

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月18日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390234

研究課題名（和文）オートファジーを焦点とした消化器難治性疾患の病態解明および治療開発

研究課題名（英文）Central role of autophagy in the pathogenesis of gastrointestinal and hepatic diseases.

研究代表者

渡辺純夫（WATANABE SUMIO）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20138225

研究成果の概要（和文）：

肝脂肪化によって肝細胞と Kupffer 細胞のオートファジー機能が低下した。肝細胞においては脂肪蓄積によってオートファジー誘導が抑制されるだけでなくリソソーム内酵素カテプシン発現低下によりオートファジーを介した蛋白分解も障害されていた。さらにオートファジー抑制はエンドトキシン感受性亢進や肝発癌誘導に作用した。また消化管においてはオートファジー欠損は腸炎を増悪させる方向に作用したが消化管腫瘍形成に関しては有意な関与を示さなかった。以上よりオートファジー機能障害は様々な消化器疾病発症において重要な役割を果たしているものと考えられ、オートファジーを標的とした新規治療法開発は消化器疾患予防において有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that hepatic steatosis suppresses autophagic function in both hepatocytes and Kupffer cells. Autophagy-deficiency enhances hepatic inflammation, cell death and carcinogenesis. Moreover, loss of autophagy enhances colitis but not carcinogenesis. These findings indicate that suppression of autophagy plays a pivotal role on development of various gastrointestinal and hepatic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,300,000	3,090,000	13,390,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：(1)オートファジー (2)肝障害 (3)肝再生 (4)細胞死 (5)炎症

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の新陳代謝や飢餓に対する栄養源確保においてオートファジーは細胞内蛋白分解機構として重要な役割を果たすことが知られている。一方、近年の研究により細胞内免疫・発癌・細胞死などさまざまな病態にもオートフ

ァジーが関与している事が明らかとなってきている。例えばC型肝炎ウイルス(HCV)複製や脂質代謝にもオートファジーが関与することが示唆されている。またオートファジーはクローン病発症とも関連していると考えられており、自然免疫におけるオートファジーの

役割も注目されてきている。オートファジー遺伝子 Atg7 臓器特異的ノックアウトマウスを用いた解析は消化器病態におけるオートファジーの役割の解明に非常に有用であると考えられ、本研究を構想した。

## 2. 研究の目的

オートファジーが以下のようなさまざまな消化器疾患にどのように関与するのかを明らかにし、その機序を解明する。

### ① オートファジーと腸炎

消化管特異的オートファジー欠損マウスとコントロールマウスを使用し、腸炎モデルを作成し、オートファジー欠損が腸炎発症進展にどのような影響を与えるのか、またその機序について明らかにする。

### ② オートファジーと肝炎

肝特異的オートファジー欠損マウスを使用しLPS投与による肝障害の変化や単離 Kupffer細胞を用いたLPS感受性変化の解析を行う。

### ③ 脂肪性肝炎モデルにおけるオートファジー機能の解析

肥満モデルマウスにおけるオートファジー機能を評価し、さらにその機序を明らかにする。

### ④ 消化管・肝発癌モデルの解析

オートファジー欠損による消化器発癌についてその機序について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### ① オートファジーと腸炎

大腸特異的オートファジー欠損マウスを用いて DSS 腸炎モデルを作成する。DSS 投与後の腸管出血程度や腸管長を測定し腸炎の評価を行う。DSS 投与後の大腸組織の TUNEL 染色やウエスタンブロット法による Caspase-3,-7 活性化、PERK 発現、elf2  $\alpha$  活性化について評価する。また腸管より mRNA を抽出し Real-time PCR 法にて TNF  $\alpha$  や IL-1  $\beta$  産生について評価した。

### ② オートファジーと肝炎

コントロール食投与マウスと高脂肪食投与マウス(脂肪肝モデル)を作製し、それぞれのマウスから Kupffer 細胞を単離し、p62 蛋白発現や LPS 添加後の LC3 蛋白発現変化をウエスタンブロット法にて評価する。また ELISA 法にて TNF  $\alpha$  産生を評価する。さらに肝特異的オートファジー欠損マウスと Wild type マウスから Kupffer 細胞を単離し、p38, IKK 活性化をウエスタンブロット法にて評価し、TNF  $\alpha$  産生を ELISA 法にて評価した。

### ③ オートファジーと脂肪肝

遺伝的肥満モデル Ob/Ob マウスと高脂肪食投与マウスを作製し、肝細胞を単離し低栄養によるオートファジー誘導を LC3 蛋白発現や GFP-LC3 発現プラスミド導入による共焦点蛍光顕微鏡下でのオートファゴ

ソーム観察によって評価した。またロイシン蛋白分解アッセイや p62 蛋白発現をウエスタンブロット法にて解析し、オートファジーを介した蛋白分解能を評価した。肝組織よりショ糖勾配法によってオートファゴソームとリソソームを単離しリソソームとオートファゴソーム融合能を評価した。またウエスタンブロット法にてカテプシン B, L 発現や活性化を評価した。

### ④ 消化管・肝発癌モデルの解析

腸管特異的オートファジー欠損マウスを用いて azoxymethane (AOM)/DSS 投与による大腸発癌モデルを作成し、オートファジー欠損による大腸腫瘍の数、大きさ、部位の変化について検討した。

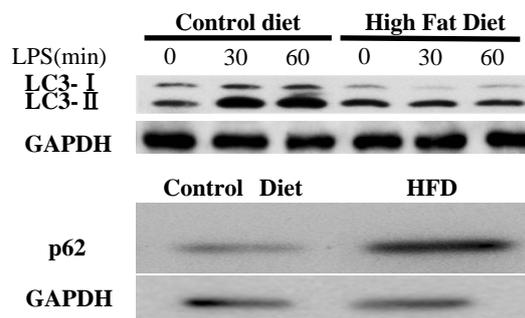
また肝細胞特異的オートファジー欠損マウスと Wild type マウスにおける肝発癌の頻度、組織免疫染色により腫瘍部の p62, Keap1 の細胞内局在と Realtime PCR 法による Nqo1 mRNA 発現変化によって Nrf2 活性化を評価した。

## 4. 研究成果

### ① オートファジーと腸炎

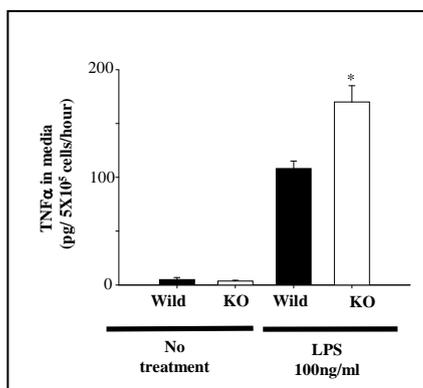
大腸特異的オートファジー欠損マウスを用いて DSS 腸炎モデルを作成した。オートファジー欠損によって DSS 投与後腸炎の増悪を認めた。オートファジー欠損により DSS 投与後の大腸組織中の TUNEL 陽性細胞が増加すること、Caspase-3,-7 活性化が強く誘導されていることが分かった。さらに PERK 発現、elf2  $\alpha$  活性化の増加も認められる事からオートファジー欠損により DSS 添加後の小胞体ストレスが増加し、腸管粘膜細胞のアポトーシスが誘導されたものと想定された。また TNF  $\alpha$  や IL-1  $\beta$  発現の増加もオートファジー欠損マウスにおいて強く誘導されていた。

### ② オートファジーと肝炎



コントロールマウスからの単離 Kupffer 細胞では LPS 添加によって LC3-II 蛋白が誘導されオートファジーが誘導されたものと考えられたが、高脂肪食投与により脂肪肝を誘導したマウスから単離した Kupffer 細胞では p62 蛋白が強く発現しており、また LPS 添加による LC3-II 発現誘導が抑制されていたことから肝脂肪化は

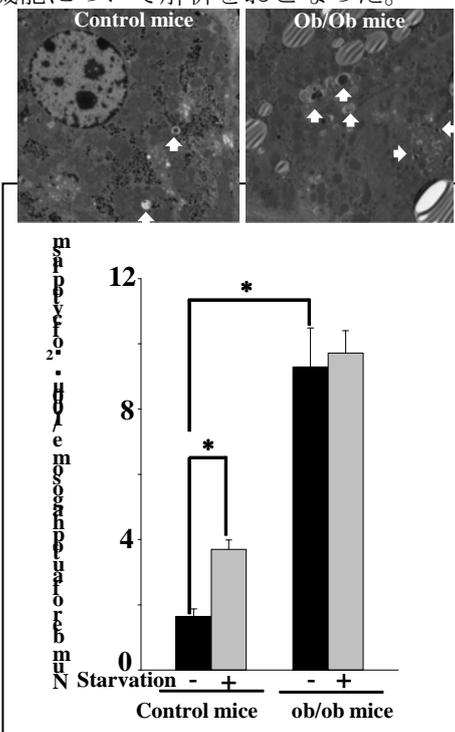
Kupffer細胞におけるオートファジー誘導を抑制するものと考えられた。さらに脂肪肝肝モデルから単離した Kupffer 細胞はコントロールマウスからの Kupffer 細胞と比較し LPS 添加後の TNF $\alpha$  産生が有意に増加していた。



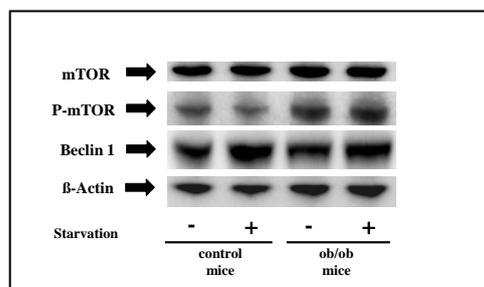
一方、オートファジー欠損マウスから単離した Kupffer 細胞では Wild type Kupffer 細胞と比較し、LPS 添加後の p38 や IKK 活性化と TNF $\alpha$  産生が強く誘導された。また p38 阻害剤に同時添加によってオートファジー欠損 Kupffer 細胞において TNF $\alpha$  産生は強く阻害された。オートファジー欠損によって p38-NFKB シグナル活性化が強く惹起され炎症性サイトカイン産生が強く誘導されたと考えられた。脂肪肝における免疫細胞のオートファジー抑制がエンドトキシン感受性を亢進し肝炎症を誘導している可能性が示唆された。

### ③ オートファジーと脂肪肝

遺伝的肥満モデル Ob/Ob マウスを用いて脂肪肝における肝細胞のオートファジー数や機能について解析をおこなった。



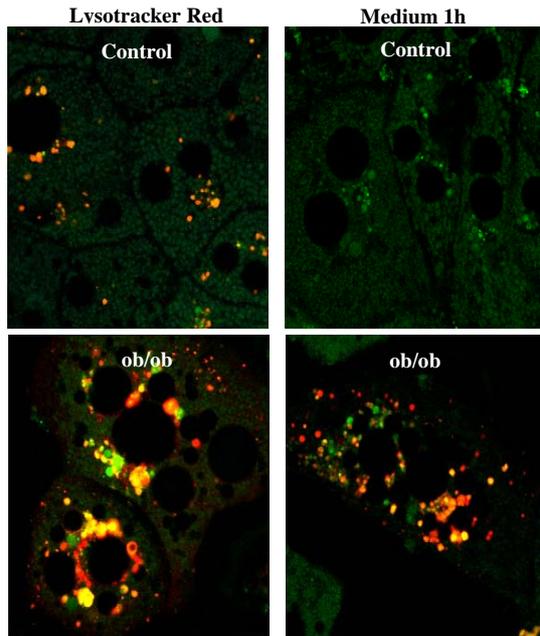
コントロールマウスと比較し Ob/Ob マウスでは、肝細胞質内にオートファジーが多く観察され、LC3-II 蛋白発現も増加していた。しかし低栄養下培養を行うとコントロール肝細胞ではオートファゴソームが誘導されるのに対し Ob/Ob マウス肝細胞ではオートファゴソーム数増加が乏しかった。次にオートファジー誘導をコントロールしている mTOR 活性化について検討を行った。



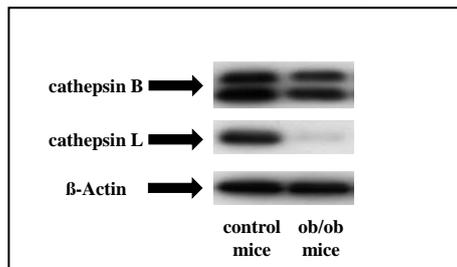
コントロールマウスと比較し Ob/Ob マウスでは mTOR 活性化が強く生じていた。さらにコントロールでは飢餓によって mTOR 活性化が低下するが、Ob/Ob マウスでは抑制されず、Beclin1 発現誘導も生じなかった。これらのことから肝脂肪化によって mTOR 活性化が持続するため飢餓ストレスによるオートファジー誘導が阻害されたと推測された。

一方、Ob/Ob マウスではオートリソソームが多く観察されているにもかかわらず、肝組織中 p62 は増加しており、単離肝細胞における蛋白分解アッセイでも Ob/Ob マウス肝細胞では蛋白分解が抑制されていることが分かった。また GSH/GSSG 測定でも Ob/Ob マウスでは酸化ストレスの増加が確認され、ミトコンドリアの形態異常が観察された。

次に GFP-LC3 プラスミドを導入しオートファゴソームを可視化した単離肝細胞に Lysotracker Red 処理を行いオートリソソーム数を評価した。その後、Lysotracker Red を含まない培養液にて 1 時間培養し残留したオートリソソーム数を測定した。コントロール肝細胞ではオートリソソームはほとんど消失しておりリソソーム酵素によって取り込んだものを消化すると同時に自己消化したものと想定された。一方、肥満マウスから単離した肝細胞ではオートリソソーム染色後 1 時間してもオートリソソームはほとんど消失しなかった。このことから肝細胞への脂肪蓄積によってオートリソソームの蛋白分解能が低下したためにオートリソソームが細胞質内に蓄積したものと想定された。



