

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26253047

研究課題名(和文)肝発癌過程におけるアポトーシスとオートファジーの統合解析と新規治療法の開発

研究課題名(英文)The impact of hepatocyte apoptosis and autophagy in the process of livercarcinogenesis

研究代表者

竹原 徹郎 (Takehara, Tetsuo)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞株にパルミチン酸を投与するとRubiconの発現上昇を伴うオートファジー抑制を認めた。Rubiconを抑制するとパルミチン酸投与によるアポトーシスと脂肪蓄積は軽減した。Rubiconの発現増加はパルミチン酸投与によるRubiconの分解抑制が生じることによるものであった。高脂肪食摂取マウスにおいてもRubiconの発現増加を伴うオートファジーの亢進を認めた。肝細胞特異的Rubicon欠損マウスでは高脂肪食によるオートファジー抑制が改善し、肝脂肪化とアポトーシスが抑制された。ヒトの脂肪肝検体においてもRubiconの発現増加が確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated autophagic change in the liver and the effect on liver apoptosis and lipid accumulation in NAFLD model. In liver cell lines, palmitic acid (PA) treatment suppressed autophagy with increase of Rubicon. Rubicon blockade attenuated autophagy impairment and reduced palmitate-induced apoptosis and lipid accumulation. The Rubicon increase by PA was caused by suppression of Rubicon degradation. Rubicon was also up-regulated in association with autophagy impairment in livers of mice fed a high-fat diet (HFD). Hepatocyte-specific Rubicon knockout mice showed amelioration of liver steatosis and injury as well as attenuation of autophagy impairment for four months HFD feeding. In humans, liver tissues obtained from patients with NAFLD expressed significantly higher levels of Rubicon than those without steatosis. Rubicon might be a new therapeutic target for NAFLD progression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：脂肪肝 肝細胞 オートファジー アポトーシス Rubicon

1. 研究開始当初の背景

(1) アポトーシスは不必要な細胞を除去するシステムとして、またオートファジーは細胞内の不要物質を分解除去するシステムとして、臓器や個体の恒常性の維持に必須の生命現象である。肝臓においてはこれらのシステムの破綻が病的状態の要因となる。申請者らは肝細胞アポトーシスの亢進が肝臓の線維化や発癌の要因となることを報告してきた(文献 1、2、3)。また、肝細胞オートファジーの抑制が線維化や発癌の要因となることも確認されている。この両システムは密接に関連しているものの、両者のクロストークについては不明な点が多い。

(2) 脂肪肝は極めて有病率の高い生活習慣病の一つであり、約 10%の症例で脂肪肝を発症し、肝硬変・肝癌へと進展する。脂肪肝では、単純性脂肪肝に比し、肝細胞のアポトーシスが亢進しており、疾患進展との関連が示唆されている。一方、脂肪肝では肝細胞のオートファジー抑制が生じていることも報告されている。このように、脂肪肝あるいは脂肪肝からの肝疾患の進展に関しては、肝臓におけるアポトーシスやオートファジーの両者が重要な意義を持っていると推察されている。

(3)脂肪肝から脂肪肝への進展、脂肪肝から線維化・発癌経路にアポトーシスとオートファジーの変調がどのように関わっているかを統合的に解析することで、脂肪肝に対する新たな治療ターゲットを探ることは社会的需要が大きい研究であると考えられる。

<引用文献>

Takehara T et al, Gastroenterology. 2004 127(4):1189-97

Hikita H et al, Hepatology. 2009 50(4):1217-26

Hikita H et al, J Hepatol. 2012 57(1):92-100

2. 研究の目的

(1)培養細胞およびマウスを用いて、NAFLDの病態において肝細胞のアポトーシス、脂肪蓄積、オートファジーがどのように変化しているのかを検討する。

(2) NAFLDの病態において、オートファジー抑制因子 Rubiconの発現がどのように変化し、アポトーシスや脂肪蓄積にどのような影響を与えるのかを検討する。

(3)NAFLDの病態における、オートファジー抑制蛋白 Rubiconの発現制御機構を検討する。

(4)上記で得られた結果がヒトの NAFLD においても見られるかどうかを明らかにするた

めに、臨床検体のオートファジーを評価する。

3. 研究の方法

(1)マウス肝細胞株 CL2、マウス初代培養肝細胞、ヒト肝癌細胞株 HepG2 に対してパルミチン酸(PA)投与を行い、肝細胞死やオートファジーに関し検討した。オートファジーの評価にはリソソーム阻害薬である Bafilomycin を用いた Autophagy flux アッセイを用いた。また、Halo-Tag の付いた Rubicon プラスミドを HepG2 に強制発現させ、パルスチェイス・アッセイを行うことにより、肝細胞における Rubicon の分解量を検討した。

