

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861179

研究課題名(和文) NAFLDに伴う肝再生障害に対する抗GADD34作用の有用性の検討

研究課題名(英文) Analysis of the effects of Gadd34 inhibition to impaired liver regeneration in NAFLD

研究代表者

稲葉 有香 (INABA, YUKA)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・特任助教

研究者番号：20571970

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)：肝臓は強靱な再生能を有するが、脂肪肝では肝再生能が障害されている。我々は、高脂肪食負荷した脂肪肝マウスの70%肝切除後の再生過程において、eIF2リン酸化を介した統合的ストレス応答(ISR)が増強することを見出した。eIF2の脱リン酸化酵素Gadd34は、ISRを制御している。Gadd34機能阻害は、肝再生過程におけるISRを増強し、細胞増殖抑制、肝細胞死増加と共に、ALT値上昇を引き起こした。一方、過剰発現では、ISRが減弱し、肝臓/体重比の増加とALT値の軽減を示した。これらの結果は、Gadd34によるISR制御が、脂肪肝再生障害に重要な役割を果たすことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The liver has robust regenerative potential in response to damage, but hepatic steatosis weakens this potential. We found that the enhanced integrated stress response (ISR) mediated by phosphorylation of eIF2 impairs regeneration in hepatic steatosis. Gadd34 is known to regulate ISR by dephosphorylation of eIF2. Gadd34 knockdown enhanced ISR, reduced hepatocyte proliferation, increased cell death, and increased plasma ALT levels. In contrast, Gadd34 overexpression suppressed ISR, hepatocyte apoptosis without affecting hepatocyte proliferation, and decreased plasma ALT levels, clearly improving fatty liver regeneration. These data suggest that Gadd34-mediated regulation of ISR acts as a physiological defense mechanism against impaired liver regeneration due to steatosis.

研究分野：肝臓学、代謝学

キーワード：NAFLD 肝切除 肝再生 統合的ストレス応答 Gadd34 eIF2a アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に伴う肝再生障害は、術後合併症の危険因子である。線維化を伴わない単純性脂肪肝においても、肝再生障害が発症するという事実は、実験動物での検討からのみならず、実際の臨床の場においても広く認識されている。このような NAFLD における肝再生障害の危険性が広く知られる一方で、その病因および治療法については、十分に解明されていない。

脂肪肝での肝細胞において、細胞内小器官である小胞体での細胞内ストレス (小胞体ストレス) が増強する事が知られていた。そこで、代表者は、本研究課題に先立ち、脂肪肝切除後の肝再生障害メカニズムについて、小胞体ストレスが果たす役割に着眼し、マウスによる基礎検討を行い、以下の結果を見出していた。

- ・薬剤性小胞体ストレス誘導により肝切除後肝再生が障害

- ・小胞体ストレス下で、ストレス誘導性脱リン酸化酵素である Gadd34 の発現が肝臓で増強

- ・Gadd34 阻害により、高脂肪食による脂肪肝での切除後肝重量が増加

Gadd34 は、タンパク翻訳因子 eIF2 α を脱リン酸化する酵素である。eIF2 α のリン酸化 (p-eIF2 α) は、小胞体ストレスを含む様々な細胞内ストレスに共通して起こることから、統合的ストレス応答 (ISR) としても知られている。これらのことから、脂肪肝切除後肝再生障害に、ISR が重要な役割を果たし、そのメカニズムとして Gadd34 が関与する可能性が示唆された。肝臓 Gadd34 は、小胞体での蛋白翻訳調節作用に重要である事が知られているが、肝再生における役割は、全く解明されていなかった。

Gadd34 による肝切除後肝再生の障害メカニズムを解明することは、NAFLD における肝再生障害の病態を理解する上で重要な役割を果たすだけでなく、肝切除後肝再生障害に対する新規治療標的の同定に繋がる可能性を秘めており、その臨床的意義は大きいものと考えている。

2. 研究の目的

本研究課題では、1) NAFLD に伴う肝切除後肝再生の障害における Gadd34 の役割を解明するとともに、2) Gadd34 による肝切除後肝再生の障害メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

NAFLD モデルとして、2週間の高脂肪食 (HF) 負荷による中等度脂肪肝マウスモデルを用いた。Gadd34 機能阻害モデルとして、薬剤 (サルプリナル) 投与マウス、および siRNA による Gadd34 ノックダウンマウスを使用した。Gadd34 過剰発現モデルとして、Gadd34 トランスジェニックマウス及びアデ

