

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461020

研究課題名(和文) 肝疾患とオートファジーによる細胞内小器官分解

研究課題名(英文) Pathophysiological role of autophagic degradation of cellular organelles on liver diseases

研究代表者

山科 俊平 (YAMASHINA, SHUNHEI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30338412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝脂肪化がmTOR活性化を介してリソソームのプロトンポンプ発現を抑制し、オートファジー酸性化と蛋白分解を抑制することを明らかにした。また肝脂肪化によるオートファジー機能障害は傷害ミトコンドリア蓄積によって酸化ストレス誘導に作用する一方で、ミトコンドリアを介した細胞死抑制に作用する蛋白も誘導することがわかった。さらにParkin欠損は肝再生を抑制することを証明した。その機序としてParkin欠損によってオートファジーによる傷害ミトコンドリアの分解除去が低下し、肝切除後に傷害ミトコンドリアが蓄積し、ATP産生低下や酸化ストレス増加が生じた可能性が考慮された。

研究成果の概要(英文)：We reported that autophagic acidification was altered by a decrease in lysosomal proton pump V-ATPase in hepatocytes from NAFLD. mTOR inhibitor ameliorated V-ATPase expression occluded by hepatic steatosis, followed by recovering acidification and proteolytic activity of autolysosomes. These results indicate that activation of mTOR caused dysregulation of autophagic acidification in NAFLD. Moreover, we found that dysfunction of mitochondrial autophagy increased the mitochondrial proteins not only produce oxidative stress but also inhibit apoptosis. Additionally, we found that Parkin-deficiency represses liver regeneration after partial hepatectomy. Parkin promotes degradation of dysfunctional mitochondria by autophagy; therefore, parkin-deficiency enhanced the mitochondrial dysfunction after partial hepatectomy. These results indicate that the selective removing mitochondria modified by Parkin plays a pivotal role on the maintaining mitochondrial function during liver regeneration.

研究分野：肝疾患の病態生理

キーワード：オートファジー リソソーム ミトコンドリア 肝再生 脂肪性肝疾患

1. 研究開始当初の背景

細胞内代謝や飢餓時の栄養供給においてオートファジーは重要な細胞内蛋白分解機構であるが、自然免疫・発癌・細胞死などにも関与する事が分かってきている (Simmons et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2010.)。オートファジーによる蛋白分解は細胞内に隔離膜が出現し、細胞内の蛋白や細胞内小器官を取り囲み、オートファゴソームを形成する、リソソームと融合しオートリソソームとなる、リソソーム内蛋白分解酵素 (カテプシンなど) を利用し、オートリソソームごと内包したものをアミノ酸まで分解するといった3つの過程に分けられる。オートファジー機能が抑制されると細胞内に変性蛋白が蓄積し細胞内封入体が形成される (Komatsu et al. J Cell Biol. 2005; 169:425-434)。細胞内封入体は臨床的にはアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、肝臓において Mallory-Denk body として肝細胞内に観察されることからこれらの疾病の発症進展にオートファジー機能異常が大きく寄与すると考えられている。我々は、肥満モデルマウスを解析し、肝脂肪化による mTOR 持続活性化がオートファジー誘導を抑制すること (上記オートファジー過程の障害)、肝脂肪化によってリソソーム内蛋白分解酵素カテプシン群の発現が抑制され、オートファジー蛋白分解が抑制されること (この過程が障害) を明らかにした。これらの機序によって細胞内に脂肪滴が出現する病態 (脂肪肝、アルコール性肝炎、C型肝炎) では、オートファジー機能障害が生じ、変性蛋白や傷害オルガネラの分解効率が低下し、異常なミトコンドリアや小胞体が蓄積し、酸化ストレス増加を介して最終的に肝障害や肝発癌が生じると推測される。

一方、オートファジーはインスリンや様々な細胞増殖因子によって活性化する mTOR によって抑制的に制御されているが、mTOR 阻害薬ラパマイシン投与によってオートファジーを誘導するとミトコンドリアストレスや小胞体ストレスが改善することが報告されている。これらのことから mTOR を標的とした抑制剤は細胞保護作用を示す薬剤として期待されるが、我々の検証では脂肪肝モデルマウスではラパマイシンによってオートファジー関連蛋白発現が増加するが肝障害は改善せず、傷害ミトコンドリアが観察された。その理由として mTOR 阻害を行っても肝脂肪化によるリソソーム機能異常や傷害オルガネラの標識蛋白活性化不全などが残留したままであるためにオートファジー誘導だけでは肝機能障害が改善しなかったものと推測された。よって肝オートファジー機能を回復するためにはオートファジー誘導だけでなくリソソーム機能回復や傷害オルガネラの標識機能の回復が必要であると考えられた。

傷害ミトコンドリア除去においてオート

ファジーは重要な役割を果たし、傷害ミトコンドリアの Nix/Bnip3L1, Pink1, Parkin 蛋白などによる修飾・マーキングがオートファジーによる効率よい選択的分解除去を促進させることが知られている。C型肝炎ウイルス感染においても Parkin 蛋白発現が抑制されるために傷害ミトコンドリアの蓄積が生じ酸化ストレス・細胞障害が生じるとする報告があるが Parkin 蛋白発現に関しては逆の報告も存在し結論が出ていない。一方、神経変性疾患であるパーキンソン病ではこれら修飾蛋白の発現変化ではなく蛋白の自己リン酸化の異常が疾患発症に重要であることが明らかとなっている (Nat Commun 2012)。このようにオートファジーと細胞内小器官との関係については不明な点が多く残されている一方で、この点を詳細に検討する事は治療的ターゲットを絞り、かつ副作用の少ない治療開発の一端となるデータが得られるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では以下の3つの検討を行うことを目的とした。

【肝脂肪化とリソソーム機能障害の検討】

肝脂肪化によって引き起こされるリソソーム機能障害は、肝脂肪化によるリソソーム内蛋白分解酵素カテプシン発現低下が関与すると考えられるが、詳細は不明である。リソソーム内蛋白分解酵素活性化には酸性環境が重要であることが分かっており、このリソソーム酸性化はプロトンポンプ vacuolar ATPase (V-ATPase) によって制御されている。今回、肝細胞内リソソーム V-ATPase 発現とオートファジー小体酸性化が肝脂肪化によってどのように変化するのかについて検討を行った。

【オートファジーによるミトコンドリア分解と肝病態の関係の検討】

傷害ミトコンドリアがオートファジーによって効率的に除去されるためには Parkin 蛋白による傷害ミトコンドリアの修飾が重要であることが分かっている。細胞内小器官除去のための修飾が肝病態とどの様に関与するのかを検討するために Parkin 蛋白異常が肝病態とどの様に関係するかを明らかにする。

【肝脂肪化によるミトコンドリア発現蛋白の変化の検討】

肝細胞の脂肪化によるオートファジー機能異常が細胞内小器官の蛋白発現にどのように影響を与えるのかを明らかにし、さらにミトコンドリア機能異常、肝細胞死や代謝にどのような影響を与えるのかを検討する。

3. 研究の方法

【肝脂肪化とリソソーム機能障害】

C57BL/C マウス (コントロール) と KKAY マウ

ス（肥満モデル）から単離した肝細胞を使用した。肝細胞に GFP-LC3 プラスミドを導入しオートファジー小体を可視化した。さらに Lysotracker Red(LTR)を添加しオートファジー小体酸性化を共焦点顕微鏡にて評価した。マウス肝組織よりリソソームを単離しリソソームにおける V-ATPase サブユニット（ATP6v1a・ATP6v1b・ATP6v1d）発現をウエスタンブロット法にて評価した。肝細胞内 V-ATPase サブユニット mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて評価した。さらに mTOR 阻害薬ラパマイシンを添加し肝細胞内オートファジー小体酸性化の変化について検討を行った。

