

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08075

研究課題名(和文) オートファジーを指標にした脂肪肝関連肝前がん病変の解析

研究課題名(英文) Analysis of steatosis-related preneoplastic liver lesion using markers for autophagy

研究代表者

吉田 敏則 (YOSHIDA, TOSHINORI)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80726456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：8週間で初期肝発がん過程の観察が可能なラット肝中期発がん試験法を用いて高脂肪飼料給餌による脂肪肝関連肝発がんモデル、さらにストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルを組み合わせることで、糖尿病・脂肪肝関連肝発がんモデルを構築した。肝前がん病変にはオートファジー指標LC3およびp62が特異的に発現し、両者の発現バランスの変化によりオートファジーフラックスの評価が可能であり、肝前がん病変はオートファジーの後期抑制により増強し、オートファジー誘導により減弱することが示唆される結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリックシンドロームに含まれ、過食、運動不足など現在のストレス社会に生きる現代人の健康を脅かす重要な疾患のひとつである。その罹患者は国内外で増加しつつあり、また、一部の患者に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) から、線維化を経て、肝がんを発症することが危惧されている点から、その防御対策が可及的速やかに実施されなければならない。本研究課題によりそのモデルが構築され、オートファジーの制御が治療の一旦を担うことが示され、NAFLD/NASH関連肝発がんの治療戦略を考える上で大きく貢献した。

研究成果の概要(英文)：We developed a steatosis-related hepatocarcinogenesis model based on a 8-week medium-term liver assay in high fat diet-fed rats and a diabetes/steatosis-related hepatocarcinogenesis model based on high fat diet-fed, streptozotocin-treated rats. Autophagy markers LC3 and p62 expressed in precancerous liver lesions, and alterations in expression balance of both parameters indicate the course of autophagy process (flux). The precancerous liver lesions might be enhanced by late step inhibition of autophagy and are suppressed by induction of autophagy.

研究分野：毒性病理

キーワード：非アルコール性脂肪肝 オートファジー 肝前がん病変 高脂肪飼料 糖尿病 LC3 p62 GST-P

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリックシンドロームに含まれ、過食、運動不足など現在のストレス社会に生きる現代人の健康を脅かす重要な疾患のひとつである。その罹患者は国内外で増加しつつあり、また、一部の患者に非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) から、線維化を経て、肝がんを発症することが危惧されている点から、その防御対策が可及的速やかに実施されなければならない (図1)。

このため、NAFLD/NASH の研究は国内外において精力的に推進されており、特に脂肪肝・肝炎・肝線維化への進行過程に主眼を置いた発生機序の解明が中心となっている。しかしながら、最も生命の維持を脅かす肝がん発生機序については十分には研究が進んでいない。

オートファジーは細胞内に存在する傷害された細胞内小器官や蛋白などを二重膜内に隔離しリソソームと結合して分解する自己消化システムである。オートファジーの成立にはオートファゴソームの形成による対象物 (カーゴと呼ばれる) の隔離およびオートファゴソームとリソソームの結合によりオートリソソームを形成し内容物を分解する二段階が必要となる。オートファジー関連蛋白である LC3- は隔離膜上に存在する蛋白であり、前駆物質としては LC3- が知られている。p62 は分解基質であるカーゴと LC3- 両者に結合する蛋白でオートリソソームにおいて分解される。NAFLD においてオートファジーは選択的に脂肪滴を分解し肝細胞の保護的役割を担っており、高脂肪飼料を給餌された動物モデルにおいては LC3- と p62 の蓄積で示されるようにオートファゴソームとリソソームの結合が阻害されており、オートファゴソームと脂肪の蓄積が認められている。しかし、脂肪肝内に発生する肝がん病変におけるオートファジーについては十分に検討されておらず、病理切片上では、LC3-I と LC3-II を区別できない点が課題として挙げられる。

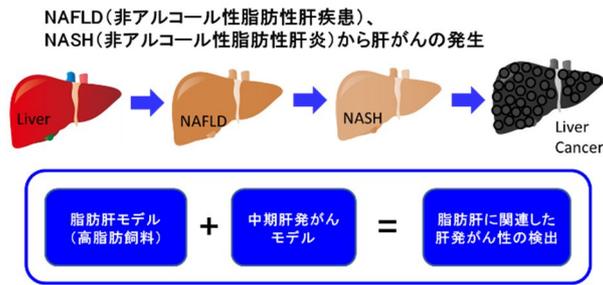


図1. 時間軸を短縮した脂肪肝・肝がん評価系の構築

2. 研究の目的

本研究では、脂肪肝関連前がん病変におけるオートファジーの関与を検討するため、高脂肪飼料を給餌した脂肪肝モデルにおいて、1) 抗菌剤メトロニダゾール及び NADPH オキシダーゼ阻害剤アポシニン、2) オートファジー抑制剤クロロキン及びオートファジー誘導剤アミオダロンを投与し、また、脂肪肝・糖尿病モデルにおいて、3) オートファジー誘導剤カルバマゼピン及びベラパミルを投与し、脂肪肝関連肝がん病変におけるオートファジーの関与を検討するため、オートファジー指標 LC3 及び p62 の免疫組織学的解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) 脂肪肝関連肝がんモデル

雄性 F344 ラットに基礎飼料または高脂肪飼料 (45 kcal) による飼育を開始し、試験終了時までそれぞれ継続して与えた。定法に従い、肝二段階発がんモデルを実施した。試験終了時に、オートファジー誘導のため一晩絶食後 (給水は継続) 血液、肝臓及び腹腔内脂肪 (精索周囲) を採取した。試験期間中の体重及び腹腔内脂肪重量を肥満指標とした。病理組織学的検査及び免疫組織化学染色に用いる目的で肝臓を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、遺伝子発現解析のため凍結保存した。

(2) 血液生化学的検査

試験終了時に採取した血液より血漿を分離し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、総ビリルビン、直接・間接ビリルビン、総コレステロールまたは中性脂肪 (トリグリセライド) を測定した。

(3) 病理組織学的検査

肝臓を薄切した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。肝臓では、NAFLD activity score (NAS) に基づき、肝細胞の脂肪化及びバルーニング (風船様変化) さらに炎症細胞集簇の各項目についてスコア化を行い、これらの項目の総合評価と個別評価を実施した。

(4) 免疫組織学的解析

PFA 固定した肝臓を薄切した後、ラット肝増殖性病変に陽性を示す glutathione S-transferase placental form (GST-P) 細胞増殖活性マーカーである Ki-67、NADPH オキシダーゼ関連分子である p22phox、アポトーシスマーカーである cleaved caspase-3、DNA 二本重鎖切断指標 -H2AX、脂肪滴膜関連タンパクである Adipophilin、オートファジーマーカー LC3、p62 の免疫組織化学染色を行った。GST-P 陽性前がん病変は、直径 0.2 mm 以上の病変数と面積ならびに肝臓の総面積を計測し、単位面積当たりの数及び面積を算出した。Ki-67、cleaved caspase-3、p22phox あるいは -H2AX 陽性肝細胞はランダムに選んだ GST-P 陽性葉の内部の 1000 個以上の肝細胞当たりの百分率を求めた。LC3、p62 については、同様の評価に加え、GST-P 陽性葉の

各指標の陽性巢の割合を算出した。GST-P 陽性巢以外の領域では、200 倍の鏡検下で 10 視野当たりの Ki-67、cleaved caspase-3、p22phox、-H2AX、LC3 及び p62 陽性細胞数をカウントした。

(5) 遺伝子発現解析

各群 6 匹ずつの肝臓サンプルから、総 RNA を抽出した。1 本鎖 cDNA を合成し、半定量的リアルタイム RT-PCR を行った。各遺伝子の mRNA 発現量は、内因性コントロールとして b-Actin (Actb) 遺伝子で補正した。

(6) 統計解析

全てのデータについて平均値及び標準偏差を求めた。統計解析は Tukey 検定または Steel-Dwass 検定を用いて行った。なお、有意水準 5%以下を有意差ありとした。

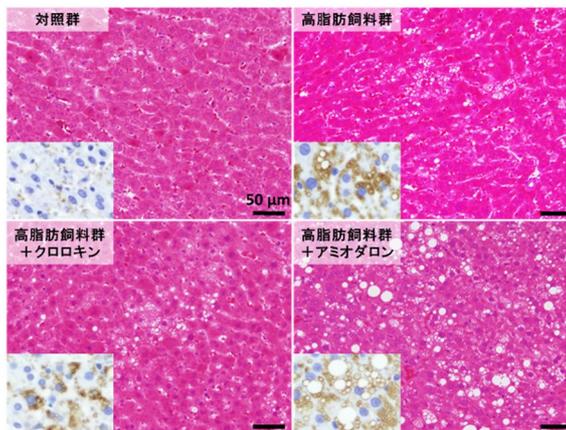


図2. 高脂肪飼料給餌による脂肪肝。挿入図はアディポフィリンによる脂肪滴染色

4. 研究成果

(1) メトロニダゾール及びアポシニン

高脂肪飼料により肥満及び脂肪肝を含む NAFLD の病態が確認され、NADPH オキシデース構成分子 p22phox の発現増加を伴う GST-P 陽性肝前がん病変が観察された。メトロニダゾールは DNA 二本鎖切断指標 γ -H2AX の発現を伴う肝前がん病変を増加させ、酸化ストレス指標となる抗酸化酵素の遺伝子発現増加も伴っていた。GST-P 陽性肝前がん病変の内、オートファジーマーカー LC3 及び p62 陽性巢が増加し、オートファジーの後期抑制が示唆された。アポシニンは前がん病変の増減には明らかな影響を及ぼさなかったが、Lc3 及び Atg7 を含むオートファジー関連遺伝子発現を変動させ、前がん病変の細胞増殖活性を抑制した。

以上より、肝前がん病変における p62 及び LC3 発現を解析することで、オートファジーの進行過程（フラックス）の解析が可能であることが示され、脂肪肝関連初期肝発がんモデルにおいて、メトロニダゾールは DNA 傷害、酸化ストレスに関連してオートファジーの後期抑制に関連した肝前がん病変形成を促進し、アポシニンは NADPH オキシデースが関連する前がん病変形成に関わるオートファジー関連遺伝子変動を誘発した。

(2) アミオダロン及びクロロキン

高脂肪飼料により肥満及び脂肪肝を含む NAFLD の病態が確認され(図 2)、細胞増殖指標 Ki-67 の発現増加を伴う GST-P 陽性肝前がん病変が観察された(図 3)。肝前がん病変ではオートファジー指標 p62 及び LC3 の発現がみられた(図 3)。クロロキン投与により、肝前がん病変における LC3 の減少傾向と p62/LC3 発現比が増加した(図 4)。アミオダロンでは、p62/LC3 発現比の減少傾向がみられ、オートファジー関連遺伝子 Atg5 の発現増加を伴っていた。前がん病変の定量解析では、クロロキン投与では明らかな変動はなかったが、アミオダロン投与では前がん病変の数が増加した。

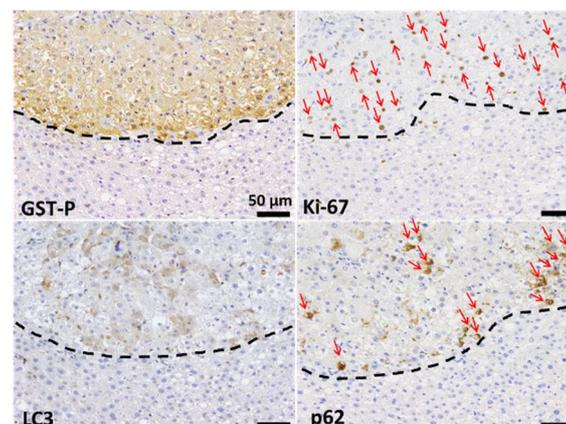


図3. 高脂肪飼料群の肝前がん病変における細胞増殖・オートファジー指標の発現。

以上より、肝前がん病変における p62 及び LC3 発現比を解析することで、オートファジーのフラックスの解析が可能であることが示され、クロロキン投与では、オートファジーの早期抑制が示唆される結果が得られた。一方、アミオダロン投与ではオートファジーの誘導が示唆された。当該試験条件下では、オートファジー誘導により肝前がん病変が抑制されることが示唆されたが、オートファジー抑制による肝前がん病変への影響は明らかでなかった。オートファジーの解析にあたり、オートファジー指標の発現が前がん病変によって多様であり、データにばらつきが大きい点が検討課題として挙げられた。

以上より、肝前がん病変における p62 及び LC3 発現比を解析することで、オートファジーのフラックスの解析が可能であることが示され、クロロキン投与では、オートファジーの早期抑制が示唆される結果が得られた。一方、アミオダロン投与ではオートファジーの誘導が示唆された。当該試験条件下では、オートファジー誘導により肝前がん病変が抑制されることが示唆されたが、オートファジー抑制による肝前がん病変への影響は明らかでなかった。オートファジーの解析にあたり、オートファジー指標の発現が前がん病変によって多様であり、データにばらつきが大きい点が検討課題として挙げられた。

3) カルバマゼピン及びベラパミル

高脂肪飼料・ストレプトゾトシン処置群で 軽度の糖尿病の発現と体重増加の抑制及び NAFLD スコアの増加が認められた。GST-P 陽性肝前がん病変の面積が増加を示し、肝前がん病変内の NADPH オキシデース

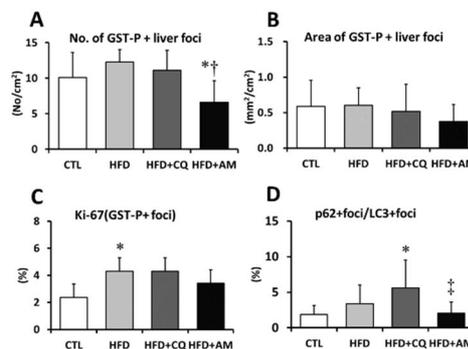


図4. 肝前がん病変、細胞増殖、オートファジー指標の解析。

構成分子 p22phox の発現率増加に加え、オートファジー指標 LC3 及び p62 の発現率ともに増加し、オートファジーの後期抑制が示唆された。両オートファジー促進剤投与により肝前がん病変が高脂肪飼料単独群と同程度に抑えられた。LC3 発現率がカルバマゼピン投与で増加し、p62 発現率は両オートファジー促進剤投与により減少し、LC3 と p62 プロット図の解析からもオートファジーの促進が示唆された。肝臓の遺伝子発現解析では、オートファジー関連遺伝子 (Atg5、Atg6、Atg7、Lamp1、Lamp2) の発現がカルバマゼピン投与により有意に減少した。

以上の結果から、肝前がん病変における p62 及び LC3 発現率をそれぞれ解析する方法に加え、LC3 と p62 プロット図の解析からも、オートファジーのフラックスの解析が可能であることが示され、ストレプトゾトシン投与・高脂肪食給餌条件下では、オートファジーの後期抑制を介して肝前がん病変形成が増加するが、オートファジー誘導剤により肝前がん病変を抑制できることが示唆された。

4) まとめ

本研究課題により構築された脂肪肝関連肝発がんモデル及び糖尿病・脂肪肝関連肝発がんモデルが NAFLD/NASH に関連した肝発がん研究に有用であることが示唆された。また、LC3 及び p62 の発現比較を組み合わせることで、前がん病変などの病理標本上の局所のオートファジーフラックスの解析が可能であり、肝前がん病変の形成にはオートファジーの後期抑制が、肝前がん病変の抑制にはオートファジーの誘導が関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masuda S, Mizukami S, Eguchi A, Ichikawa R, Nakamura M, Nakamura K, Okada R, Tanaka T, Shibutani M, and Yoshida T.	4. 巻 44
2. 論文標題 Immunohistochemical expression of autophagosome markers LC3 and p62 in preneoplastic liver foci in high fat diet-fed rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Toxicol Sci	6. 最初と最後の頁 565-574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.44.565.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 江口あゆみ, 増田園子, 市川諒, 中村美紗都, 牧野絵美, 大塚亮一, 高橋尚史, 渋谷 淳, 吉田 敏則
2. 発表標題 ラット脂肪肝モデルを用いた抗原虫薬・抗菌薬Metronidazoleの肝発がん促作用におけるオートファジーの関与
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会（つくば）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田園子, 江口あゆみ, 中村美紗都, 岡田玲奈, 田中貴張, 中村和樹, 渋谷淳, 吉田敏則
2. 発表標題 ラットの脂肪肝発がんモデルにおけるクロロキンおよびアミオダロンによるオートファジーの関与の検討
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会（大阪）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江口あゆみ, 中村美紗都, 猪鼻真理, 村山宗理, 水上さやか, 牧野絵美, 大塚亮一, 林新茂, 渋谷淳, 吉田敏則
2. 発表標題 ラット脂肪肝モデルを用いた抗原虫薬metronidazoleの肝発がん促進作用
3. 学会等名 第44回日本毒性学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 増田園子、江口あゆみ、中村美紗都、岡田玲奈、田中貴張、中村和樹、渋谷淳、吉田敏則
2. 発表標題 ラットの脂肪肝モデルにおけるNOX阻害剤アポシニンによるオートファジーの関与の検討
3. 学会等名 第5回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川諒、中原惇太、増田湊介、中村和樹、伊藤優子、渋谷淳、吉田敏則
2. 発表標題 ストレプトゾトシンおよび高脂肪食を用いた糖尿病・脂肪肝関連初期発がんモデルラットの肝前がん病変におけるオートファジー関与の検討
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市川諒、中原惇太、増田湊介、中村和樹、伊藤優子、渋谷淳、吉田敏則
2. 発表標題 糖尿病・脂肪肝関連初期発がんモデルラットの肝前がん病変におけるオートファジー誘導剤カルバマゼピン投与の影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Ichikawa, Makoto Shibutani, Toshinori Yoshida
2. 発表標題 Expression of selective autophagy markers in preneoplastic liver foci in high fat diet-fed, streptozotocin-treated rats
3. 学会等名 Society of Toxicology 59th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ

<https://tat-lvp.amebaownd.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----