

機関番号： 32620

研究種目： 基盤研究 C

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20590797

研究課題名（和文） 肝病態におけるオートファジー役割の解明

研究課題名（英文） Role of autophagy in liver diseases

研究代表者

山科俊平 (YAMASHINA SHUNHEI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号： 30338412

研究成果の概要（和文）：

## ① オートファジーと肝細胞死

肝特異的オートファジー欠損マウスを用いた肝虚血再還流モデル、アセトアミノフェン肝障害モデル、肝部分切除後再生モデルの検討によりオートファジーが肝保護的に作用すること、肝再生においても重要な役割を果たすことが明らかとなった。以上より様々な肝病態においてオートファジーは重要な役割を果たしているものと考えられ、オートファジーを標的とした新規治療法開発は肝疾患治療において有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that autophagy-deficiency enhances liver injury after ischemia-reperfusion or acetaminophen treatment, moreover, loss of autophagy blunts regeneration of the liver after partial hepatectomy. These findings indicate that autophagy plays a pivotal role on maintaining liver homeostasis in various liver diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学 消化器内科学

キーワード： (1) オートファジー (2) 肝障害 (3) 肝再生 (4) 細胞死 (5) 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の新陳代謝や飢餓における栄養源確保に対し細胞内蛋白分解機構としてオートファジーは重要な役割を果たすことが知られているが、近年の研究により細胞内免疫・発癌・細胞死などさまざまな病態にも関与している事が注目されている。例えば C 型肝炎ウイルス

(HCV)複製にオートファジーが関与し、オートファジーの蛋白分解を抑制すると HCV 複製が抑制されるがわかっている。また一方では、脂質代謝にもオートファジーが関与することが示唆されてきている。またオートファジーはクローン病発症とも関連していると考えられており、自然免疫におけるオートファ

ジーの役割も注目されてきている。オートファジー遺伝子 Atg7 肝特異的ノックアウトマウスを用いた肝疾患モデル作成と解析は肝病態におけるオートファジーの役割の解明に非常に有用であると考えられ、本研究を構想した。

## 2. 研究の目的

オートファジーが以下のようなさまざまな肝病態にどのように関与するのかを明らかとし、その機序を解明する。

(1) 肝虚血再還流モデルにおいてオートファジー欠損が肝障害にどのような影響を与えるのか、またその機序について明らかにする。

(2) 薬物性肝障害モデル (アセトアミノフェン投与) における肝細胞死・ミトコンドリア障害にオートファジーが関与するのかについて明らかにする。またオートファジー抑制に伴って異常ミトコンドリアの蓄積や酸化ストレスの変化が生じるかどうかを明らかとする。

### (3) 肝部分切除後肝再生モデル

肝再生におけるオートファジーの役割を明らかとする。

## 3. 研究の方法

### (1) オートファジー欠損マウスを用いた肝虚血再還流モデルの解析。

肝特異的オートファジー欠損マウスと Wild type マウスを使用し、開腹手術後に門脈左分枝を 30 分間クランプし、その後解除する。クランプ解除後経時的に血清や肝組織をサンプリングし、血清 GPT 測定や肝組織 HE 染色標本観察にて肝障害を評価した。また肝細胞アポトーシスを肝組織 TUNEL 染色とウエスタンブロット法によりカスパーゼ 3, 7 活性化を評価した。また炎症性サイト

カイン TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  産生をリアルタイム RTPCR にて評価した。

### (2) アセトアミノフェン肝障害モデル

肝特異的オートファジー欠損マウスとコントロールマウスにアセトアミノフェンを腹腔内投与し肝組織を血清 ALT 測定と肝組織 HE 染色にて評価した。また肝細胞内オートファゴソーム発現を調べるために電子顕微鏡観察と LC3 発現をウエスタンブロット法にて評価した。さらにそれぞれのマウスから肝細胞を単離し、アセトアミノフェンを添加し ROS 産生やミトコンドリア膜電位異常を H<sub>2</sub>DCFDA や JC-1 色素を使用し共焦点蛍光顕微鏡観察にて評価した。また肝細胞質の cytochrome C 発現やカスパーゼ 3, 7, JNK 活性化をウエスタンブロット法にて評価した。さらに肝細胞アポトーシスとネクロトーシスを蛍光色素ラベリング AnnexinV 抗体と propidium iodide を用いたフローサイトメトリーにて評価した。

### (3) 肝再生モデル

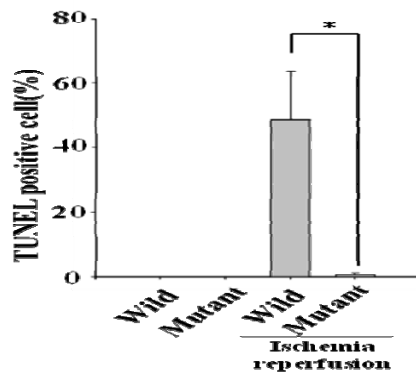
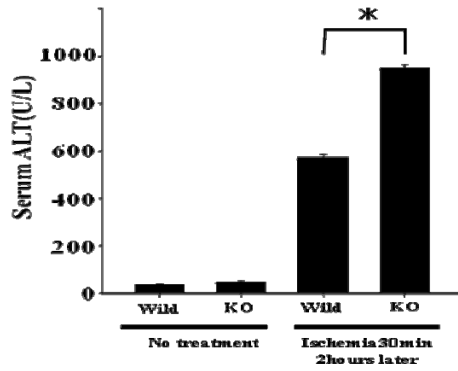
肝特異的オートファジー欠損マウスとコントロールマウスで 70% 肝部分切除を行い、経時的に肝組織をサンプリングし肝組織 BrdU 染色や肝 LC3, cyclinD 発現をウエスタンブロット法によって定量した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝虚血再還流モデルの解析

コントロールマウスでは、虚血再還流 2 時間後に肝障害がピークとなり、肝細胞の細胞質内にオートファジーが強く誘導された。

一方、オートファジー欠損マウスでは、虚血再還流による肝障害がコントロールと比較し増悪していた。

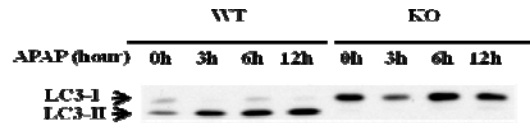


コントロールマウスでは虚血再還流後、肝組織内に TUNEL 陽性細胞が出現し、カスパーゼ 3 の活性化が認められたが、オートファジー欠損マウスでは TUNEL 陽性細胞の増加とカスパーゼ 3 の活性化がコントロールマウスと比較し有意に増加していた。以上のことから虚血再還流によって誘導されるオートファジーは肝細胞死を抑制し肝保護的に作用するものと考えられた。炎症性サイトカインの評価では、コントロールマウスと比較し、オートファジー欠損マウスでは虚血再還流 2 時間後の肝組織中 TNF $\alpha$  と IL-1 $\beta$  mRNA 発現が強く誘導されていた。以上よりオートファジーは虚血再還流による肝障害に臓器保護的に作用していると考えられた。この背景には免疫細胞活性化の制御も関与している可能性が示唆された。

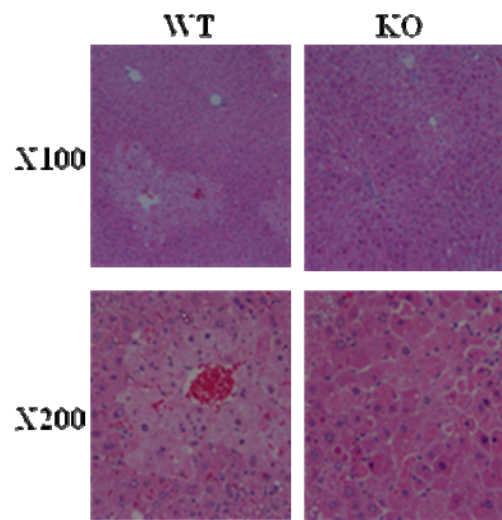
## (2) アセトアミノフェン肝障害モデル

コントロールマウス (*Atg7<sup>F/F</sup>*) では、アセトアミノフェン投与により電子顕微鏡観察下

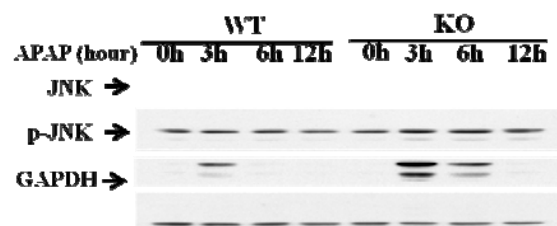
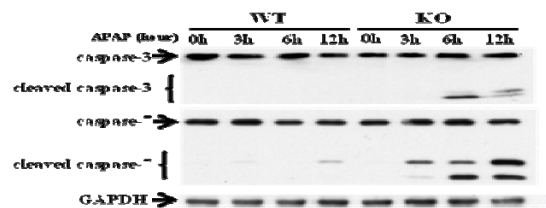
では肝細胞質内にオートファゴソーム増加が認められ肝組織中 LC3-II 蛋白発現の増加が確認された。



オートファジー欠損によりアセトアミノフェン投与後の血清中 ALT 濃度増加や肝細胞のアポトーシスとネクローシスがともに増加した。

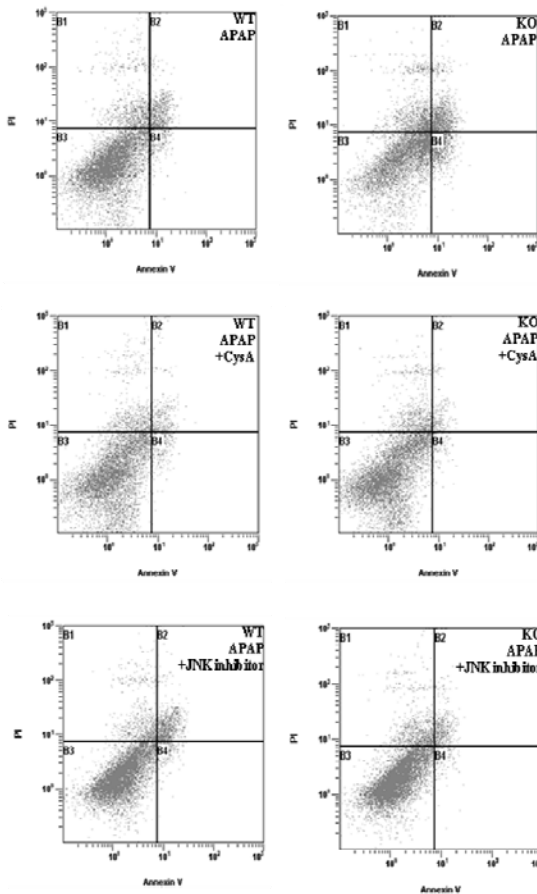


さらにオートファジー欠損によってアセトアミノフェン投与後の肝組織中 JNK 活性化、Caspase3 活性化と肝細胞質中 cytochrome c 発現が有意に増加した。



単離肝細胞を用いた in vitro 実験でもオートファジー欠損によりアセトアミノフェン添

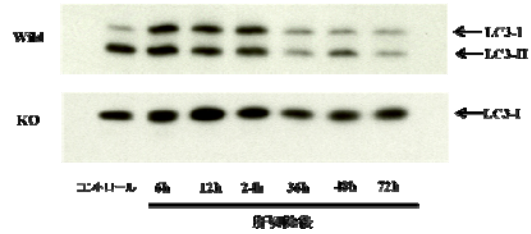
加後の肝細胞死は増加し ROS 産生も確認された。一方、JNK inhibitor や ROS inhibitor により細胞死は抑制された。



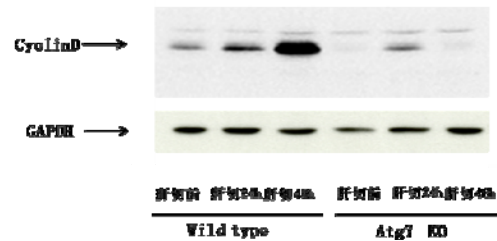
以上の結果からアセトアミノフェン投与後に誘導されるオートファジーは ROS 産生や JNK 活性化を抑制し細胞保護的に作用しているものと推測された。薬物性肝障害は近年増加してきている肝障害の一つであるが、発症機序について複雑で詳細は不明なままである。特に脂肪肝では薬剤による肝障害のリスクが増加することが報告されており、脂肪滴蓄積はオートファジー機能を障害することより、臨床的に確認されている事象がオートファジー機能障害と密接に関連しているものと推測される。本研究の結果も加味すると薬物性肝障害発症にオートファジーは重要な役割を果たしているものと強く想定され、臨床において治療的ターゲットとして有望であるものと考えられる。

### (3)肝再生モデル

コントロールマウスでは 70%部分肝切除 12 時間後に肝細胞質内にオートファジーが強く誘導され、LC3 発現も増加した。一方、肝細胞増殖の評価に関しては 24 時間後に肝細胞の約 10%が BrdU 染色陽性となった。



しかしオートファジー欠損マウスでは肝切除 24 時間後の BrdU 染色陽性細胞数はコントロールの約 1/10 に減少した。肝切除 48 時間後に cyclinD 発現はコントロールマウスでは約 6 倍に増加したが、オートファジー欠損マウスでは増加しなかった。



以上のことからオートファジーは肝切除後の肝細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられた。

(総括)

これらの検討より、肝虚血や薬物性肝障害における肝障害抑制と肝再生においてオートファジーは重要な役割を果たしていることがわかった。胆汁うっ滞性の病変や肥満や飲酒を背景とした脂肪肝があるとオートファジー機能が障害されることが報告されており、これらの疾患背景がある患者では肝移植や薬物投与により肝不全が惹起されることが臨床的に明らかとなっている。このような病態の詳細な機序については詳細は不明であるがオートファジー機能障害が関与して

いるのかもしれない。オートファジーを標的とした新規治療開発はさまざまな肝病態改善に対し有用である可能性が示唆された。

高島 基樹 (TAKASHIMA MOTOKI)  
順天堂大学・医学部・非常勤助教  
研究者番号：59465034

## 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)

[学会発表] (計 9 件)

山科俊平、肝部分切除後の肝再生におけるオートファジーの役割、第 50 回日本消化器病学会大会、2008 年 10 月 1 日  
山科俊平、肝部分切除後の肝再生におけるオートファジーの役割、浜名湖シンポジウム、2008 年 12 月 25 日  
稲見義宏、Lipid accumulation inhibits induction of autophagy in the mouse liver、米国肝臓学会、2009 年 11 月 3 日  
井草祐樹、Loss of Autophagy Enhances Acetaminophen-Induced Liver Injury、米国消化器病学会週間、2010 年 5 月 4 日  
稲見義宏、肥満モデルにおけるオートファジーを介した蛋白分解機能の変化、第 46 回日本肝臓学会総会、2010 年 5 月 28 日  
井草祐樹、アセトアミノフェン投与後肝障害におけるオートファジーの役割の検討、第 14 回日本肝臓学会大会、2010 年 10 月 14 日  
稲見義宏、肝細胞内脂肪滴によるオートファジー機能障害と酸化ストレス、第 14 回日本肝臓学会大会、2010 年 10 月 14 日  
深田浩大、Loss of autophagy enhances the sensitization of Kupffer cells to endotoxin、米国肝臓学会、2010 年 11 月 3 日  
井草祐樹、Loss of Autophagy-Enhanced Acetaminophen Hepatotoxicity is Mediated by JNK Activation、米国消化器病学会週間、2011 年 5 月 10 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

上野 隆 (UENO TAKASHI)  
順天堂大学・医学部・先任准教授  
研究者番号：10053373

池嶋 健一 (IKEJIMA KENICHI)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号：20317382