【オートファジーによるミトコンドリア分解と肝病態の関係の解析】

Wild type マウスと Parkin 欠損マウスに 70% 部分肝切除を行い、切除肝重量より予測される残肝重量を計算した。肝部分切除後、経時的に肝組織を採取し肝重量を測定し、予測残肝重量との割合より肝重量増加率を算出した（サンプリング時の肝重量 ÷ 肝部分切除術直後の予測残肝重量）。肝細胞増殖の評価を行うために部分肝切除 48 時間後肝組織切片の BrdU 免疫染色やウエスタンブロット法による CyclinD1 発現解析を行った。さらに肝切除後の肝再生に関わるサイトカイン TNF、IL-6 発現を Real time-PCR 法にて評価した。

【肝脂肪化によるミトコンドリア発現蛋白の変化】

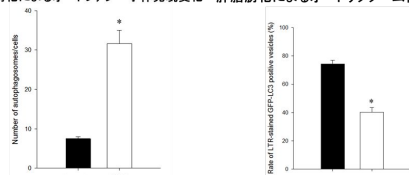
脂肪性肝疾患マウスモデル（KKAy マウス）とコントロールマウスより、比重遠心法によってミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアより蛋白を抽出し、サンプルの蛋白を還元・アルキル化後にトリプシン処理し、異なる iTRAQ タグで標識後に 2 段階の MS 解析を行い、発現変化する蛋白を同定した。

4. 研究成果

【肝脂肪化によるリソソーム変化】

コントロールの肝細胞と比較して、肥満モデル肝細胞ではオートファジー小体数が有意に増加していた。しかしコントロールで 70% 以上のオートファジー小体が酸性化（LTR 陽性）しているのに対し、肥満モデルでは 50% 未満でありコントロール肝細胞と比較し有意に酸性化が低下していた。

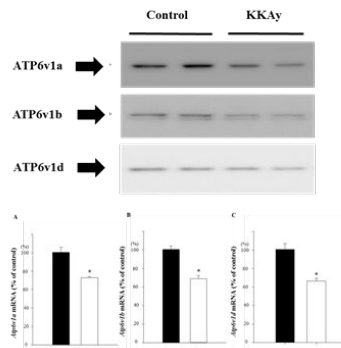
肝脂肪化によるオートファジー小体発現変化 肝脂肪化によるオートリソソーム酸性化の変化



また肥満モデル肝細胞ではリソソームのプロトンポンプ V-ATPase サブユニットの蛋白発現がコントロールマウスからの単離リソソームと比較し低下していた。また同様に肥

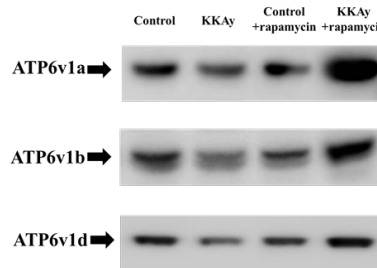
満モデルにおいては、V-ATPase サブユニットの mRNA 発現もコントロールと比べ有意に減少していた。

肝脂肪化によるリソソームV-ATPase発現変化

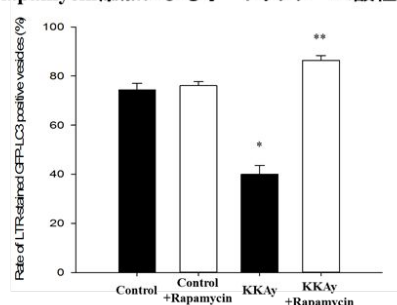


一方、肥満モデル肝細胞にラパマイシンを添加するとオートファジー小体発現が誘導され、さらに肝リソソームの V-ATPase サブユニット発現が強く誘導された。また同時に肝脂肪化によって低下していた LTR 陽性オートファジー小体の割合も有意に増加した。

Rapamycin添加による肝リソソームV-ATPサブユニット発現変化



Rapamycin添加によるオートリソソーム酸性化の変化



以上のように肝脂肪化によってリソソーム V-ATPase 発現低下が生じ、それに伴ってオートファジー小体の酸性化が低下することが分かった。肝脂肪化は、カテプシン発現抑制とリソソーム-オートリソソーム酸性化障害を誘導し、それによってオートファジーの蛋白分解が抑制され、オートファジー小体が分解されずに残留したものと考えられた。興味深いことに、ラパマイシン添加によって肝脂肪化によって抑制されていたリソソームの V-ATPase 発現が回復し、さらにオートファジー小体の酸性化も回復した。これらの結果から、脂肪肝モデルにおいて観察される V-ATPase 発現抑制を介したリソソーム-オートファジー酸性化障害の背景には肝脂肪

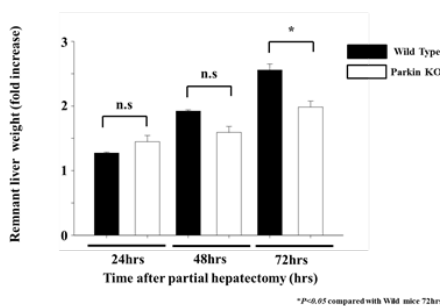
化による mTOR 活性化が重要な役割をはたしているものと推測された。mTOR を標的とした治療的アプローチはオートファジーを介した蛋白分解機能を改善し、NAFLD 治療に有用であると考えられた。

実際に V-ATPase 発現誘導によってリソソーム酸性化が回復し、ER ストレスや酸化ストレス、細胞死が改善したとする報告がある (J Biol Chem 2011, Cell Death Differ 2006) ことから脂肪肝によって生じるリソソーム機能障害の回復にも同様の手段が有効である可能性がある。

【オートファジーによるミトコンドリア分解阻害と肝病態の関心の解析】

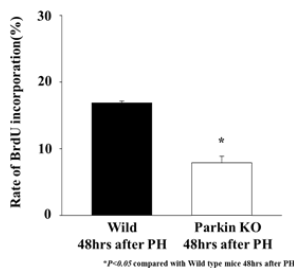
70%部分肝切除後の肝重量回復を評価したところ、肝切除3日後の肝重量は Wild type マウスでは2.56 倍に増加していたが、Parkin 欠損群では1.9 倍であった。

70%肝部分切除後肝重量の変化



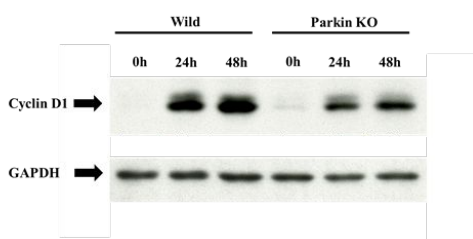
一方、肝細胞の増殖を BrdU 染色によって評価したところ、肝切除 48 時間後の BrdU 陽性率は Wild type マウスにおいて 16.9 %であったのに対し、Parkin 欠損群では 7.9%であった。

肝部分切除後のBrdU陽性細胞数の割合



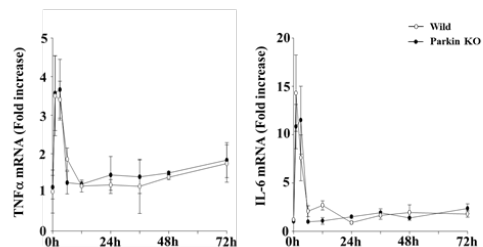
また細胞周期に關与する CyclinD1 発現解析では、肝切除 24, 48 時間後の肝組織中の cyclinD1 発現は Wild type、カテプシンL欠損マウスともに肝切除前よりも増加していたが、Parkin 欠損群では Wild type マウスと比較し発現の減弱を認めた。

肝部分切除後の肝組織Cyclin D1発現変化



肝再生において重要な役割を果たすことが知られているサイトカインの解析では、肝切除後の TNF、IL-6 mRNA 発現は Wild type、Parkin 欠損マウスともに1時間後に増加したが両群間に有意な差はなかった。

肝部分切除後の肝組織TNFα mRNAとIL-6 mRNA変化



以上の結果より Parkin 欠損により肝切除後の肝再生が抑制されることがわかった。Parkin 欠損は肝再生を誘導する TNF や IL-6 発現には影響を及ぼさなかったが、肝細胞増殖抑制には作用していた。Parkin 欠損によって傷害ミトコンドリアがオートファジーによって分解されにくくなることから、肝切除後の傷害ミトコンドリア蓄積が ATP 産生低下や酸化ストレス増加に作用し、肝再生を抑制したと推測された。傷害ミトコンドリアの修飾障害は肝病態に大きな影響を与えることが分かった。

【肝脂肪化によるミトコンドリア発現蛋白の変化】

脂肪肝モデルマウスから単離したミトコンドリアの発現蛋白の解析を行ったところ肝脂肪化によって発現変化する蛋白が複数検出された。特に Cytochrome b-c1 complex subunit2, Acetyl-CoA acetyltransferase, 2,4-dienoyl-CoA reductase, D-hydroxybutyrate dehydrogenase 蛋白の発現が亢進し、ATP synthase subunit, 両蛋白発現の減弱が観察された。Acetyl-CoA acetyltransferase はアセチル CoA からステロイドを生合成経路であるメバロン酸経路に必要な酵素で、ミトコンドリアが損傷を受けた際のミトコンドリア保護に關与する遺伝子調節に關与することが報告されていることから Acetyl-CoA acetyltransferase 発現増加は肝脂肪化によるオートファジー機能障害を介して生じた酸化ストレスや傷害ミトコンドリア蓄積を反映しているものと想定された。Acetyl-CoA acetyltransferase に関して siRNA を作製し、肝細胞株に遺伝子導入し、パルミチン酸を添加したところ 24 時間後の WST-1 アッセイによる細胞死変化は、siRNA 導入群のほうが増加傾向にあった。以上のように、肝脂肪化によるオートファジー機能障害は傷害ミトコンドリア蓄積によって酸化ストレス誘導に作用する一方で、ミトコンドリアを介した細胞死抑制に作用する蛋白も誘導することがわかった。メバロン酸経路を阻害する薬物としてスタチンがあり

肝発癌抑制に作用するといった報告もあることから、肝脂肪化によるメバロン酸経路亢進は肝発癌に寄与する可能性が示唆された。

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 2件)

山科 俊平, 渡辺 純夫

【オートファジーと消化器疾患】 脂肪肝とオートファジー

G.I.Research (0918-9408)23 巻 3 号
Page198-204(2015.06)

Nakadera E, Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Sato T, Fukushima H, Kon K, Ikejima K, Ueno T, Watanabe S.

Inhibition of mTOR improves the impairment of acidification in autophagic vesicles caused by hepatic steatosis.

Biochem Biophys Res Commun. 2016 Jan 22;469(4):1104-10.

〔学会発表〕(計 5件)

中寺 英介, 山科 俊平, 渡辺 純夫
NAFLD/NASH の病態解明と治療の新展開
肝脂肪化による mTOR 活性化を介したリソソーム酸性化障害とオートファジー機能抑制
第 101 回日本消化器病学会総会シンポジウム 2015.4.24

山科 俊平, 泉 光輔, 渡辺 純夫

疾患メタボロミクスの現状と将来 肝脂肪化、オートファジー機能障害による核膜蛋白発現変化

JDDW ワークショップ 2015.10.9

山科 俊平, 池嶋 健一, 渡辺 純夫

消化器領域でのオートファジーの意義 オートファジー機能異常検出のための血清マーカーとその生理学的意義についての検証

第 101 回日本消化器病学会総会ワークショップ 2017.4.20

Eisuke Nakadera, Shunhei Yamashina, Yoshihiro Inami, Kousuke Izumi, Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe

Hepatic steatosis impairs acidification of autolysosomes via suppression of vacuolar ATPase subunit in lysosomes.

American Association for the Study of Liver Diseases 2014

Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S
Identification of Nuclear Matrix Protein Alternations associated with Autophagic

Dysfunction in the Liver
Digestive Disease Week 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山科 俊平 (SHUNHEI, YAMASHINA)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 30338412

(2) 研究分担者

上野 隆 (TAKASHI, UENO)

順天堂大学・医学研究科・教授

研究者番号: 10053373

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし