

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590989

研究課題名(和文) 生体内オートファジー機能評価のための新規バイオマーカー開発

研究課題名(英文) Novel biomarker for evaluation of autophagic dysfunction in the liver

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジー機能抑制によって核膜に蓄積する16種類の蛋白が同定され、オートファジー機能を評価するマーカーとして使用できる可能性が示唆された。臨床検体を用いた検討ではオートファジーによって代謝されるp62の肝細胞内蓄積がNAFLDで高度に認められた。同様にNAFLDではリソソーム蛋白分解酵素カテプシンB,D,L発現低下も観察されたことからカテプシン発現低下による蛋白分解低下がp62蛋白蓄積に関与している可能性が示唆された。病理学的肝炎症度や肝障害がp62蓄積と相関することから肝組織のp62免疫染色はNAFLDから肝発癌や肝硬変に移行する病態であるNASHの診断にも有効であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We found that autophagic dysfunction alters the expression of nuclear membrane protein. Nuclear membrane proteins increased in autophagic dysfunction might be an useful biomarker to evaluate autophagic dysfunction. On the other hand, aggregation of p62 in hepatocytes was detected in about 65% of NAFLD correlatively to suppression of cathepsin B, D and L expression. In NAFLD patients, p62 aggregation was correlated with serum alanine aminotransferase value and inflammatory activity by NAS. These findings indicate that the suppression of autophagic proteolysis by hepatic steatosis is involved in the pathogenesis of NAFLD.

研究分野：消化器内科肝臓病学

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：オートファジー バイオマーカー 核膜蛋白 肝疾患

1. 研究開始当初の背景

細胞内代謝や飢餓時の栄養供給においてオートファジーは重要な細胞内蛋白分解機構であるが、自然免疫・発癌・細胞死などにも関与する事が最近注目されている (*Simmons et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2010.*)。オートファジー機能が抑制されると細胞内への変性蛋白蓄積を誘導し細胞内封入体を形成する (*Komatsu et al. J Cell Biol. 2005; 169:425-434.*)。細胞内封入体は臨床的にはアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、肝癌において Mallory-Denk body として観察されることからこれらの疾病発症進展にオートファジー機能異常が大きく寄与すると考えられている。我々は、マウス肥満モデルにおいて肝細胞内に蓄積した脂肪滴が mTOR 活性化を生じ、Beclin1 発現が抑制され飢餓によるオートファジー誘導が抑制される オートファジー蛋白分解能も障害されマーキングしたオートファゴソームが長期肝細胞質内に残留することを証明した。細胞内に脂肪滴が出現する病態 (脂肪肝、アルコール性肝炎、C 型肝炎) では、オートファジー機能障害が生じ、異常なミトコンドリアや小胞体が蓄積し、酸化ストレス増加を介して肝障害や肝発癌を起こすものと推測される。しかし日常臨床において細胞内ストレスやオートファジー機能異常を的確に評価するマーカーは乏しく、慢性肝炎症例において肝癌や肝硬変へ移行する症例の見極めに苦慮することが多い。そこで我々は、オートファジー機能障害を評価するために腫瘍マーカースクリーニングで用いられる核膜蛋白解析に着目した。核膜構成蛋白の変性、量的変化は細胞増殖や核内シグナル伝達に影響を与え発癌に関与すると考えられている。また細胞死において核膜蛋白の非可溶成分が血中に放出されることから非可溶性核膜蛋白は血中でも溶解することなく安定しており検出されやすいことから新規腫瘍マーカーとして有望視されている。我々はオートファジーが核膜蛋白変性にも関与すると仮説をたてオートファジー欠損によって変化する核膜蛋白を明らかにすることとした。

近年、生活習慣病の増加に伴って非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) が増えてきている。NAFLD の一部は炎症や線維化を伴い肝硬変や肝癌に移行する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) という病態に移行する。NASH への移行にはインスリン抵抗性が関与することはわかっているが NAFLD のうちの症例が NASH に移行するのには臨床的に判別が困難である。上記のとおり今までの検討によって高度の肝脂肪化はオートファジー機能障害を誘導することからオートファジー機能障害による酸化ストレス誘導やインスリン抵抗性が NASH 移行の背景にあるものと推測した。ユビキチン結合タンパク質 p62/Sqstm1 は TRAF6, ERK, aPKC などのシグナル伝達を担

う多彩な分子群と相互作用するスカフォールドタンパク質であるが、オートファゴソーム膜に結合する LC3 と直接結合しオートファジーにより選択的に分解されることが明らかとなった。オートファジー機能障害が生じると p62 が細胞内に蓄積し、過剰に蓄積すると封入体を形成することがわかっている。またオートファジー機能異常による p62 蛋白蓄積は細胞の増殖性を惹起し肝細胞を腫瘍化させる (*Inami et al. J Cell Biol. 2011.*)。そこで NAFLD における p62 発現解析は NASH 移行症例を判別する上で有効ではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、オートファジー抑制によって発現が変化する核膜蛋白を明らかにする。また脂肪性肝炎モデルマウスからの肝臓からも核膜蛋白を抽出し、オートファジー欠損によって誘導される蛋白がこれら疾患モデルでも同様に増加するのかを検討し、上記蛋白のうち病的疾患と関連性の高い核膜蛋白を選定する。

また肝組織や血清などの臨床検体を用い、肝疾患によって変化するオートファジー関連蛋白カテプシンや p62/Sqstm1 を検出し、病態との相関を検証し、臨床的有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

1) オートファジー欠損によって発現が変化する核膜蛋白の同定。

肝特異的オートファジー欠損マウス (Atg7^{F/F}:MX1-Cre マウス) とコントロールマウスより核膜蛋白を抽出し 2 次元電気泳動を行い、オートファジー欠損によって発現の変化する核膜蛋白を決定する。オートファジー欠損によって発現変化する核膜蛋白のうち特異的蛋白をより選択すべく肝特異的オートファジー欠損マウス以外のオートファジー機能障害が生じていると考えられている脂肪性肝疾患モデルマウスにおいても同様に核膜蛋白解析を行い疾患発症と関連性の高いオートファジー関連核膜蛋白質を選定する。

2) 臨床検体を用いた慢性肝疾患の病態と相関するオートファジー関連蛋白の同定

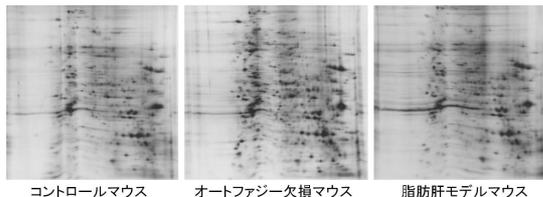
NAFLD、B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、原発性胆汁性肝硬変などの患者からの肝生検組織における p62、カテプシン B, D, L、発現を免疫組織染色によって評価する。さらに肝組織の電子顕微鏡観察を行い肝細胞内のオートファゴソーム数をカウントし、各疾患におけるオートファジー誘導とオートファジー蛋白分解能機能の評価する。さらにオートファジー機能が障害されていると考えられている NAFLD 症例ではこれらのオートファジー関連蛋白発現と臨床病態との関連について検討を行い、肝炎症や肝線維化、肝機能などとの

相関を統計学的に解析する。以上の検討より臨床応用可能な蛋白の選定を行う。

4. 研究成果

核膜蛋白解析と発現蛋白シークエンサーによる発現蛋白同定

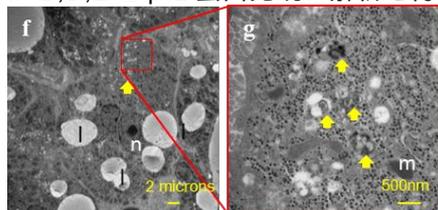
肝特異的オートファジー欠損マウス (Atg7^{F/F}:MX1-Cre マウス) とコントロールマウスより核膜蛋白を抽出し 2 次元電気泳動を行った。**オートファジー欠損によって発現の変化する核膜蛋白として 26 個の候補蛋白を抽出した** (下図参照)。



蛋白シークエンサーによる蛋白解析で SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member 5 (SMARCA5) や prohibitin-2 を始めとするいくつかの蛋白が同定された。オートファジー欠損によって発現変化する核膜蛋白は数が多いため、オートファジー機能が低下している脂肪性肝疾患モデルマウスとして KKAy マウスの肝臓とコントロールマウス肝臓の核膜蛋白変化を検出し比較検討した。肝脂肪化によって核膜蛋白の変化が同様に検出された。**オートファジー欠損マウス肝と脂肪肝モデルマウス肝の両方で発現が変化する核膜蛋白の中で発現が亢進する蛋白群として 16 種類の候補蛋白が抽出された。**現在、すべての蛋白に対する抗体を作成し肝特異的オートファジー欠損マウスや脂肪性肝疾患モデルマウスの肝組織を用い、免疫二重染色を行い実際に核膜に沈着する蛋白かどうかを検証している。今後、これらの疾患モデルの血清中にこれらの蛋白が検出されるかを調べる予定である。

臨床検体を用いたオートファジー機能障害と臨床疾患の解析

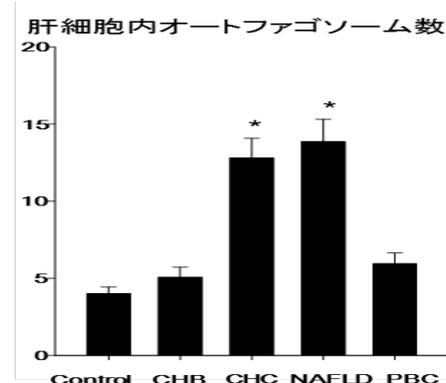
非アルコール性脂肪性肝疾患、B 型肝炎、C 型肝炎、原発性胆汁性肝硬変患者の肝生検組織のオートファジー機能障害を調べるために電子顕微鏡観察によるオートファジー発現評価とリソソーム蛋白分解酵素カテプシン B, D, L と p62 蛋白発現の解析を行った。



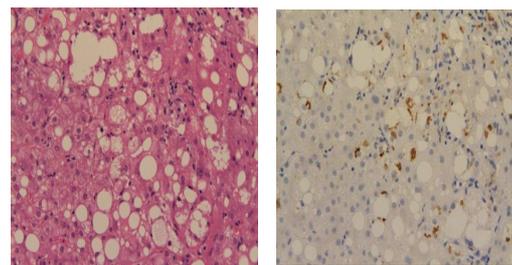
NAFLD

NAFLD 肝組織の電子顕微鏡解析では、肝細胞

内に脂肪滴とともに細胞内構造物を内包したオートリソソームが多く観察された (前写真参照)。他の肝疾患でも同様の解析を行ったところ、以下のグラフのような結果となった (下図参照)。

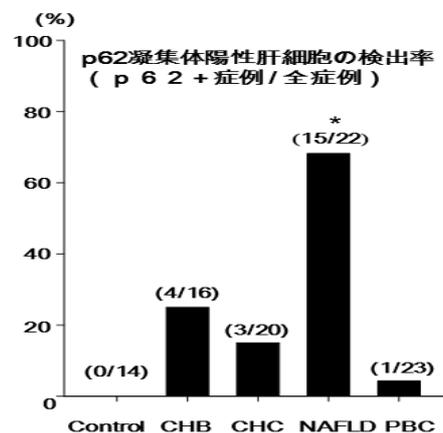


オートファジー小体数は C 型肝炎 (CHC) と NAFLD では B 型肝炎 (CHB) や原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の 2 倍以上に増加していた。コントロールは慢性肝疾患のない肝切除術後の肝組織を用いた検体であるが B 型肝炎や原発性胆汁性肝硬変はコントロールと有意差がなかった。肥満モデルマウスを用いた検討では**高度脂肪肝ではオートファジー小体が増加しているにもかかわらずオートファジー機能が低下し p62 蓄積が生じる**という結果であった。人の NAFLD でも同様の現象が起きているかを検証するために肝組織切片の p62 免疫組織染色を行った (下写真参照)。



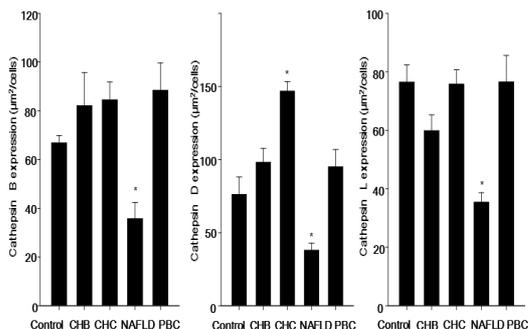
NAFLD 肝組織の HE 染色

p62 免疫染色

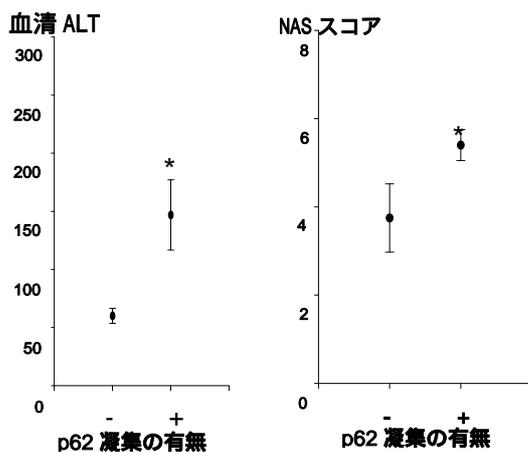


NAFLD では症例の約 65% に肝細胞内 p62 凝集体が観察されるのに対し、B 型肝炎では約 22%、C 型肝炎では約 15%、原発性胆汁性肝硬変では 5% に認められる程度であった (上グラフ

参照) 以上のことから C 型肝炎ではレプリコン細胞を用いた今までの報告の通りオートファジー機能は抑制されていないものと考えられた。一方、NAFLD では肥満モデルマウスと同様にオートファジー小体が蓄積しているにもかかわらずオートファジー機能が低下していることがわかった。次に肥満モデルマウスと同様にリソソーム蛋白分解酵素発現低下が生じている可能性を考慮し肝組織切片のカテプシン B, D, L 免疫組織染色を行った (下グラフ参照)。



カテプシン B、D、L 発現はコントロールと比較し NAFLD で有意な低下を認めたのに対し B 型肝炎や原発性胆汁性肝硬変ではコントロール群と差がなく、C 型肝炎では、カテプシン D のみ発現が増加し、カテプシン B, L はコントロール群と差がなかった。NAFLD ではオートファジー機能障害とカテプシン発現低下の両方が観察されたことから動物モデル結果と同様に肝脂肪蓄積による蛋白分解酵素発現低下がオートリソソーム膜分解を阻害しオートリソソームの細胞内残留を惹起したものと推測された。



次に NAFLD 症例において p62 蛋白蓄積が病態にどのように関わっているかを明らかにするために p62 蓄積群と非蓄積群に分けて血液検査データと肝炎症・線維化・NASH スコアリングシステムとの相関を検討した。p62 蛋白蓄積は血清脂質 (コレステロール・中性脂肪) 肝線維化マーカー、肝組織切片観察による線維化スコアとは相関を認めなかった。しかし p62 凝集陽性群は非陽性群と比べ血清 AST, ALT が有意に増加しており非アル

コール性脂肪性肝炎 NASH のスコアリングシステムである NAS スコアのうち肝炎症の病理分類と関連していた (前グラフ参照)。また免疫組織染色観察では NAFLD における p62 蓄積肝細胞は炎症細胞浸潤近傍で認められる傾向にあったことから p62 蛋白蓄積は NASH の特徴である肝炎症と強く関連している可能性が示唆された。

p62 蛋白蓄積は Nrf2 蛋白の核内移行を惹起し肝発癌を誘導することが報告されており、前述のとおり肝炎症とも相関することから NAFLD におけるオートファジー機能不全は NASH や肝発癌への進展に寄与している可能性があると考えられた。

以上のことから **肝組織の p62 免疫染色は NAFLD から肝発癌や肝硬変に移行する病態である NASH の診断に有効**と思われた。

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)

Abnormality of autophagic function and cathepsin expression in the liver from patients with non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2013 Dec 2. doi: 10.1111/hepr.12282. Fukuo Y, Yamashina S, Sonoue H, Arakawa A, Nakadera E, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S.

[学会発表](計2件)

NAFLD 患者における肝カテプシン L 発現とオートファジー機能の評価 福生 有華, 山科俊平, 泉 光輔, 稲見 義宏, 山形 寿文, 今一義, 鈴木 聡子, 池嶋 健一, 渡辺 純夫 肝臓(0451-4203)53 巻 Suppl.3 PageA929(2012.10)

非アルコール性脂肪性肝疾患患者におけるオートファジー機能障害とカテプシン発現異常 福生 有華, 山科 俊平, 泉 光輔, 園上 浩司, 荒川 敦, 青山 友則, 内山 明, 今一義, 鈴木 聡子, 池嶋 健一, 渡辺 純夫 肝臓 (0451-4203)54 巻 Suppl.1 PageA146(2013.04)

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・医学研究科・教授
研究者番号: 10053373

池嶋 健一 (IKEJIMA, Kenichi)
順天堂大学・消化器内科・准教授
研究者番号：20317382