

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390191

研究課題名(和文)細胞内代謝機構オートファジー制御に基づいた消化器難病疾患への新規治療戦略

研究課題名(英文)New therapeutic strategy to non-alcoholic liver disease targeting on autophagy

## 研究代表者

渡辺 純夫(Watanebe, Sumio)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20138225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、増加しつつある非アルコール性脂肪性肝疾患ではリソソームの蛋白発現が変化しオートファジー機能障害が誘導されることを明らかにした。この現象は動物だけでなくヒトの肝臓でも同様に生じている。オートファジー機能障害は変性蛋白蓄積や傷害オルガネラ蓄積によって細胞死を誘導するものと考えられるが、一方で、肝細胞死を抑制するスイッチや肝再生を促進させるスイッチも起動することがわかった。これらの複雑な機構は、臓器保護という側面からは生体に対し有益に作用するが、逆に遺伝子損傷細胞にも保護的に作用するため発癌を誘導する方向にも作用する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The lower proteolytic capability of autophagy was observed in the liver from NAFLD patients. Liver injury and hepatic inflammation correlate with autophagic dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). These findings indicate that the suppression of autophagic proteolysis by hepatic steatosis is involved in the pathogenesis of NAFLD. Impairment of autophagic proteolysis is caused by alteration of lysosomal proteins. Changes in lysosomal proteins due to hepatic steatosis might disturb autophagosomal acidification and proteolytic activity. Interestingly, autophagic dysfunction and suppression of cathepsin L expression observed in NAFLD lead to the production of anti-oxidant molecules and accelerate liver regeneration. Our results from this study may provide new approaches for the prediction of prognosis, prevention and treatment of NAFLD.

研究分野：消化器病

キーワード：脂肪性肝疾患 オートファジー リソソーム カテプシン 肝再生

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪性肝炎 (NAFLD) やアルコール性肝障害は肝硬変や肝発癌の母体となる疾患として注目されているが病態進展のメカニズムには不明な点が多く有効な医療手段に乏しいのが現状である。近年、NAFLD や重症型アルコール性肝硬変、肝癌において肝細胞質内に認められる細胞内封入体 (Mallory-Denk body) にオートファジーで特異的に代謝される p62 蛋白が発現していることが報告され、これらの慢性肝疾患の病態進展の背景にオートファジー機能障害が存在している可能性が示唆されている。オートファジーは、プロテアソーム系と並ぶ主要な細胞内分解システムで、プロテアソームが、ユビキチン化された蛋白を一分子ずつ選択的に分解するのに対し、オートファジーは細胞内小器官なども分解する大規模な分解経路である。一般的にオートファジーの調整蛋白として mammalian target of rapamycin (mTOR) が知られており、細胞の栄養が豊富な状態ではアミノ酸やインスリンシグナルによって mTOR が活性化し過剰な細胞内蛋白の分解が生じないようにオートファジー誘導は抑制されているが、低栄養環境では、mTOR 活性化が抑制され、オートファジーが誘導される。我々は脂肪肝モデルマウスの肝組織では mTOR が活性化しており、この活性化は絶食 24 時間後でも持続することを報告し、さらにオートファジーによって取り込まれた蛋白や細胞内小器官 (小胞体やミトコンドリアなど) 分解にはリソソームとの融合によるリソソーム内蛋白分解酵素の作用が必須であるが脂肪滴が蓄積した肝細胞ではリソソーム内酸性化と蛋白分解酵素カテプシン発現低下が生じ、オートファジーを介した蛋白分解能が低下することを明らかにしてきた (Inami, Y et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011)。オートファジー機能障害では傷害ミトコンドリアや小胞体ストレスが蓄積し、酸化ストレスが誘導されるため肝障害や肝発癌が生じるものと推測される。さらにカテプシン L は酵素機能以外に核内へ移行し転写などに関与する可能性も報告 (Nat Commun. 2011) されておりシグナル分子としての作用も注目されている。そのため脂肪滴蓄積によって生じるリソソーム機能障害の機序やカテプシン発現変化と肝障害・再生不全などの病態との関連の解明はリソソームとオートファジー機能障害を標的とした NAFLD の新規治療開発の基盤となるものと思われ、本研究を創案した。