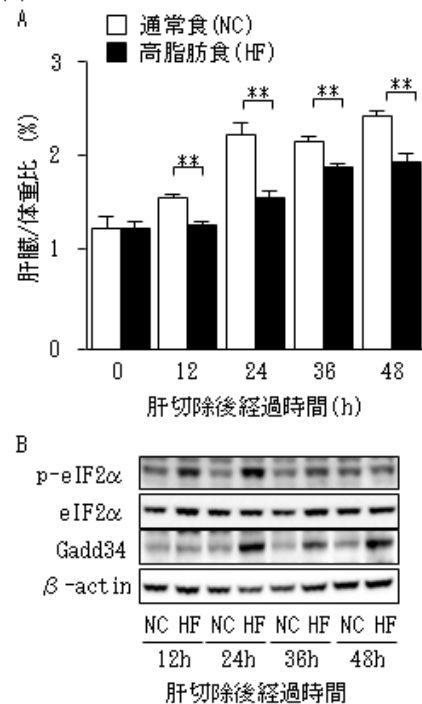
ノ随伴ウイルスによる Gadd34 遺伝子導入モデルを使用した。

上記マウスモデルに対し、それぞれ 70% 肝切除を行い、切除前及び切除後脂肪肝再生過程を検討した。肝切除後の体重・肝重量を測定した。肝障害を血中 ALT・AST 値により評価した。肝細胞増殖は、BrdU 投与後の BrdU 陽性細胞数、および細胞周期関連因子の遺伝子発現・タンパク発現により評価した。肝細胞死は、タネル陽性細胞数、および細胞死関連因子の遺伝子発現・タンパク発現により評価した。

4. 研究成果

通常食による正常肝マウスでは、肝臓が切除後 48 時間で約 2 倍に増加するのに対し、高脂肪食による脂肪肝マウスでは、肝重量の増加が障害され (図 1A)、脂肪肝再生障害が示唆された。我々は、この脂肪肝再生過程において、eIF2 α のリン酸化亢進及び、Gadd34 の発現増加を見出した (図 1B)。

図 1



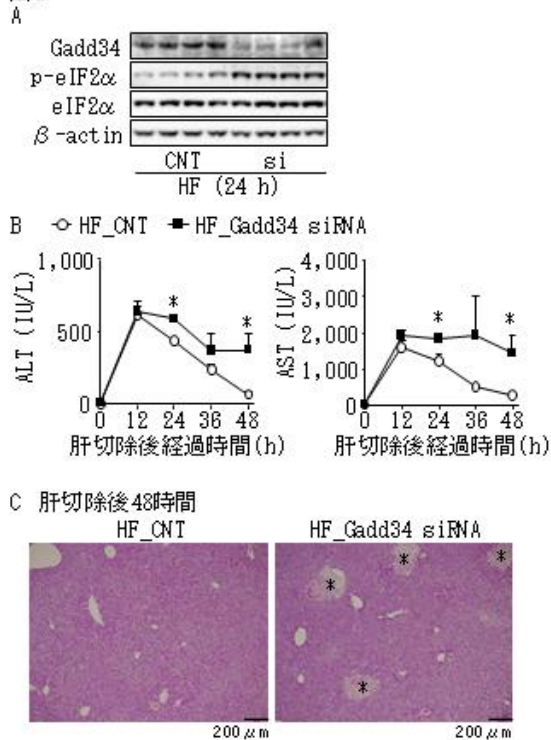
(Inaba et al., Hepatology (2015) より改変引用)

まず、siRNA または阻害剤 (サルプリナル) 投与による機能喪失実験を行い、脂肪肝再生過程における Gadd34 の役割を検討した。脂肪肝再生過程において、siRNA による Gadd34 ノックダウンは、p-eIF2 α を増加させ (図 2A)、ISR を増強することが示唆された。p-eIF2 α に伴い転写因子 CHOP が誘導されアポトーシスが誘導されることが知られている。実際に、Gadd34 ノックダウンでは、CHOP 発現が亢進し、アポトーシス実行因子 cleaved-caspase3 が増加し、タネル染色陽性細胞が増加した。

また、血漿 ALT・AST 値が対照と比較して、有意な高値を呈し(図 2B)、肝組織像では、散在する壊死巣が出現しており(図 2C、*:壊死巣)、明らかな肝細胞障害を示唆した。また、Gadd34 ノックダウンにより、脂肪肝での肝再生過程において 肝細胞周期関連因子のタンパク発現が減少し、BrdU 染色陽性細胞が減少した。サルブリナル投与による Gadd34 阻害においても、siRNA 投与時と同様の結果を得た。これらの結果は、Gadd34 機能阻害により、細胞増殖の障害に加え、CHOP の発現増加に伴うアポトーシスの亢進が起り、脂肪肝における肝再生障害が悪化したことを示唆している。

