い、NASH 肝組織における内在及び細胞膜上の肝トランスポーターのリン酸化異常を解析する。さらに、ヒト肝組織から抽出したタンパクから免疫沈降でユビキチン化されたタンパクを濃縮する。各種トランスポーターの一次抗体を用いて Western Blot を行い、内在及び細胞膜上のユビキチン化された肝トランスポーターの解析を行う。

#### 4. 研究成果

アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者の肝トランスポーターの発現変化や機能異常を明らかにすることにより、NASHの原因を解明し、治療創薬につなげることを目的とする。NASH 症例の血清と肝臓組織を 30 検体、非 NASH 症例の検体を 30 検体ずつ集積し、前年度より検体数を増加させた。昨年度までの成果として、NASH 症例は非 NASH 症例と比較し、肝トランスポーター(OATP1, OATP3, MRP2, MRP3, NTCP)は mRNA の発現量に差はないものの、タンパクの産生量においては、NASH 症例が有意に低下していることを確認している(図 1)。

図 1. 分離した細胞膜タンパクにおける肝トランスポーターの発現量の解析



同様にリン酸化トランスポーターを検出する抗体を使って、ウエスタンブロッティングを行った結果、NASH 症例において、各種トランスポーターのリン酸化タンパクは有意に減少していることが明らかになった。以上の結果から、細胞質内の何らかの修飾異常により成熟したトランスポーターが生成されず、細胞壁に正常なトランスポーターが輸送されないため、肝細胞に有害な胆汁酸や LPS が細胞外に排泄されず、肝細胞障害を来していることが予想された。そこで、最終年度では細胞内と細胞壁それぞれのトランスポーター蛋白を抽出したところ、NASH 症例では細胞壁に付着しているトランスポーターは非 NASH 症例と比較して減少していた。更にトランスポータータンパクの糖鎖付加の有無を調べるため、PNGaseF を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、非 NASH 症例では検出バンドが 20kDa ほど低い位置で確認されたが、NASH 症例ではバンドの位置は変化しなかった。このことから、細胞質内での不完全な糖鎖付加により、成熟したトランスポーターが細胞壁に輸送されなくなることが示唆された。今後、脂肪と糖鎖付加の低下の関連性について、研究を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0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
---------	---------