## 2. 研究の目的

脂肪性肝疾患におけるリソソーム・オートファジー機能障害の機序の解明と肝病態とどのように関与するのかを明らかにし、治療的アプローチの模索を目的とした。

脂肪肝モデル肝細胞から単離したリソソ-

ム膜蛋白のプロテオミクス解析を行い脂肪蓄積によって生じるリソソーム機能障害の機序を明らかとする。

肝脂肪化によるカテプシン発現低下が肝障害や肝再生にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

慢性肝炎の肝生検サンプルの電子顕微鏡観察や蛋白解析を行い、リソソーム酵素発現変化とオートファジー機能、病態進展との関係を解明する。

## 3. 研究の方法

1) 脂肪肝モデルマウスの肝リソソーム膜蛋白のプロテオミクス解析

脂肪性肝炎モデル (KKAY マウス) よりリソソームを Percoll 法にて単離し、リソソーム蛋白を抽出する。リソソーム蛋白の 2 次元電気泳動を行い、コントロールマウス肝より単離したリソソーム蛋白の発現と比較し、発現変化のあった蛋白分子の質量分析による蛋白同定を行う。

2) カテプシン強制発現による脂肪肝モデルマウスの肝病態変化の検証

カテプシン発現アデノウイルスベクター作成  
脂肪肝において特に発現が低下するカテプシン L に関してアデノウイルスベクターを作成する。脂肪性肝炎モデル (KKAY マウス) とコントロールマウスに尾静脈よりカテプシン L 発現アデノウイルスベクターを投与し、2 週間後の肝組織中の中性脂肪含有量を測定し、肝組織の HE 染色標本にて脂肪滴の観察を行い、カテプシン発現による肝脂肪化の変化について評価する。さらに血清 ALT 値を測定し肝機能障害変化を評価し、ウエスタンブロット法にて肝組織中 p62 発現を解析しオートファジー機能を評価する。

3) カテプシン発現抑制が肝病態に与える影響の解明

肝細胞への脂肪蓄積によって顕著に発現が減弱するカテプシン L に着目し、カテプシン L ノックアウトマウスを用いて以下の肝疾患モデルを作成し解析を行う。

### 肝障害モデル

カテプシン L ノックアウトマウスとコントロールマウスを用いて、肝虚血再還流モデル (門脈血流を 1 時間クランプし、その後、再還流) を作成し、血清中 ALT 測定や組織観察によって肝障害を評価する。

### 肝再生モデル

カテプシン L ノックアウトマウスとコントロールマウスを用いてそれぞれのマウスで 70% 部分肝切除術を行い、肝切除後の肝重量測定を行い肝再生にカテプシンが関与するのについて検討を行う。さらに肝組織切片の BrdU 染色やウエスタンブロット法により

CyclinD1 発現を解析し肝再生に関してより詳細に評価する。

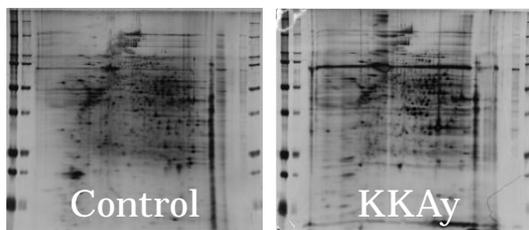
#### 4) 臨床病態におけるオートファジーの関与の解明

B型慢性肝炎、C型慢性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患、原発性胆汁性肝硬変患者から採取された臨床検体を使用し、免疫染色によるカテプシン B, D, L 発現変化と p62 蛋白発現変化を調べる。また細胞内オートファジー数を電子顕微鏡観察によって評価する。臨床検査値や肝炎症、肝線維化など臨床病態とオートファジー機能がどのように対応するのかについて検討を行う。

#### 4. 研究成果

##### 1) 脂肪肝モデルマウスの肝リソソーム膜蛋白のプロテオミクス解析

コントロールマウス (C57BL6J) と脂肪性肝炎モデル (KKAy マウス) より単離したリソソームから蛋白を抽出し 2 次元電気泳動を行った。



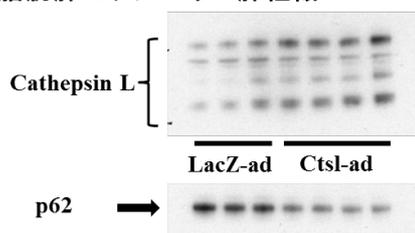
コントロールマウス肝からのリソソームでは 721 個の発現蛋白が検出され、一方、KKAy マウス肝からのリソソームでは 870 個の発現蛋白が検出された。肝脂肪化によってリソソーム蛋白は大きく変化しリソソーム・オートファジー蛋白分解能に影響を与えている可能性が示唆された。

興味深いことに KKAy マウス肝からのリソソームではプロトンポンプ vacuolarATPase サブユニット発現がコントロールマウス肝リソソームと比較し減弱しており、リソソーム酸性化障害と関係している可能性が考えられた。

##### 2) 脂肪肝モデルマウスにおけるカテプシン L 強制発現による病態変化の検証

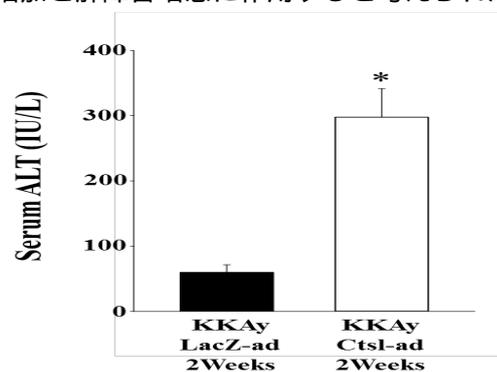
カテプシン L 発現アデノウイルスベクターを作成し KKAy マウスに経静脈的に投与したところ、肝脂肪化によって発現が低下していた肝組織中カテプシン発現が増加した。

##### カテプシンL (Ctsl) 発現ベクター投与後 脂肪肝モデルマウス肝組織



さらに脂肪肝モデルマウス肝組織ではオートファジーによって特異的に分解される p62 蛋白の蓄積が観察されるが、カテプシン L を強制発現させると p62 蛋白発現が減少した。以上のことからカテプシン L 強制発現に伴ってオートファジー蛋白分解能が改善したものと考えられた。

一方、KKAy マウスにカテプシン L を強制発現させ、2 週間後の肝組織を観察したところ肝組織中の脂肪滴量には大きな変化を認めなかった。血清 ALT 値はカテプシン L 強制発現によって有意に増加し、肝組織中の GSH 量の減少が認められた。以上のことからカテプシン L 発現誘導は肝脂肪化によって障害されたオートファジー機能を回復するが、肝脂肪化を改善させることはなく、酸化ストレス増加と肝障害増悪に作用すると考えられた。



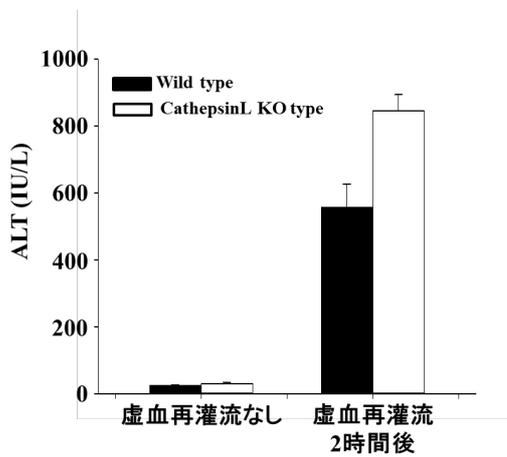
Nrf2 競合的に Keap1 に結合する p62 蛋白は、Nrf2 の核内移行を促進し、抗酸化蛋白の転写を誘導することがわかっている。本研究でもカテプシン L 強制発現による p62 蛋白減少に伴って肝組織中の抗酸化蛋白 NQO1 mRNA 発現が減少していた。以上のことから肝脂肪化によって蓄積した p62 蛋白は抗酸化蛋白発現誘導によって細胞保護的に作用しているものと推測された。NAFLD では酸化ストレスが病態形成・進展に大きく寄与するものと考えられ、肝脂肪化が持続した状態でオートファジーのみを改善させると肝障害誘導に作用する可能性が示唆された。

##### 3) カテプシン L 発現抑制が肝病態に与える影響の解明

##### 虚血再還流後肝障害におけるカテプシン L の役割

カテプシンノックアウトマウスとコントロールマウスを用いて肝虚血再還流モデルを作成し、肝障害の変化を解析したところ、カテプシン L 欠損マウスでは、コントロールマウスと比較し血清 ALT 値が有意に増加し、肝組織 HE 染色標本でも肝細胞壊死が強く誘導されることがわかった。

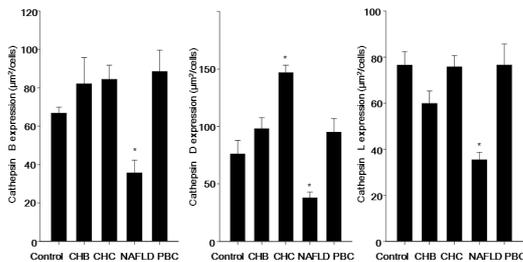
さらにカテプシン欠損マウスでは虚血再還流後の肝組織において p62 蛋白発現がコントロールマウスと比較し増加していたことからカテプシン L 欠損によってオートファジー機能が抑制され、虚血再還流後の肝障害が増悪したものと推測された。



#### 肝再生とカテプシンL

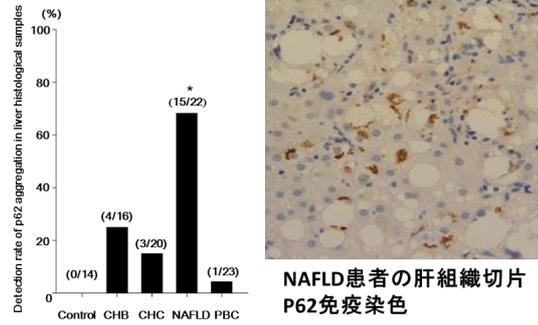
カテプシンL 欠損マウスとコントロールマウスにおいて70%部分肝切除術を行い、肝切除後の肝再生について検討したところ、カテプシンL 欠損マウスの方がコントロールマウスと比較し肝重量回復が早く生じることがわかった。また肝部分切除4-8時間後の肝組織切片のBrdU染色においてもBrdU陽性肝細胞数がカテプシン欠損マウスで有意に多く観察され、さらに肝組織中のCyclinD1が強く発現していた。以上のことからNAFLDモデルにおいて観察されるカテプシンLの発現低下は肝再生促進に作用している可能性が示唆された。

4) 臨床病態におけるオートファジーの関与  
正常肝組織(Control)、B型慢性肝炎(CHB)、C型慢性肝炎(CHC)、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)患者から採取された肝組織検体を免疫染色し、カテプシンB, D, L発現変化を解析したところNAFLD患者の肝組織では他の慢性肝炎患者の肝組織と比べカテプシンB, D, L発現がすべて低下していた。

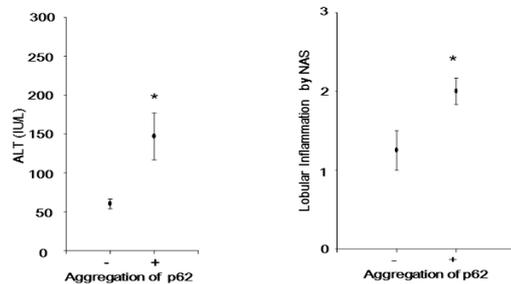


次に肝組織のp62蛋白発現を調べたところ、NAFLD患者の肝組織ではp62蛋白凝集体が肝細胞内に高頻度に観察された。肥満モデルマウスの結果と同様にヒトにおいても肝脂肪化はリソソームのカテプシン発現低下を介してオートファジー蛋白分解能を抑制しているものと考えられた。一方、肝細胞の電子顕微鏡観察においてはNAFLD患者の肝細胞ではオートリソソーム数の有意な増加が観察されたことから、リソソーム・オートファジー蛋白分解能低下によってオートリソソームの自己消化が抑制され、オートリソソーム

蓄積とp62蛋白蓄積が誘導されたと思われる。



次にNAFLD患者において肝細胞内p62凝集体形成と肝病態との関係について解析を行ったところ、p62凝集体形成は血清ALT値と有意に相関し、さらに病理組織学的分類の炎症のスコアと相関していた。一方で肝脂肪化とは有意な相関を認めなかった。NAFLDにおいてオートファジー機能障害は肝細胞死・肝炎と密接に関係しており、p62発現の評価はNAFLD進展を予測する上で有効である可能性が示唆された。



以上の研究より肝脂肪化によって生じるリソソーム蛋白分解酵素カテプシン発現低下やリソソーム酸性化障害はオートファジー機能障害誘導において重要な役割を果たしているものと推測された。オートファジー機能障害は変性蛋白蓄積や傷害オルガネラ蓄積によって細胞死を誘導するものと考えられるが、一方で、この細胞障害に抵抗し、肝機能を維持するために、p62発現増加を介した酸化ストレス緩衝作用やリソソーム発現低下による肝再生誘導作用が生じるものと推測された。これらの複雑な機構は、臓器保護という側面からは生体に対し有益に作用するが、逆に遺伝子損傷細胞にも保護的に作用するため発癌を誘導する方向にも作用する可能性があると考えられた。またカテプシンL発現ベクターの解析よりNAFLDにおいては単にオートファジーを誘導すれば肝病態が改善するわけではないということが明らかとなった。

肝疾患とオートファジーに関しては複数の細胞内機序が関連し複雑な機構を呈しているものと推測され、さらなる研究が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計2件)

Suppression of autophagy sensitizes Kupffer cells to endotoxin. Fukada H, Yamashina S, Izumi K, Komatsu M, Tanaka K, Ikejima K, Watanabe S. Hepatol Res. 2012 Nov;42(11):1112-8. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01024.x.

Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. Hepatol Res. 2014 Sep;44(9):1026-36. doi: 10.1111/hepr.12282.

〔学会発表〕(計7件)

NAFLD患者における肝カテプシンL発現とオートファジー機能の評価  
福生 有華, 山科 俊平, 泉 光輔, 稲見 義宏, 山形 寿文, 今 一義, 鈴木 聡子, 池嶋 健一, 渡辺 純夫  
第39回日本肝臓学会東部会 2012年12月6日 東京・グランドプリンスホテル新高輪

肝脂肪化とオートファジー機能不全  
稲見 義宏, 山科 俊平, 泉 光輔, 福生 有華, 青山 友則, 内山 明, 今 一義, 鈴木 聡子, 池嶋 健一, 渡辺 純夫  
日本臨床分子医学会学術総会 2013年4月12日 東京・東京国際フォーラム

Hepatic steatosis causes the dysfunction of autophagy in NAFLD patients  
Yuka Fukuo, Shunhei Yamashina, Sonoue Hiroshi, Arakawa Atsushi, Kosuke Izumi, Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Satoko Suzuki, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe  
米国消化器病学会週間 2013.5.20 米国・オーランド

非アルコール性脂肪性肝疾患患者におけるオートファジー機能障害とカテプシン発現異常  
福生 有華, 山科 俊平, 泉 光輔, 園上 浩司, 荒川 敦, 青山 友則, 内山 明, 今 一義, 鈴木 聡子, 池嶋 健一, 渡辺 純夫  
第49回日本肝臓学会総会 2013年6月6日 東京・京王プラザホテル

Hepatic steatosis impairs acidification of autolysosomes via suppression of vacuolar ATPase subunit in lysosomes.  
Eisuke Nakadera, Shunhei Yamashina, Yoshihiro Inami, Kousuke Izumi, Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe  
米国肝臓学会 2014年11月10日 米国・ボストン

B型肝炎・C型肝炎における肝細胞内 p62 蓄積と肝病態との関連についての検討  
中寺 英介, 山科 俊平, 福生 有華, 泉 光輔, 稲見 義宏, 青山 友則, 内山 明, 柳沼 礼子, 福原 京子, 今 一義, 鈴木 聡子, 池嶋 健一, 渡辺 純夫  
第39回日本肝臓学会東部会 2014年11月28日 東京・京王プラザホテル

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  
中寺 英介, 山科 俊平, 渡辺 純夫  
第101回日本消化器病学会総会シンポジウム 2015.4.24 宮城・仙台国際センター

〔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  
渡辺 純夫 (SUMIO, Watanabe)  
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 (KENICHI Ikejima)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 20317382

山科 俊平 (SHUNHEI Yamashina)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30338412

池嶋 健一 (KAZUYOSHI Kon)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30398672

(3)連携研究者  
なし