(2)野生型マウス C57BL/6J に対して通常食および高脂肪食(HFD32[®])を摂取させ、肝細胞アポトーシス、肝脂肪蓄積と肝細胞オートファジーの変化について検討した。

(3) Albumin-Cre マウスをオートファジー抑制蛋白 Rubicon の両側を loxP 配列で挟んだマウスと交配することにより、肝細胞特異的 Rubicon 欠損マウスを作成した。本マウスの通常飼育下での表現型を検討すると共に、高脂肪食を摂取させた際の脂肪肝の表現型や、肝細胞アポトーシスに与える影響につき検討した。

(4) B 型慢性肝炎及び C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害を除いたヒト肝臓切除検体を用いて、HE 染色にて 5%以上の脂肪化が認められたサンプルを脂肪肝サンプル、5%以下であったものを非脂肪肝サンプルとして、両者におけるオートファジー関連蛋白発現を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝癌細胞株 HepG2 に PA を投与すると、細胞内の脂肪滴蓄積が増加し、投与濃度依存のおよび投与時間的にアポトーシス陽性細胞割合が増加した。この時、ER ストレス関連蛋白の発現増加を認めた。オートファジー関連蛋白については、PA 投与濃度および投与時間依存的に p62 と LC3- の蓄積を認めた。Bafilomycin を用いた Autophagy flux アッセイにより PA はオートファジーを強く抑制することが明らかになった。そこでオートファジー制御蛋白発現を検討したところ、オートファゴソームとリソソームの融合を負に制御する Rubicon の、PA の投与濃度依存的、投与期間依存的発現増加を認めた。この現象はマウス肝細胞株 CL2 とマウス初代培養肝細胞においても観察された。Rubicon の抑制がアポトーシスと脂肪蓄積に与える影響を検討するため、siRNA を用いて Rubicon を抑制した HepG2 細胞に PA を投与した。PA 投与時に見られる p62 と LC3- の蓄積は改善し、PA 投与により生じる脂肪蓄積とアポトーシス細胞の増加はいずれも軽減した。ER ストレス関連蛋白についても発現低下

を認めた。以上より、PA は Rubicon 増加を介してオートファジーを抑制し、ER ストレスタンパク増加の原因となり、アポトーシス亢進と脂肪蓄積増悪の一因となることが明らかとなった。

(2) Rubicon の発現制御機構を明らかにするために、PA 投与時の Rubicon の mRNA を測定したが、変化を認めなかった。そこで Halo-Tag を付加した Rubicon 強制発現プラスミドを HepG2 細胞に発現させ、プラスミドによる Halo-Rubicon 発現量に PA 投与が与える影響を検討したところ、PA の投与時間依存的に Halo-Rubicon の発現増加を認め、PA 投与下の肝細胞では Rubicon 分解の遅延が示唆された。肝細胞株 CL2 に対して PA 投与を行った際の Rubicon 発現をウエスタンブロット法で検討したところ、Rubicon のバンドの輝度上昇に加え、バンドの上方へのシフトが見られた。この輝度上昇およびバンドシフトは、リン酸化阻害薬である PPase の投与により改善していたことから、Rubicon の分解遅延にはリン酸化が影響している可能性が考えられた。次に、肝細胞株に PA を投与した際のプロテオソーム活性を測定したところ、有意に減少していた。そこでプロテオソーム阻害剤である MG132 を肝細胞株に投与して Rubicon 蛋白の発現を見たところ、時間依存的に発現増加を認めたが、PA 投与時には MG132 を投与しても Rubicon の増加が見られなかった。PA による Rubicon の分解遅延には、プロテオソーム活性の低下が関与している可能性が示唆された。

(3) 野生型マウスに高脂肪食を投与すると、高脂肪食の投与期間依存的に脂肪蓄積を認め、肝細胞アポトーシスは亢進した。本マウスモデルにおいても肝組織中の ER ストレスタンパクの発現増加を認めた。オートファジー関連蛋白についても、*in vitro* と同様に、p62 と LC3- の蓄積増加を認め、Rubicon は高脂肪食投与 1 ヶ月時点より明らかな発現増加を認めた。また、高脂肪食摂取マウスにおいてはプロテオソーム活性も有意に抑制されていた。プロテオソーム阻害剤である MG132 を投与すると、通常食摂取マウスでは Rubicon の発現増加が見られたのに対し、高脂肪食摂取マウスでは、Rubicon 発現の更なる増加は認めなかった。このことから生体においても Rubicon の分解遅延にはプロテオソーム活性の低下が関与している可能性が示唆された。

(4) 肝細胞特異的 Rubicon 欠損マウスは、肝組織においてオートファジーの亢進が確認されたが、通常飼育下では野生型マウスと明らかな差を認めなかった。そこで本マウスに対し高脂肪食を摂取させた際の表現型につき検討した。Rubicon 欠損マウスの肝臓では高脂肪食摂取により見られる p62 および LC3-

の蓄積は軽減しており、オートファジーの抑制が解除されていた。また、高脂肪食摂取により見られる肝腫大、血清 ALT 上昇、肝細胞アポトーシスの亢進は軽減しており、肝脂肪蓄積も改善した。次に、肝細胞特異的 Rubicon 欠損マウスに高脂肪食摂取をさせた際の脂肪滴蓄積軽減の機序を検討した。Rubicon 欠損マウスはコントロールと比較して、脂肪酸トランスポーター、脂質合成酵素、脂質輸送、酸化に関わる遺伝子発現には差を認めなかった。そこで肝組織の電子顕微鏡像を詳細に検討したところ、脂肪滴周囲を多数のオートファゴソームが取り囲み脂肪滴を分解する像が観察され、オートファジー亢進に伴う脂肪滴分解が生じている可能性が示唆された。また、本マウスは高脂肪食摂取により肝重量が低下する一方で内臓脂肪重量が有意に増加しており、肝臓において分解された脂肪滴内の脂質が肝外に放出され内臓脂肪蓄積に至っている可能性が示唆された。

(5) オートファジー亢進を介して NAFLD の病態改善に寄与する可能性があることが報告されたカルシウム拮抗薬 2 薬剤 (Verapamil、Nicardipine) について、ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いてこれらの薬剤のオートファジーの変化や Rubicon との関連につき検討した。HepG2 細胞に Verapamil および Nicardipine を単独投与すると、p62 が低下して LC3- の発現の貯蔵を認めた一方、Rubicon 発現は増加した。そこで Bafilomycin を用いたオートファジーフラックスを測定すると両薬剤はオートファジーを低下させることがわかった。また、PA 投与により増加する Rubicon 発現は両薬剤投与により減少せず、p62 の低下も見られなかった。また、LAMP1 と LC3 の共局在を蛍光顕微鏡で検討したところ、パルミチン酸投与により減少する両分子の共局在は Verapamil および Nicardipine 投与により改善しなかった。以上より、両薬剤の NAFLD 病態改善効果は Rubicon を介した作用ではないと考えられた。

(6) ヒトの脂肪肝患者から採取した肝組織と非脂肪肝患者から採取した肝組織におけるオートファジー関連蛋白発現を検討したところ、脂肪肝サンプルにおいては p62 と Rubicon の両者が有意に発現増加しており、前述の *in vitro* および *in vivo* で見られた現象がヒトの NAFLD 症例においても確認された。

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 1 件)

Hepatology.2016 64(6):1994-2014.

Rubicon inhibits autophagy and

accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice.

Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y, Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T.

〔学会発表〕(計 16 件)

2014年4月23-26日 第100回日本消化器病学会総会

東京国際フォーラム 発表日4月25日

「NASH病態形成におけるオートファジーとアポトーシスの意義」

田中聡司、正田隼人、牧野祐紀、中堀輔、齋藤義修、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智秀、竹原徹郎

2014年5月29-30日 第50回日本肝臓学会総会 東京

ホテルニューオータニ

PD1「DMとNAFLD・NASHの病態を考える：診断と治療の新たな展開」「NASH病態形成におけるオートファジーとアポトーシスの意義」

5月29日
田中聡司、正田隼人、竹原徹郎

2014年6月27-28日 第21回肝細胞研究会 東京

「脂肪肝炎におけるオートファジー制御タンパクRubicon発現上昇を介した肝細胞アポトーシスの亢進」発表日6月27日

田中聡司、正田隼人、野崎泰俊、甲斐優吾、牧野祐紀、中堀輔、齋藤義修、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智秀、竹原徹郎

2014年10月23日-24日 第18回日本肝臓学会大会(JDDW2014) 神戸

S4 NAFLD/NASHの病態解析と新規治療

「NASH病態形成におけるオートファジーとアポトーシスの意義」発表日10月23日

田中聡司 正田隼人 竹原徹郎

2014年11月7-11日 The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston USA

「Increased expression of Rubicon protein by high fat diet suppresses autophagic flux and induces apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.」(優秀演題) 11月9日

