

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21307

研究課題名(和文) 風船様肝細胞の形成機序解明による非アルコール性脂肪性肝炎の治療標的分子解明の試み

研究課題名(英文) Possible mechanism of ballooned hepatocyte formation in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

柿坂 啓介 (Kakisaka, Keisuke)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：40583563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)の病態進展に伴い出現する風船様肝細胞(Ballooned hepatocyte: BH)は、肝病理組織所見において非アルコール性脂肪性肝炎の診断根拠になる。BH様変化に細胞死シグナルのうちでJNKおよびCaspase9とオートファジー関連蛋白であるRubiconが関連していることを明らかにした。また、肝生検で診断されたNAFLD患者の経過を観察したところ、生検時にBHが観察された症例で将来線維化が進展する可能性が明らかとなった。本研究によりBHが治療標的になり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) has increased. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) shows progression of liver fibrosis in NAFLD. NASH is characterized by presence of ballooned hepatocyte. We revealed that signaling of cell death and impaired autophagic process were associated with morphological and biochemical similarity of ballooned hepatocyte. We also found the presence of ballooned hepatocytes was a risk factor for the progression of liver fibrosis in clinical study. The present project demonstrated that ballooned hepatocyte might be therapeutic target of NASH.

研究分野：消化器内科

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 NASH 風船様肝細胞 Ballooned hepatocyte Hepatocyte ballooning Auto phagy Fibrosis 肝線維化

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群の肝臓での表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患は増加傾向にある。その中で非アルコール性脂肪肝炎: Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) は、持続した炎症から線維化が進展し肝硬変に至り、肝癌の原因疾患となる。炎症から惹起される持続した肝細胞死(アポトーシス)が、線維化・発癌の原因になることが示されており、肝発癌を抑制するために、アポトーシスの制御が重要である。近年 NASH による肝癌は増加傾向にあり、NASH の病態解明とそれに基づいた治療法確立が急務である。

NASH は、肝組織所見により診断されるが、特に風船様肝細胞 (Balloonated hepatocyte: BH) の出現は、その重症度と相関し、NASH 診断の重要な指標である。BH は細胞質に p62 蛋白・ユビキチン化蛋白の蓄積が特徴的であるとされ、光学顕微鏡では Mallory-Denk 小体として認識される。BH の細胞質のユビキチン化蛋白は、分解されるべき蛋白でありながら細胞内に蓄積しており、細胞内での蛋白質合成・分解が障害されていることを示唆している。障害されたオルガネラや異常蛋白質を排除するオートファジーが、NASH で抑制されていることや、オートファジー亢進により NASH 肝で炎症が改善し、BH が減少することが報告されている。しかし、NASH における持続するアポトーシスとオートファジー抑制の機序に、不明な点も多い。

## 2. 研究の目的

(1) BH 形成機序を細胞生物学的に解明し、その制御の標的分子を探索すること、  
(2) BH の臨床的意義の検討を目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) C57BL/6J マウスおよび培養肝細胞 AML12 を用いて、アポトーシス・オートファジー関連蛋白を評価し、相互作用の有無とその機序を検討する。

(2) 肝生検で評価された非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者の病理診断および臨床経過を比較検討する。

## 4. 研究成果

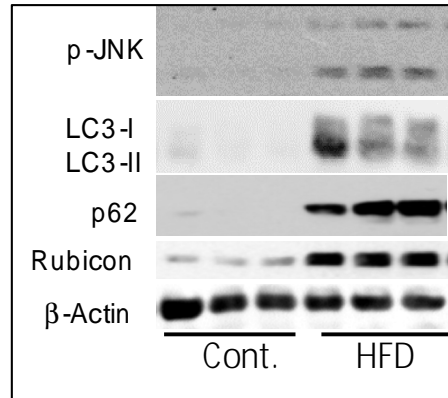
### (1) BH 形成機序の解明

肝細胞における脂肪毒性によるオートファジー抑制の機序解明

高脂肪食マウスでのオートファジー関連蛋白の発現

《結果》6週齢、雄 C57BL/6J に高脂肪食 (HFD60) を与え、12週間後に血液生化学データおよび

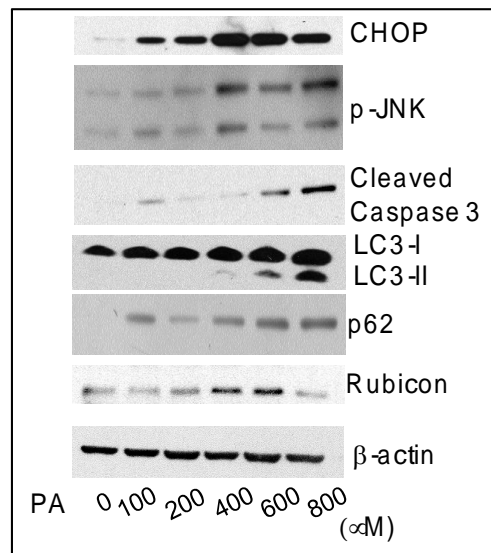
肝における発現タンパクを評価した。高脂肪食マウスで、コントロール食と比較して、有意に脂肪化肝となり、トランスアミナーゼ値も高値であった。LC3-I、-II、p62、後期オートファジーを抑制する蛋白である Rubicon (Run domain protein as Beclin-1 interacting and cystein-rich containing) の発現も亢進していた。以上の結果より、HFD による NASH モデルマウスにおいてオートファジー抑制に Rubicon 蛋白発現が関与してい



る可能性が示唆された。

パルミチン酸による AML12 のアポトーシス・オートファジー関連蛋白発現

《結果》AML12 にパルミチン酸を 100-800μM で投与したところ、600μM で CHOP 発現が、800μM で Cleaved caspase3 発現が亢進した。LC3 は 200μM に発現がピークとなり、p62 は 800μM まで発現が徐々に亢進した。濃度依存性に後期オートファジーが阻害されていた。

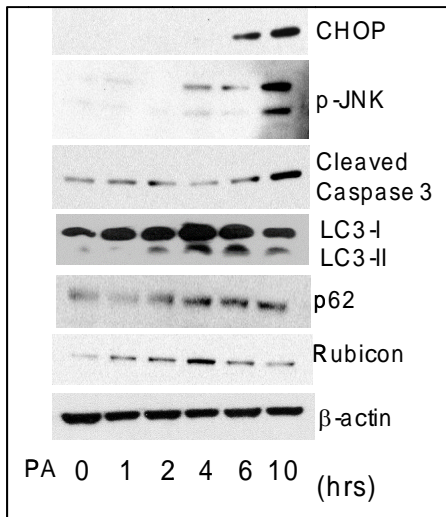


肝細胞におけるアポトーシス亢進とオートファジー抑制の経時的な変化と相互作用

パルミチン酸による AML12 でのアポトーシス・オートファジー関連蛋白の経時的変化

《結果》AML12 へパルミチン酸 800μM を 0-10 時間投与し、蛋白発現を評価した。CHOP、Cleaved caspase3 は 10 時間まで経時的に増

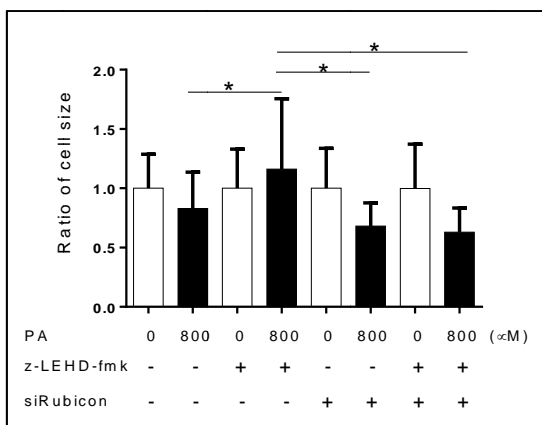
加していた。一方、LC3が6-10時間を頂点とし、p62は10時間で減少した。以上より4-6時間に後期オートファジーの過程が阻害され、10時間ではそれと比較してオートファジーが進行している可能性が示唆された。Rubiconは4時間を頂点に減少した。6-10時間におけるRubiconの減少によりオートファジー抑制が軽減され、オートファジーが亢



進した可能性が示唆された。

#### アポトーシスシグナルによるオートファジー抑制とCaspase9の作用

アポトーシスシグナルの亢進に伴いオートファジー抑制蛋白Rubiconの発現が低下したことよりアポトーシスシグナルによるRubicon発現調節が存在する可能性が示唆された。これを明らかにするためにPan-Caspase阻害剤、Caspase9阻害剤、JNK阻害剤をそれぞれ添加し、10時間パルミチン酸添加によるRubicon発現の変化を確認した。Caspase9阻害剤を添加した時のみRubicon蛋白が著明に増加したことよりCaspase9によりRubiconが分解されているものと想定された。BH形成がオートファジー抑制によるものと仮説をたて、パルミチン酸とCaspase9阻害剤を添加した際の細胞径を測定したところ阻害剤非添加の細胞よりも有意に大きかった。さらにこの条件でsiRNAを用いてRubicon発現を阻害したところ細胞径はパルミチン酸単独のものと同程度になった。以上よりBHのように脂肪毒性環境下で異常蛋白を細胞内に溜め細胞径が増大するためにはCaspase9阻害およびRubicon発現によるオートファジー抑制が重要であるこ



とが明らかとなった。

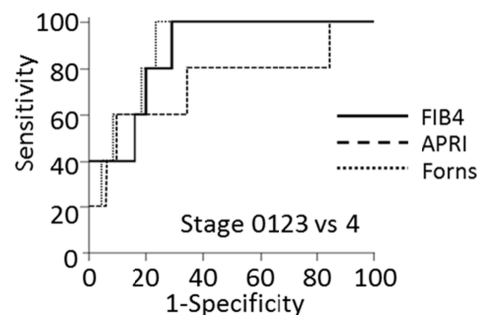
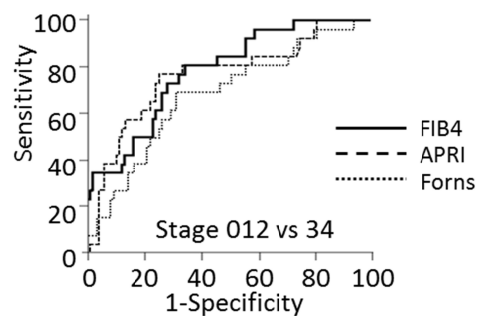
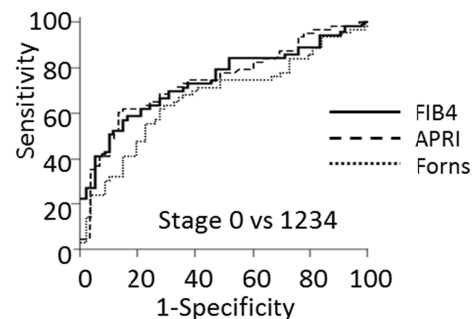
#### (2) BHの臨床的意義の検討

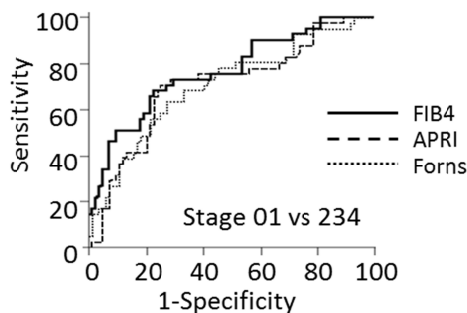
NASH病態におけるBHの臨床的意義を評価するために1年以上観察し得た肝生検で診断されたNAFLD患者127名を対象として以下の検討を行った。

血液検査を用いた肝線維化指標の評価  
線維化の推移を検討するために血液検査結果を用いた肝線維化指標の正確性を検討した。APRI、FIB-4、Forns indexを用いて各線維化ステージ(Brunot stage)の識別能を検討したところ、FIB4 indexが最も正確に線維化を評価していたことが明らかになった。

#### 肝線維化に影響する身体所見・病理所見の検討

FIB-4の観察期間内の変化と年齢、性別、身体計測値、肝生検組織所見を比較した。多変量解析の結果、NASH群でFIB-4の変化に影響する因子はBHの有無のみであった。線維化のみがNASHの予後に影響を与えるとの報告があるが、線維化のない群でもBHが観察される群では将来、線維化が進展する可能性があり慎重な経過観察の必要性が明らかになった。





## 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4件)

Kakisaka K, Suzuki Y, Fujiwara Y, Abe T, Yonezawa M, Kuroda H, Ishida K, Sugai T, Takikawa Y. Evaluation of ballooned hepatocytes as a risk factor for future progression of fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol. 2018 in press, 査読あり

Kakisaka K, Yoshida Y, Suzuki Y, Sato T, Kuroda H, Miyasaka A, Takikawa Y. Serum markers for mitochondrial dysfunction and cell death are possible predictive indicators for drug-induced liver injury by direct acting antivirals. Hepatol Res. 2018 Jan;48(1):78-86. 査読あり

Kakisaka K, Kataoka K, Suzuki Y, Kuroda H, Takikawa Y. Appropriate timing to start and optimal response evaluation of high-dose corticosteroid therapy for patients with acute liver failure. J Gastroenterol. 2017 Aug;52(8):977-985. 査読あり

Suzuki A, Kakisaka K, Suzuki Y, Wang T, Takikawa Y. c-Jun N-terminal kinase-mediated Rubicon expression enhances hepatocyte lipoapoptosis and promotes hepatocyte ballooning. World J Gastroenterol. 2016 Jul 28;22(28):6509-19. 査読あり

[学会発表](計2件)

柿坂啓介、鈴木彰子、滝川康裕 (2016) 非アルコール性脂肪性肝疾患におけるオートファジー抑制機構と Ballooned hepatocyte 形成についての基礎的検討 広島肝臓プロジェクト、広島、2016年6月25日

柿坂啓介、鈴木彰子、滝川康裕 (2016) Caspase9 はオートファジーを抑制する Rubicon を分解し、肝細胞の Ballooning を抑制する 第52回肝臓学会総会、千葉、2016年5月19-20日

[その他]

ホームページ等

<http://gastro-hepatol.iwate-med.ac.jp/kouza/kenkyu/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿坂 啓介 (Kakisaka Keisuke)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：40583563