コントロールマウスと肥満モデルマウスの肝細胞からリソソームとオートファゴソームを単離し Fusion assay を行ったところ肝脂肪化によってリソソームとオートファゴソーム融合能は変化しなかった。また LC-3 と LAMP1 の免疫 2 重染色を行ったところ LC-3 と LAMP1 発現は、コントロールマウスと Ob/Ob マウスからの肝細胞においてほぼ全部のオートリソソーム膜上に共発現しておりオートファゴソームとリソソームの融合は脂肪肝においても障害されていないものと想定された。そこでリソソーム内酵素カテプシンの発現変化をウエスタンブロット法にて評価した。



肥満モデルマウスでは肝組織中のカテプシン L 発現がほぼ消失し、カテプシン活性の有意な低下を認めた。以上のことから、脂肪肝ではリソソームのカテプシン成熟障害が生じるものと考えられ、これによりオートファジーを介した蛋白分解が抑制されたためにオートリソソームが肝細胞内に蓄積したものと考えられた。脂肪肝によって mTOR 持続活性化によるオートファジー誘導抑制とオートファジー蛋白分解抑制の 2 つが生じ、オートファジーを介した蛋白分解が阻害され異常ミトコンドリアが蓄積し、酸化ストレスや細胞死が生じるものと

推測された。

#### ④ 消化管・肝発癌モデルの解析

azoxy methane (AOM)/DSS 投与による大腸発癌モデルではオートファジー欠損により大腸腫瘍の数、大きさ、部位などに明らかな差を認めなかった。予想に反し、オートファジー欠損は腸炎発症には関与するが大腸発癌とは直接的には関与しない結果となった。オートファジーは潰瘍性大腸炎よりもクローン病の発症に大きく関与していると考えられており、潰瘍性大腸炎と比較したときのクローン病の発癌率が低いことを反映しているのかもしれない。

一方、肝細胞特異的オートファジー欠損マウスでは、wild type マウスと比較し肝発癌が有意に増加し、癌部では p62 蛋白と Keap1 蛋白が共局在しており、一方で Nrf2 蛋白の活性化が観察された。P62 欠損や変異肝癌細胞株では細胞増殖が抑制されることからオートファジー抑制によって蓄積した p62 蛋白は Keap1 と結合し、Keap1 より離れた Nrf2 は活性化し細胞増殖シグナルを惹起するものと推測された。肝脂肪化によるオートファジー抑制は脂肪肝からの肝発癌において重要な役割を果たしているものと考えられた。

#### 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 3 件)

1. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K, Komatsu M. *J Cell Biol.* (査読有) 18;193(2):275-84. 2011
2. Loss of autophagy promotes murine acetaminophen hepatotoxicity Igusa Y, Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Fukada H, Komatsu M, Tanaka K, Ikejima K, Watanabe S *J Gastroenterol.* (査読有) 2011
3. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. Inami Y, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Tanida I, Ikejima K, Watanabe S. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 9;412(4):618-25. 2011

[学会発表] (計 4 件)

- ① The American association for the study of liver diseases 60th annual meeting and postgraduate course #1875 Lipid accumulation inhibits induction of autophagy in the mouse liver. Yoshihiro Inami, Shunhei Yamashina, Kousuke Izumi, Hiroo Fukada, Kazuyoshi Kon, Kenichi

- Ikejima, Sumio Watanabe 2009年11月3日米国ボストンHynes convention center
- ② 第46回日本肝臓学会総会パネルディスカッション 『肥満モデルにおけるオートファジーを介した蛋白分解機能の変化』稲見義宏、山科俊平、渡辺純夫 2010年5月28日山形県山形テルサホール
- ③ The American association for the study of liver diseases 61th annual meeting and postgraduate course #1971 Loss of autophagy enhances the sensitization of Kupffer cells to endo toxin.Hiroo Fukada, Shunhei Yamashina, Kousuke Izumi, Yoshihiro Inami, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe. 2010年11月3日米国ボストンHynes convention center
- ④ 第47回日本肝臓学会総会ワークショップ 『肝細胞内脂肪滴蓄積とオートファジー機能障害』山科俊平、稲見義宏、今一義、池嶋健一、渡辺純夫 2011年6月2日東京都ホテルグランパシフィック

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺純夫 (WATANABE SUMIO)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号：20138225

### (2) 研究分担者

池嶋健一 (IKEJIMA KENICHI)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：20317382

山科俊平 (YAMASHINA SHYUNHEI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：30338412

今一義 (KON YOSHIKAZU)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：30398672

### (3) 連携研究者

上野隆 (UENO TAKASHI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：10053373