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Yasutoshi Nozaki, Yugo Kai, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2015年4月23-25日 第101回日本消化器

病学会総会 仙台

発表日4月25日

「NASH病態形成におけるRubicon発現増加を介したオートファジー抑制と小胞体ストレス応答の活性化」

田中聡司、正田隼人、竹原徹郎

2015年5月21-22日 第51回日本肝臓学会総会 熊本

「肝細胞への脂肪酸負荷はRubicon発現増加を介してオートファジーを抑制し、肝障害を増悪させる」 5月22日

田中聡司、正田隼人、竹原徹郎

2015年6月4-5日 第22回肝細胞研究会 米子(米子コンベンションセンター)

「非アルコール性脂肪肝炎病態形成における、オートファジー制御蛋白Rubiconの役割」

発表日6月5日

田中聡司、正田隼人、野崎泰俊、甲斐優吾、牧野祐紀、中堀輔、齋藤義修、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎

2015年10月8日-9日 第19回日本肝臓学会大会(JDDW2015) 東京

「Enhanced expression of Rubicon inhibits autophagy and promotes apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease」10月9日

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Tetsuo Takehara

2015年11月13-17日 The 66th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, San Francisco, USA

「Enhanced expression of Rubicon inhibits autophagy and promotes apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in nonalcoholic fatty liver disease.」11月16日

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Sadatsugu Sakane, Yasutoshi Nozaki, Yugo Kai, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

2016年5月19日-20日 第52回日本肝臓学会総会 千葉

0-73「脂肪酸負荷は、肝細胞Rubiconの分解遅延によりオートファジーを抑制することで、脂肪滴蓄積と肝細胞障害を増悪させる」 5月19日 田中聡司、正田隼人、竹原徹郎

2016年11月13日-15日 第10回オートファジー研究会 新潟

「肝細胞と脂肪細胞におけるRubiconを介した脂肪代謝の制御」

坂根貞嗣 竹原徹郎

2017年4月21日 第1回消化器臓器間ネットワーク研究会 東京
「肝臓と脂肪組織のオートファジーによる脂肪蓄積制御」
4月21日 坂根貞嗣、疋田隼人、田中聡司、明神悠太、塩出悠登、野崎泰俊、齋藤義修、中堀輔、小玉尚弘、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎

2017年5月29日-6月1日 The 8th International Symposium on Autophagy Nara
「Intake of high fat diet causes suppression of hepatocyte autophagy and enhancement of adipocyte autophagy and controls fat deposition of liver and adipose tissue」
5月29日、30日 Sadatsugu Sakane, Hayato Hikita, Satoshi Tanaka, Yasutoshi Nozaki, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tsuyoshi Kawabata, Maho Hamasaki, Tamotsu Yoshimori, Tetsuo Takehara

2017年6月8日-6月9日 第53回日本肝臓学会総会 広島
「肝臓と脂肪組織のオートファジーによる肝脂肪蓄積制御」
6月9日 坂根貞嗣、疋田隼人、田中聡司、明神悠太、塩出悠登、野崎泰俊、齋藤義修、中堀輔、小玉尚宏、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎

2017年10月20日-24日 AASLD The Liver Meeting 2017 Washington D.C.
「Autophagic changes of both adipose tissues and the liver induced by high fat diet feeding contribute to hepatic lipid accumulation」
10月23日 Sadatsugu Sakane, Hayato Hikita, Satoshi Tanaka, Kumiko Shirai, Naoki Mizutani, Yuta Myojin, Yuto Shiode, Yasutoshi Nozaki, Yoshinobu Saito, Tasuku Nakabori, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara

〔図書〕(計 1 件)

疋田隼人、竹原徹郎、(2017) 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態進展における肝細胞オートファジーの影響 実験医学増刊 35 巻 15 号、羊土社、191-197

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

脂肪肝の発症メカニズムを解明

http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2016/20160913_1

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹原 徹郎(TAKEHARA, Tetsuo)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

(2)研究分担者

巽 智秀(HIKITA, Hayato)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20397699

(3)研究分担者

疋田 隼人(HIKITA, Hayato)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20623044

(4)研究協力者

田中 聡司(TANAKA, Satoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・博士課程
大学院生

研究者番号：

(5)研究協力者

坂根 貞嗣(SAKANE, Sadatsugu)

大阪大学・大学院医学系研究科・博士課程
大学院生

研究者番号：