

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02892

研究課題名（和文）リン脂質のリポクオリティ変化からNASHの病態を解き明かす

研究課題名（英文）Unraveling the Pathophysiology of NASH through Changes in LipoQuality

研究代表者

中川 勇人（Nakagawa, Hayato）

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00555609

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：NAFLD肝癌モデルにおいてSREBP活性化に必須の分子SCAPを欠損させ、その長期的効果を検証した。しかしSREBP阻害によって肝脂肪蓄積は減るものの、予想に反して炎症、線維化、発癌が顕著に促進される結果となった。理由として、SREBP機能不全は生体膜リン脂質に組み込まれる脂肪酸組成を大きく変化させ、特に多価不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリンを減少させることによってER膜の流動性が低下し、ERストレスを介して病態を悪化させることがわかった。同様の現象は進行したヒトNAFLDでも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、進行したburned-out NASH で生じているSREBP を介した脂質生合成機能低下は、リン脂質組成の変化を介して病態進行を促進している可能性があり、リン脂質の補充や脂肪酸組み込み異常の是正が、進行NASH の治療法の一つとなる可能性が示唆された。また現在NASH に対して脂質生合成酵素を標的とした薬剤の開発が盛んに行われているが、過剰かつ広範な脂質生合成阻害はかえって病態を悪化させる可能性もあることがわかり、このことは今後の薬剤開発において重要な示唆を与えると思われる。

研究成果の概要（英文）：Enhanced de novo lipogenesis mediated by SREBP is thought to be involved in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) pathogenesis. In this study, we assessed the impact of SREBP inhibition on NASH and liver cancer development in murine models. Unexpectedly, SREBP inhibition via deletion of SCAP in the liver exacerbated liver injury, fibrosis, and carcinogenesis, despite markedly reduced hepatic steatosis. SCAP-SREBP pathway inhibition altered the fatty acid (FA) composition of phosphatidylcholines due to both impaired FA synthesis and disorganized FA incorporation into phosphatidylcholine via LPCAT3 downregulation, which led to endoplasmic reticulum stress and hepatocyte injury. Thus, excessively strong and broad lipogenesis inhibition was counterproductive for NASH therapy, which will have important clinical implications in NASH treatment.

研究分野：消化器病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 リン脂質代謝 脂質生合成経路

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)は、肝細胞への脂肪沈着に加え、炎症・線維化を伴い、肝硬変や肝癌へと至る進行性の疾患であるが、未だ治療薬として承認された薬剤がない。また NASH 患者の予後に最も影響を与える因子は肝線維化であることから、特に肝線維化が進行した NASH に対する新たな治療法の開発が急務である。NASH は肝臓への脂肪沈着を特徴とするが、実際には肝線維化が進行すると肝組織中の脂肪沈着はむしろ減少・消失し、burned-out NASH と呼ばれる状態となり、肝硬変や肝発癌の高リスク群であることが知られている。burned-out NASH では脂質生合成のマスターレギュレーターSREBP1c の発現が減少し、脂質生合成が低下していることが一つの原因と報告されているが、burned-out という現象が NASH の病態進展においてもつ意義はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

我々はこれまで NASH 進展における脂質生合成経路の役割について解析してきたが、予期せぬところから burned-out NASH を模倣したマウスモデルを樹立することに成功した。そこで本研究では、同モデルを用いて進行 NASH の病態について解析し、特にリン脂質代謝に着目して病態解明と治療法開発に挑む。

3. 研究の方法

SREBP 活性化を伴って NASH から HCC を発症する肝臓特異的 PTEN 欠損マウスに、SREBP 活性化に必須の分子 SCAP を欠損させ、肝臓特異的 PTEN 欠損 SREBP 不活性化マウスを作成し(PS-DKO マウス)、フェノタイプを解析するとともに、そのメカニズムを紹介に解析した。

4. 研究成果

NASH モデルマウスで SCAP を欠損させると肝臓の壊死炎症・線維化・発癌が増悪する
我々は以前に NASH・肥満関連肝癌に起きている代謝変化を網羅的に解析し、SREBP 活性化に伴う脂質生合成亢進は NASH・肥満関連肝癌だけでなく肝細胞癌において幅広くみられる現象であることを見出した。そこで SREBP 活性化阻害が NASH および肝癌の予防・治療につながるのではないかと考え、マウスモデルによる検証を行った。NASH 肝癌モデルとして、SREBP 活性化を伴って NASH から肝細胞癌を発症する肝臓特異的 PTEN 欠損マウス(Alb-Cre;PTEN^{F/F})を用い、さらに SREBP 活性化に必須の分子 SCAP を欠損させたマウスを交配させ、肝臓特異的 PTEN 欠損 SREBP 不活性化マウスを作成した(Alb-Cre;PTEN^{F/F};SCAP^{F/F}→PS-DKO マウス)。SREBP は活性化の際にエスコートタンパク SCAP により小胞体からゴルジ体に輸送される必要があり、SCAP が欠損すると SREBP 活性化がほぼ完全に阻害される。PS-DKO マウスでは予想通り肝細胞の脂肪滴形成が著明に抑制されたが、肝細胞障害・炎症はむしろ悪化し、5 か月齢で肝硬変、さらに 7 か月齢で多発肝癌を発症するという全く予想に反する結果となった(図 1 a, b)。また別の NASH 肝癌モデルであるコリン欠乏高脂肪食モデルにおいても、同様の結果が得られた。ヒト NASH でも線維化が進行すると次第に肝脂肪蓄積が減少することが知られ、burned-out NASH と呼ばれているが、重要なことに、burned-out NASH では SREBP の発現レベルがむしろ低下することが報告されている。すなわち、本マウスモデルの実験結果と合わせて、進行 NASH で生じている脂質生合成低下は、それ自体が NASH から肝硬変・肝癌へと病態進展を加速させる因子なのではないかと仮説を立て検証することとした。

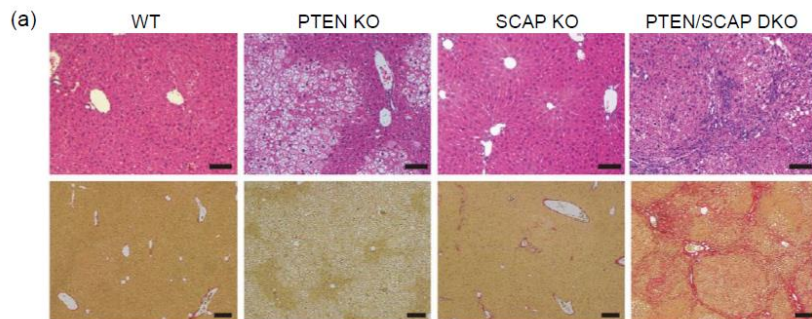


図 1. NASH 肝癌マウスモデルにおける SREBP 阻害効果

- (a) 各マウスの 5 か月齢での肝臓病理像。上段：H&E 染色、下段：Sirius Red 染色。(scale bar: 上段 100 μ m、下段 250 μ m)
 (b) 7 か月齢の PTEN KO マウスと PTEN/SCAP DKO マウスの肝臓肉眼像

SREBP 機能回復による肝障害改善効果

SCAP 欠損によって NASH 肝癌が促進されることがわかったが、SCAP に SREBP 活性化以外の作用が存在する可能性が否定できない。そこで PS-DKO マウスに、SCAP による活性化を必要としない活性型 SREBP1a の肝臓特異的トランスジェニックマウスを交配させることによって、SREBP 機能を回復させる実験を行った (DKO+S1aTg マウス)。すると DKO+S1aTg マウスでは炎症細胞浸潤や肝細胞死が著明に改善し、いわゆる“単純性脂肪肝”となった。さらに長期観察すると肝線維化・発癌も著明に抑制された。また AAV ベクターを用いて SREBP 機能を回復させた実験でも同様の結果が得られた (図 2)。したがって PS-DKO マウスで起きている肝障害は SREBP 機能の喪失によるものであることが証明されるとともに、脂質合成の回復が治療につながる可能性が示唆された。

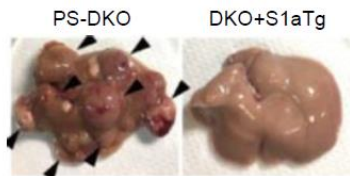


図 2. SREBP 機能回復による肝発癌抑制効果

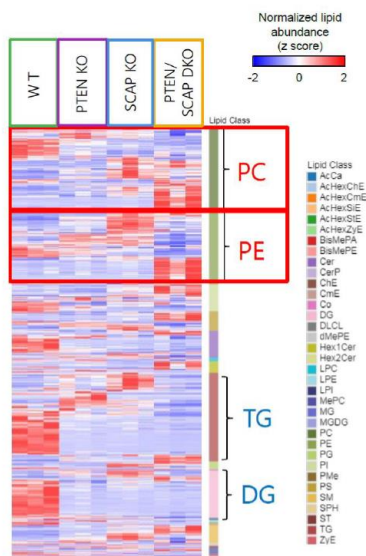
7 か月齢の PS-DKO マウスおよび DKO+S1aTg マウスの肝臓肉眼像

脂質合成機能障害による肝病態悪化にはリン脂質代謝異常が関与している

次いで PS-DKO マウスで起きている事象を明らかにするため、各 genotype のマウス肝組織を用いてトランスクリプトーム解析を行った。PTEN/SCAP DKO マウスでは、予想通り脂質代謝関連経路が著明に低下している一方で、小胞体ストレスシグナル経路が著明に活性化していた。そこで小胞体ストレスを軽減する作用を持つ分子シャペロンである GRP78 をアデノウイルスベクターによって PS-DKO マウスの肝臓に導入したところ、有意に肝障害が改善した。

次に PS-DKO マウスの肝組織を用いて GC-MS, LC-MS による網羅的リポミクス解析を行ったところ、リン脂質に組み込まれている脂肪酸の組成が大きく変化していることがわかった (図 3a)。特に小胞体膜の流動性維持に重要な C20:4 などの多価不飽和脂肪酸(poly-unsaturated fatty acid; PUFA)を含むホスファチジルコリン(PC)が減少していたことから (図 3b)、PS-DKO マウスでは、de novo 脂肪酸合成能低下の結果として小胞体膜リン脂質の組成が変化し、小胞体ストレスが発生しやすい状況が生じているものと考えられた。そこで PS-DKO マウス由来初代肝細胞に、小胞体膜に取り込まれる特性を持つリポソームを用いて PUFA を含む PC 導入する実験を行ったところ、小胞体ストレスが有意に減弱した。さらに PS-DKO マウスに PC カクテルを補充することによって、小胞体ストレス・肝障害が有意に改善したことから、脂質合成阻害は小胞体膜におけるリン脂質組成異常を介して小胞体ストレス・肝障害を惹起すると考えられた。

(a)



(b)

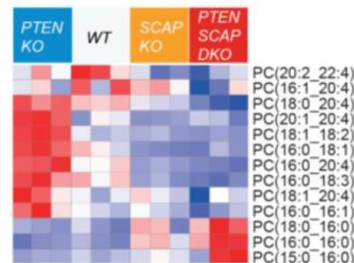


図 3. 網羅的リポドミクス解析

- (a) 各ジェノタイプ（WT, PTEN KO, SCAP KO, DKO）の 5 週齢マウスの肝組織を用いた網羅的リポドミクス解析
 (b) (a) のホスファチジルコリンの部分拡大したヒートマップ

SREBP 阻害は LPCAT3 によるリン脂質リモデリング障害を介してリン脂質代謝の恒常性破綻を招く

次に SREBP 機能を回復させることによってリン脂質組成異常が改善するか検討した。PS-DKO マウスと DKO+S1aTg マウスの肝組織中脂質プロファイルと比較したところ、脂質生合成全体が回復する一方で、PC 分画においては PUFA を含む PC だけが選択的に増加し、飽和脂肪酸からなる PC は減少していた。よって PS-DKO マウスにおいてリン脂質組成変化は、脂肪酸の合成低下だけでは説明できないことがわかった。生体膜リン脂質は新規合成と脂肪酸リモデリングの二つの過程を経て合成され、特に PUFA はリモデリングの過程で導入されるが、PS-DKO マウスでは脂肪酸リモデリングに関わるリゾリン脂質アシル転移酵素群の発現パターンが大きく変化していた。特に PUFA を PC へ組み込む酵素である LPCAT3 の発現は、PS-DKO マウスで大きく減少し、SREBP 導入によって回復することがわかった。そこで PS-DKO マウス由来初代肝細胞にアデノウイルスを用いて LPCAT3 を導入すると、その発現量に応じて小胞体ストレスが減弱した。さらに SREBP 機能障害による LPCAT3 発現低下は、核内転写因子 LXR の活性低下によるものであることもわかり、実際に LXR 作動薬によって PS-DKO マウスの肝障害が改善した。

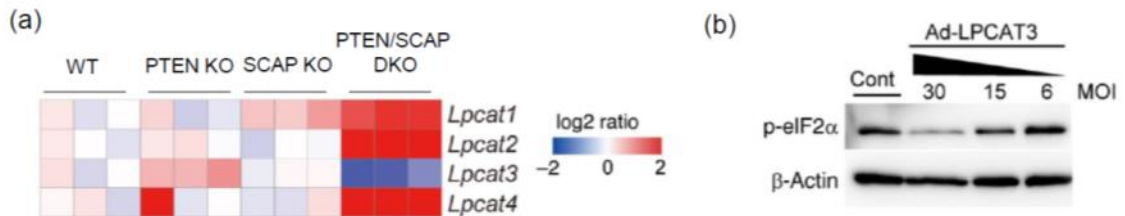


図 4. LPCAT3 の発現低下を介した小胞体ストレスの誘導

- (a) 各ジェノタイプ（WT, PTEN KO, SCAP KO, DKO）の 5 週齢マウスの肝臓における LPCAT ファミリーの発現（RNA-seq データより）
 (b) PTEN/SCAP DKO マウス由来の初代肝細胞にアデノウイルスを用いて LPCAT3 を発現させ、小胞体ストレスマーカーの一つ p-eIF2α の発現をウエスタンブロットにて検討

臨床検体を用いた検証

ヨーロッパから報告された 206 例の NASH 肝生検の RNA-seq データおよび我々の NASH 肝生検 94 例の RNA-seq データを解析し、本研究結果のヒトへの応用可能性を検証した。肝線維化進行に伴う SREBF1 の発現低下は、本データセットでも確認することができ、さらに SCAP および LPCAT3 も肝線維化進行とともにその発現が低下していた。また興味深いことに SCAP, SREBP1, SREBP2, LPCAT3, LXR target gene の ABCG8 の間にはいずれも非常に強い正の相関があり、SCAP-SREBP-LXR-LPCAT3 axis は、ヒト NASH においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

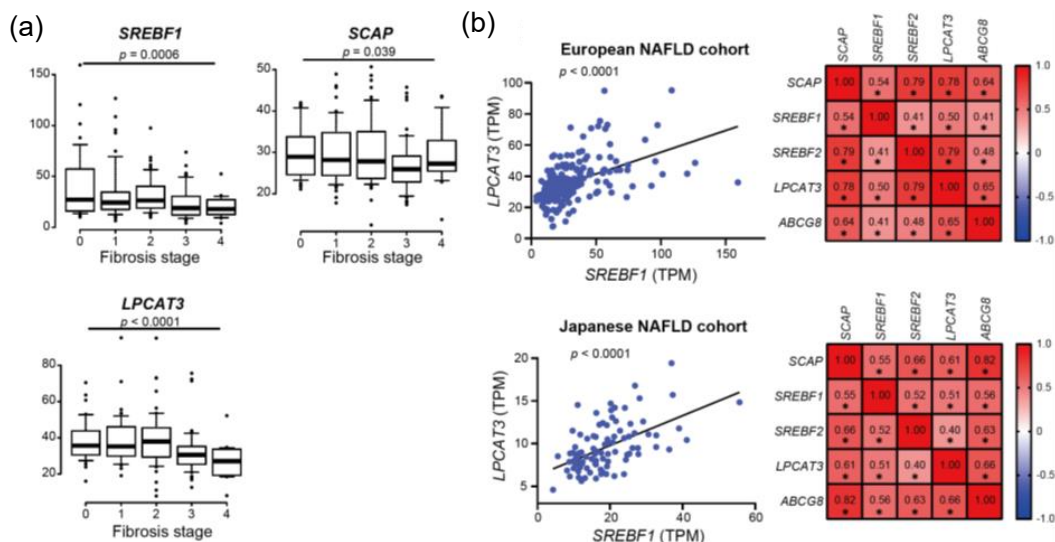


図 5. NAFLD 肝生検検体を用いた検討

- (a) 各種遺伝子発現量と肝線維化との相関
(b) SREBF1 と LPCAT3 の発現量の相関 (左図)、および各種遺伝子の Spearman's rank-correlation matrix (右図)

SREBP 機能低下とオートファジー障害は協調的に肝病態を悪化させる

SCAP 単独欠損では肝障害を生じないが、PTEN 欠損を組み合わせることで著明に病態が悪化する。その理由についてオートファジーに着目した。オートファジーは、小胞体を含む不要な細胞内小器官を分解する作用を有するが、PTEN 欠損に伴う mTOR 経路活性化によりオートファジー機能が低下すると膜の流動性が低下した異常な小胞体を除去できず、結果として小胞体ストレスや細胞死を招くと考えた。そこで mTOR 阻害剤を PTEN/SCAP DKO マウスに投与したところ、肝障害が改善した。さらに、より直接的にオートファジーの関与を調べるため、SCAP KO マウスにオートファジー誘導に必須の分子 ATG5 を DKO したマウスを作成したところ、SCAP 欠損と ATG5 欠損は協調的に肝障害を悪化させ、肝発癌を促進することがわかった。オートファジー障害はヒト進行 NASH でも生じており、同機序による病態悪化はヒト NASH でも生じている可能性が示唆された。

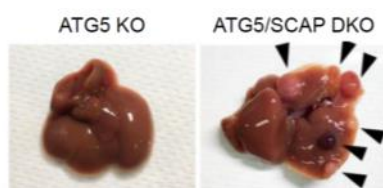


図 6. SCAP 欠損と ATG5 欠損による協調的発癌促進効果

10 か月齢の ATG5 KO マウスおよび ATG5/SCAP DKO マウスの肝臓肉眼像

これらの研究結果から、進行した burned-out NASH で生じている SREBP を介した脂質生合成機能低下は、リン脂質組成の変化を介して病態進行を促進している可能性があり、リン脂質の補充や脂肪酸組み込み異常の是正が、進行 NASH の治療法の一つとなる可能性が示唆された。また現在 NASH に対して脂質生合成酵素を標的とした薬剤の開発が盛んに行われているが、過剰かつ広範な脂質生合成阻害はかえって病態を悪化させる可能性もあることがわかり、このことは今後の薬剤開発において重要な示唆を与えらると思われる。加えて、初期の NASH と burned-out NASH では、病態における脂質代謝経路の働きが大きく変化しており、将来的には個々のステージに応じて、より個別化された治療戦略が必要になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kawamura S, Matsushita Y, Kurosaki S, Tange M, Fujiwara N, Hayata Y, Hayakawa Y, Suzuki N, Hata M, Tsuboi M, Kishikawa T, Kinoshita H, Nakatsuka T, Sato M, Kudo Y, Hoshida Y, Umemura A, Eguchi A, Ikenoue T, Hirata Y, Uesugi M, Tateishi R, Tateishi K, Fujishiro M, Koike K, Nakagawa H	4. 巻 132
2. 論文標題 Inhibiting SCAP/SREBP exacerbates liver injury and carcinogenesis in murine nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Invest.	6. 最初と最後の頁 e151895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI151895	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 Tamai Y, Eguchi A, Shigefuku R, Kitamura H, Tempaku M, Sugimoto R, Kobayashi Y, Iwasa M, Takei Y, Nakagawa H	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of lithocholic acid with skeletal muscle hypertrophy through TGR5-IGF-1 and skeletal muscle mass in cultured mouse myotubes, chronic liver disease rats and humans.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife.	6. 最初と最後の頁 e80638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.80638	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 Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, Tamai Y, Shigefuku R, Hasegawa H, Hirokawa Y, Hayashi A, Okuno K, Matsushita Y, Nakatsuka T, Enooku K, Sakaguchi K, Kobayashi Y, Yamaguchi T, Watanabe M, Takei Y, Nakagawa H.	4. 巻 6
2. 論文標題 A new detection system for serum fragmented cytokeratin 18 as a biomarker reflecting histologic activities of human nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatol Commun.	6. 最初と最後の頁 1987-1999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1971	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 Iwasa Motoh, Sugimoto Ryosuke, Eguchi Akiko, Tamai Yasuyuki, Shigefuku Ryuta, Fujiwara Naoto, Tanaka Hideaki, Kobayashi Yoshinao, Ikoma Jiro, Kaito Masahiko, Nakagawa Hayato	4. 巻 -
2. 論文標題 Effectiveness of 1-year pemafibrate treatment on steatotic liver disease: the influence of alcohol consumption	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 European Journal of Gastroenterology & Hepatology	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) 10.1097/MEG.0000000000002766	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 Fujiwara Naoto, Kimura Genki, Nakagawa Hayato	4. 巻 -
2. 論文標題 Emerging role of spatial transcriptomics in liver research	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Seminars in Liver Disease	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) 10.1055/a-2299-7880	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 Nakagawa Hayato, Lin Aifu	4. 巻 -
2. 論文標題 The translation of oncogenic mRNAs regulated by pseudouridylation: A new player in HCC	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology	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) 10.1097/HEP.0000000000000761	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 -

1. 著者名 Yamada Tomoharu, Fujiwara Naoto, Kubota Naoto, Matsushita Yuki, Nakatsuka Takuma, Kurosaki Shigeyuki, Minami Tatsuya, Tateishi Ryosuke, Ichida Akihiko, Arita Junichi, Hasegawa Kiyoshi, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro, Nakagawa Hayato	4. 巻 7
2. 論文標題 Lenvatinib recruits cytotoxic GZMK+CD8 T cells in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 e0209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HCG.0000000000000209	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 Tamai Yasuyuki, Fujiwara Naoto, Tanaka Takamitsu, Mizuno Shugo, Nakagawa Hayato	4. 巻 15
2. 論文標題 Combination Therapy of Immune Checkpoint Inhibitors with Locoregional Therapy for Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5072 ~ 5072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15205072	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 中川 勇人	4. 巻 118
2. 論文標題 NASHの治療 薬物療法の現状と将来展望	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 829 ~ 839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.118.829	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10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Nakagawa H
2. 発表標題 Genomic and molecular profiling-based personalized medicine for liver cancer.
3. 学会等名 APASL Oncology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川勇人
2. 発表標題 Lipid Metabolism in NASH and NASH-related hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 第81回癌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中川勇人
2. 発表標題 Liver Cancer Research - Host Genome, Immunity and Pathology - Summary & Prospects
3. 学会等名 第58回肝臓学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawamura S, Nakagawa H, Koike K.
2. 発表標題 Inhibition of SCAP/SREBP-mediated lipogenesis exacerbates liver injury and carcinogenesis in murine NASH via phospholipid metabolism disturbance.
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川 勇人
2. 発表標題 Unexpected exacerbation of liver injury and carcinogenesis by inhibiting SCAP/SREBP in murine NASH.
3. 学会等名 第80回癌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nakagawa H
2. 発表標題 Lipogenic pathway in NAFLD and NAFLD-related HCC: Friend or Foe?
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会JSH-AASLD Joint Session. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒崎滋之、中川 勇人、小池和彦.
2. 発表標題 Wnt/ カテニン経路活性化ニッチを標的とした肝発癌予防の可能性.
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田友春、中川勇人、小池和彦
2. 発表標題 Digital Spatial Profiling技術を用いたレンパチニブ投与後の腫瘍内免疫微小環境変化の検討.
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中川勇人
2. 発表標題 肝細胞癌における微小環境解析の最新知見
3. 学会等名 第82回癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川勇人
2. 発表標題 個別化医療を見据えたNAFLD肝生検組織の網羅的transcriptome解析
3. 学会等名 第59回肝臓学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023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	工藤 洋太郎 (Kudo Yotaro) (90608358)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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