本研究計画当初、Gadd34 の阻害は、肝重量が対照と比較し、有意に増加したことから、肝再生を改善させると予測していた。しかし、この肝重量の増加は、肝細胞死の亢進による浮腫によるものと考えられる。

図2



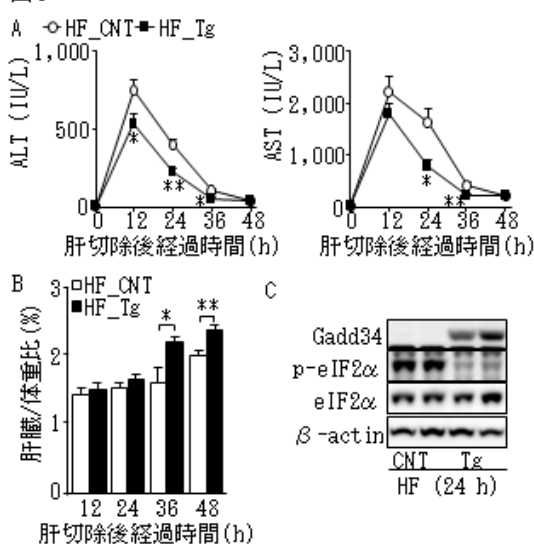
(Inaba et al., Hepatology (2015) より改変引用)

次に、肝臓特異的 Gadd34 トランスジェニックマウス (Tg) を用いて、Gadd34 の脂肪肝再生障害における作用を検討した。脂肪肝での切除後肝再生過程において、Tg と対照の両者間で肝組織像では変化を認めず、Tg では血漿 ALT・AST 値が低下し、肝重量の回復が促進した(図 3A, B)。肝再生過程において、Tg では p-eIF2α が減少しており(図 3C)、ISR の軽減が示唆された。これに伴い、CHOP の発現が減少し、Cleaved-caspase3 が減弱した。さらに、タネル陽性細胞は有意に減少しており、肝細

胞死の軽減が示唆された。一方で、野生型マウスと Tg の間に、脂肪肝再生過程での BrdU 染色陽性細胞数・細胞周期関連因子の発現量に明らかな差を示さなかった。これらの結果は、Gadd34 過剰発現が、アポトーシスの抑制を介して、脂肪肝再生障害を改善する可能性を示唆している。

さらに、高度な脂肪肝を呈するレプチン受容体欠損 db/db マウスにおける、切除後肝再生を検討した。db/db マウスでは、対照と比べて著しく肝再生が障害される。そこで、Gadd34 をコードするアデノ随伴ウイルスを用い、db/db マウス肝臓へ Gadd34 の遺伝子導入を行い、Gadd34 の肝切除後肝再生障害への有用性を検討した。Gadd34 遺伝子導入により、肝切除後の肝重量は有意に増加し、脂肪肝再生過程における血漿 ALT/AST 値が改善した。この結果は、db/db マウスの持つ高度脂肪肝での再生障害の改善においても Gadd34 が重要な役割を担う可能性を示唆している。

図3



(Inaba et al., Hepatology (2015) より改変引用)

我々は、Gadd34 による ISR 制御が、脂肪肝における肝再生障害に対する生体防御機構として重要な役割を果たすことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Inaba Y, Furutani T, Kimura K, Watanabe H, Haga S, Kido Y, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, Inoue H, Gadd34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis. Hepatology. 2015 Apr;61(4):1343-56 (査読有)
DOI: 10.1002/hep.27619

[学会発表] (計 4 件)

- ① 稲葉 有香、松本 道宏、尾崎 倫孝、春日 雅人、井上 啓：肥満による肝切除後肝再生障害における eIF2 α リン酸化制御の重要性、第 51 回日本臨床分子医学会学術集会、2014 年 4 月 11 日～12 日、東京国際フォーラム(東京都)
- ② 稲葉 有香、芳賀 早苗、尾崎 倫孝、春日 雅人、井上 啓：脂肪肝に伴う切除後肝再生障害に対する eIF2 α リン酸化制御の重要性、第 21 回肝細胞研究会、2014 年 6 月 27 日～28 日、東京医科歯科大学(東京都)
- ③ 稲葉 有香、松本 道宏、春日 雅人、井上 啓：Gadd34 は脂肪肝での肝再生障害を改善する、第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月 24 日～25 日、フェニックスシーガイアリゾート コンベンションセンター(宮崎県)
- ④ 稲葉 有香、尾崎 倫孝、親泊 政一、春日 雅人、井上 啓：NALFD に伴う肝再生障害における Gadd34 の役割の解明、第 26 回分子糖尿病学シンポジウム、2014 年 12 月 6 日、高知市文化プラザ かるぼーと(高知県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲葉 有香 (INABA, Yuka)
金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・特任助教
研究者番号：20571970

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし