

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11692

研究課題名（和文）栄養性肝ミトコンドリア代謝破綻と自己炎症の解明、RNAメチル化修飾に注目して

研究課題名（英文）Elucidation of liver mitochondrial failure and autoinflammation with RNA-epigenetics caused by nutrient stress

研究代表者

高山 房子（TAKAYAMA, Fusako）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：10236367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：メタボリックシンドロームが根底の生活習慣病発症・増悪化に共通するエネルギー代謝の破綻と慢性炎症の誘発が、RNAメチル化修飾を介する可能性を、ヒトNASHリスクを上昇させる要因の再現飼養により発症させた脂肪性変性肝疾患（脂肪肝を呈する病態、NAFLD/NASH）モデルで実証した。エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列による遺伝情報は変化せず、遺伝子発現が制御される仕組みのことで、DNAやヒストンへの後天的な化学修飾が示されていた。本研究結果は、栄養ストレスによるRNAのメチル化修飾とALKBH発現の変化は栄養エネルギー代謝の破綻と慢性炎症を招く遺伝情報の翻訳変化をもたらす可能性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高脂肪と高糖含有食の摂取習慣（偏った食習慣）やカロリー過剰摂取習慣などの栄養ストレスとメタボリックシンドローム疾病の因果関係は広く受け入れられている。メタボリックシンドローム根底の生活習慣病発症・増悪化に共通するエネルギー代謝破綻と自己炎症に繋がるRNAメチル化修飾変化を、糖質・タンパク質・脂質の3大栄養素の代謝を担い手かつ栄養エネルギー代謝の司令塔臓器である肝臓の疾患NAFLD/NASH病態で明らかにできた本課題成果は学術的に新規性が高く、抗メタボリックシンドローム機能特性の新評価系の樹立や確たる治療薬のないNASH治療薬や技術の新提案に直結し、産業的かつ社会的に極めて有意義である。

研究成果の概要（英文）：Inadequate diets (high fat and high sugar diets, overeating habit) are well known as the nutrient stress to develop metabolic syndrome related diseases including NAFLD/NASH (excessive triglyceride accumulation in hepatocytes [ectopic fat morbidity]). Using NAFLD/NASH model [Japanese Patent No.5 1 0 9 1 3 4] rats, we exhibited for the first time that changes in 1) RNA methylation degree and 2) ALKBH expression, 3) inflammasome complex formation, in hepatocytes of rats. These results had high correlations with the mitochondrial metabolism failure, oxidative stress and the NAFLD/NASH severity. According to other advance studies with cell experiments, the RNA-epigenetics with 1) and 2) have abilities to reform inflammasome complex and mitochondria function. In summary, the RNA-epigenetics responded to the nutrient stress, could link to mitochondrial disorder and chronic inflammation, the common roots to exacerbate metabolic syndrome related diseases including NAFLD/NASH.

研究分野：健康機能解析

キーワード：NAFLD/NASH RNAメチル化 インフラマソーム エピジェネティクス 酸化ストレス 自己炎症 食習慣 ミトコンドリア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

高脂肪と高糖に偏った食習慣や過剰カロリー摂取習慣（栄養ストレス）とメタボリックシンドローム基盤疾病の発症増悪に介在する栄養エネルギー代謝破綻と慢性炎症のさらなる解明がメタボリックシンドローム基盤疾病リスク低減に必須である。肝臓は栄養代謝および生体構成分子合成の首座臓器であり、栄養ストレスに慢性的に曝されることで陥る肝の栄養エネルギー代謝決壊はメタボリックシンドローム基盤 (MS) 疾病と密接に関係することに疑う余地はない。私たちは、MS 肝疾患 NAFLD/NASH 病態モデル動物を用い、DNA 修飾やヒストン (DNA-EG) に着目した遺伝情報の後生的発現制御の変調、肝ミトコンドリア代謝低下、ミトコンドリア障害、インスリン抵抗性、異所性脂肪、鉄沈着や酸化ストレス亢進・慢性炎症の連関といった共通因子 [図1] の病態意義の解明および、予防・治療の開発研究を推進している [Takayama, F. et al. JCBN 2012 など]。その過程で、NASH における肝ミトコンドリア栄養エネルギー代謝障害・酸化ストレスと慢性炎症のクロストークが病態進展に重大な役割を持ち、極めて有効な予防・治療標的となることを突き止めていた。

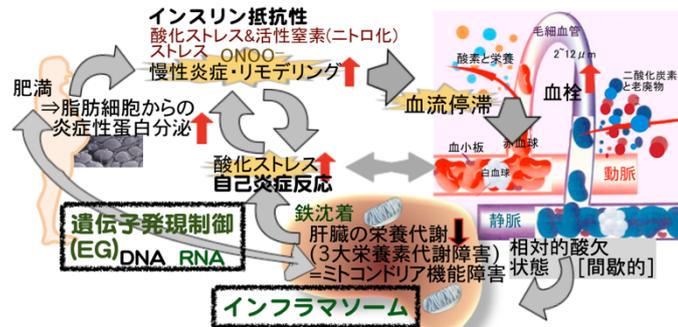


図1 メタボリックシンドローム・生活習慣病増悪の機序

そこで、肝ミトコンドリア栄養エネルギー代謝を低下させる DNA-EG が栄養ストレスによる病態で実証できている。DNA-EG に関して、これまでに多くの知見が蓄積されている一方、RNA 修飾エピジェネティクス (RNA-EG) に関しては、RNA メチル化修飾体の存在は知られていたものの、分解処理されると長く考えられていたため、解明が待たれるところであった。

他方、栄養ストレスのみならず MS 疾病を含む多くの慢性疾患の根底にある慢性炎症の機転として、NLRP3 インフラマソーム反応による自己炎症の重要性が注目されている。インフラマソーム活性の調節異常は無制御な炎症を引き起こし、このような自己炎症は NASH を含む MS 生活習慣病の増悪化修飾に共通する慢性炎症の誘発機序としても有力視した。

2. 研究の目的

MS 疾病リスクまで孕む栄養性肝代謝異常と慢性炎症について、栄養ストレス暴露で惹きされる、①RNA-EG と栄養代謝および生体構成分子合成の首座である肝臓のミトコンドリア代謝ストレスおよび②自己炎症反応の作動原理を解明する。この知見に基づき、抗メタボリックシンドローム疾病の新たな標的として、RNA-EG および肝ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I 障害に注目した制御機能特性の評価系の確立に向ける。具体的には、高脂肪・高糖に偏った栄養ストレスがもたらす栄養エネルギー代謝破綻に介在する RNA メチル化修飾制御ならびに自己炎症反応に関するインフラマソームについて肝実質細胞における存在の可能性を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) NAFLD/NASH 病態 [特許第 5 1 0 9 1 3 4] ラットを高脂肪・高糖含有食による飼養ならびに睡眠時無呼吸症候群を再現するストレス負荷により作製し、栄養性肝疾患における RNA-EG (メチル化修飾、ALKBH1 ファミリー分子発現検出による RNA メチル化修飾制御の評価) およびミトコンドリアの呼吸鎖の呼吸酵素複合体 I および II の変化と併せて解析する。栄養性肝疾患における、栄養代謝の破綻機構明らかにすることにより、エネルギー代謝の失調を誘導する RNA-EG を明らかにする。(2) 栄養性肝代謝ストレスおよび腸管上皮ストレス、肝ミトコンドリア傷害と自己炎症の慢性化の協調増悪化について、肝実質細胞インフラマソーム活性化、肝内および肝外因子を解明する。

4. 研究成果

①栄養性肝疾患 NAFLD/NASH における①RNA-EG と栄養代謝および生体構成分子合成の首座臓器 肝臓のミトコンドリア代謝ストレス

・RNA 修飾体 N6-methyladenosine (m6A) 発生頻度：複数のメチル化修飾体のうち、N6-メチルアデニン (m6A) の制御分子機構や生物学的意義が示され [Liu N. et al. Nature 2015]、RNA メチル化修飾/RNA-EG と生体制御機構や疾病との関係の解明が注目されつつある。加えて、RNA メチル修飾体のうち、最多の m6A については、栄養などの変化で m6A 度合い変化が示されており、メチル化によりタンパク質の翻訳変化が示唆されている [図 2]。

肝組織中 m6A 含有率は Control 群と比較して、肝組織に脂肪性変性は認められるものの炎症像

が弱い病態 (NAFLD、研究成果の項における NAFLD 表記はこの病態グレードを意味する) では減少し、NASH においては有意に増加していた。私たちは先行研究により、m6A 発生頻度に影響する α -ケトグルタル酸 (肝トランスアミナーゼ逸脱から推測) と鉄の肝組織中含量変化を捉えていた。m6A 部位に結合し mRNA 安定化に機能するタンパクが、脂肪酸合成関与転写因子の mRNA の m6A 部位にも同様に働くことが明らかにされており、余剰カロリーを脂肪としての体内貯蔵にシフトさせ、病的には異所性脂肪病態さらには慢性炎症を招く RNA-EG 変調にも繋がることを仮定し進めた本課題の成果により、栄養ストレス暴露による肝脂肪性変性の機転も明らかにできた。

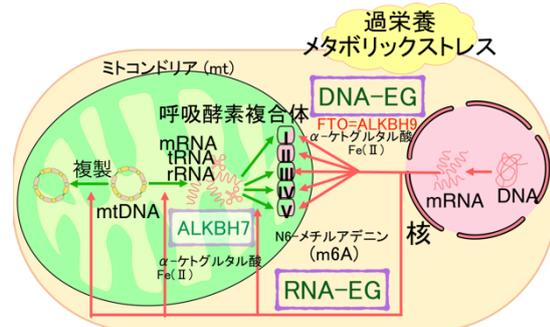


図2 ミトコンドリア呼吸機能2重支配と過栄養メタボリックストレスによるエピジェネティクス (EG)

・ALKBH ファミリー分子： m6A は主に mRNA に存在するが、tRNA、rRNA、snRNA などの非コード RNA にも存在している。mRNA 転写物中の m6A の相対的存在量は、スプライシング、核外輸送、翻訳能力および安定性および RNA 転写などの RNA 代謝プロセスに影響を及ぼすことが明らかにされていた。そのため、m6A-RNA の脱メチル化酵素の変調による m6A メチル化レベル異常により、RNA の機能不全をもたらす疾患を引き起こす可能性を想定し、メチル化 mRNA の脱メチル化酵素である ALKBH ファミリー分子の発現変化の解析を進めた。肝核および肝ミクロソームにおける発現は Control 群と比較して、NAFLD および NASH においては有意に減少していた。この m6A-RNA の脱メチル化酵素の発現低下は、Wnt 阻害因子-1 (WIF-1、Wnt/ β -カテニン経路という組織の線維化や炎症と関連のある経路の活性化を抑制する因子) を低下させることが報告されている。この抑制因子低下により、Wnt/ β -カテニンの活性化により、Fibronectin や Fsp-1 (Fibroblast specific protein 1) といった線維化と関連のあるタンパクの発現が上昇し、線維化が亢進する。特に NASH 病態において組織の線維化は肝硬変や肝がんへの易進展性で深刻な問題であり、肝細胞機能の回復や病態進展予防のためにも線維化のメカニズム解明は課題であった。今回の成果により、NAFLD/NASH 病態進展における線維化増悪化メカニズムの一部が新たに解明できたと考える。

ミトコンドリアシグナルを有する ALKBH ファミリー分子ノックアウトマウスでは体重や体脂肪量の増加が報告されている。また、プログラムされたネクローシスにおいても重要な役割が認められている。そこで、この分子のミトコンドリアにおける発現解析を進めた結果、Control 群と比較して、NAFLD 群および NASH 群において有意に ($p < 0.01$) 発現低下していた。発現低下により脂質代謝の破綻を来す。それにより脂肪量が増加し、さらなる病態進展に繋がるという負のサイクルが形成される。

・肝ミトコンドリア呼吸鎖の呼吸酵素複合体およびエネルギー代謝派生の活性酸素・フリーラジカル (ROS) 量: 肝ミトコンドリア電子伝達系 Complex I 活性は Control 群と比較して、NAFLD 群および NASH 群で有意に ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 低下していた。Complex II 活性も Control 群と比較して NAFLD 群および NASH 群で有意に ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 低下していた。呼吸鎖の基質を添加して肝ミトコンドリアのエネルギー代謝から派生する ROS 量を評価したところ、Control 群と比較して、NAFLD 群および NASH 群において ROS 派生量が有意に ($p < 0.01$) 増大した。

NAFLD 群における m6A 発生頻度の変化を除けば、m6A、ALKBH ファミリー分子発現および肝ミトコンドリア機能障害の程度の関係には協調性が認められた。

⑧自己炎症反応の作動原理

インフラマソームと代謝制御との関連について、図3の機転の重要性が示唆されているが、これまでの報告はマクロファージを用いた実験系によるものである。ミトコンドリアとインフラマソーム活性化については、酸化ミトコンドリア DNA [Shimada, K. et al. Immunity. 2012] およびミトコンドリア DNA 新生により起こることが示されている [Zhong, Z. et al. Nature 2018]。

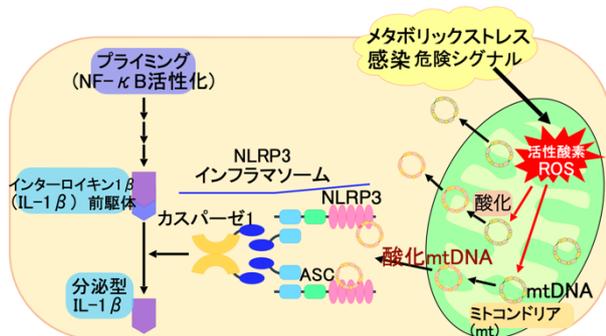


図3 栄養ストレスで惹起されるミトコンドリア誘発インフラマソーム

マクロファージにおいて、NLRP3 インフラマソームの構成因子である NLRP3 と ASC は小胞体とミトコンドリアの膜上に局在することが示された [図3]。栄養ストレスも付加して作製した NASH 肝実質細胞における NLRP3 インフラマソーム発現の証明はなされていないが、その可能性は高いと考えた。

複数の種類のインフラマソーム複合体が同定されているが、NAFLD/NASH やミトコンドリア障害の観点から、私たちは、NLRP3、NLRP1 および Absent in melanoma 2 (AIM2) に着

目し、肝臓および腸管における形成発現の可能性について解析した。

・NLRP3 複合体形成活性化について Control と比較し、NAFLD/NASH 群は肝組織と腸管での形成は逆の変動を示した。なお、NLRP3 は NLR の一つであり、刺激因子を認識すると、構造変化を起こして ASC や pro-Caspase-1 とインフラマソーム複合体を形成する。インフラマソーム形成後、pro-Caspase-1 を活性化し、IL-1 β や IL-18 などの重要な炎症性サイトカインの酵素的成熟を活性化する。

・NLRP1 発現亢進と RNA メチル化酵素の過剰発現 (m6A が増加) との正の相関が報告されていた。NAFLD/NASH 発症・進展に NLRP1 インフラマソーム複合体による自己炎症反応が介在する可能性を予測したが、NLRP1 発現量は Control 群と比較して CDHF 群、NASH 群において有意に ($p<0.05$) 低下した。

・AIM2 形成発現量は Control 群と比較して、NAFLD 群および NASH 群では有意に ($p<0.05$, $p<0.01$) 減少した。AIM2 は、2 本鎖 DNA を認識するパターン認識受容体であり、核内の自己 DNA や mtDNA 断片を認識し、インフラマソーム複合体を形成する。そのため、NAFLD/NASH 病態で惹起された酸化ストレスによる細胞障害により、自己 DNA 断片が AIM2 に認識されることでインフラマソーム複合体を介した自己炎症惹起に繋がると考えた。しかし、予測に反して NAFLD 病態および NASH 病態のいずれでも、AIM2 インフラマソーム複合体中構成分子発現量は有意に ($p<0.05$, $p<0.01$) 低下していることを明らかにした。NAFLD~NASH 病態における AIM2 インフラマソーム複合体構成分子の発現低下との関連において、インターフェロン誘導性タンパク p202 の介入による影響を考えた。p202 は、単球浸潤や脂肪生成を介して肥満やインスリン抵抗性の惹起を引き起こすとされている。AIM2 はインフラマソーム複合体形成時に 2 本鎖 DNA との結合を必要とするが、p202 は AIM2 と 2 本鎖 DNA との結合を阻害し、AIM2 インフラマソーム複合体の形成を阻害するという報告がある。NAFLD/NASH 病態を慢性炎症が増悪化修飾することから、インターフェロン増加により p202 の発現が亢進することが予測される。本研究では NAFLD/NASH において AIM2 インフラマソーム複合体は発現低下していたが、このように正常対照より発現が低いことは形成不全とも捉えられる。AIM2 インフラマソーム複合体形成不全は正常な免疫応答の機能不全に繋がり、組織全体としての恒常性維持において不利になり、燻り続ける炎症 (慢性炎症) 要因となることを考えている。

以上、栄養ストレスによる NAFLD/NASH におけるインフラマソーム複合体形成の結果であるが、先行研究で実証されていたインフラマソーム反応はマクロファージなどの間質細胞における結果であった。本成果によるインフラマソーム複合体の存在は肝臓および腸管組織における初めての実証で栄養ストレス下での変動である。

肝発現型メタボリックシンドローム疾患 NAFLD/NASH 病態ラット肝組織における、トランスアミナーゼ活性、 α -ケトグルタル酸や鉄の量的変化を明らかにした。これらが補助基質と補因子になる ALKBH ファミリー分子や m6A の量的変化から、栄養ストレスが RNA メチル化修飾/RNA エピジェネティクス変調を誘発することを明らかにした。本研究成果による栄養ストレスによる ALKBH ファミリー分子変化は、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の変化、インフラマソーム構成蛋白発現およびインフラマソーム複合体形成の変化に繋がり、NAFLD/NASH 病態における、肝ミトコンドリア栄養エネルギー代謝破綻や肝ミトコンドリアエネルギー代謝障害や自己炎症を惹起する介在機転となろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	合葉 哲也 (AIBA Tetsuya) (00231754)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	古田 和幸 (FURUTA Kazuyuki) (50644936)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	
研究分担者	檜垣 和孝 (HIGAKI Kazutaka) (60284080)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関