

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591000

研究課題名(和文) 蛋白・脂質代謝異常による小胞体ストレスを伴う肝細胞障害でのオートファジーの役割

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

研究代表者

原田 大 (HARADA, Masaru)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：00241175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いてプロテアソーム阻害時と遊離脂肪酸負荷時の小胞体ストレス、異常蛋白蓄積ならびにオートファジーの状態を検討した。どちらのストレスの状態でも小胞体ストレスがかかり、オートファジーが亢進していた。

ヒトの肝生検組織の検討ではC型慢性肝炎(CHC)と非アルコール性脂肪肝炎(NAFLD)においてケラチン8の発現が亢進し、Mallory-Denk体(MDB)が形成されたがB型慢性肝炎では見られなかった。またMDBは細胞において酸化ストレスを軽減しており、オートファジーの亢進は肝障害を軽減した。

研究成果の概要(英文)：We investigated endoplasmic reticulum (ER) stress in hepatoma cells, and the relations between oxidative stress, autophagy and Mallory-Denk body (MDB) formation in patients with chronic hepatitis B (CHB), chronic hepatitis C (CHC) or non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). We treated Huh7 cells with proteasome inhibitor (PI) or free fatty acid (FFA) and evaluated ER stress, ubiquitinated proteins and LC3 with western blotting. Treatment with PI or FFA increased ubiquitinated proteins and activated autophagy. Samples of CHC and NAFLD showed MDBs in areas with strong oxidative stress and that the MDB-containing cells reduced oxidative stress. Keratin 8 (K8) expression was strong in MDB-containing cells in CHC and NAFLD. Aminotransferase values were significantly lower in patients with CHC and NAFLD in whom autophagy was increased in response to oxidative stress. These results suggest that MDBs protect hepatocytes from oxidative stress and that autophagy reduces hepatic damage.

研究分野：医歯薬学

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：肝臓学 オートファジー 酸化ストレス 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

肝細胞は、生体の蛋白、糖ならびに脂質代謝の中心臓器である。免疫グロブリン以外の血中蛋白のほとんどを肝細胞が産生している。そのため様々な肝疾患において蛋白産生と分解のバランスが乱れると、肝細胞には容易に小胞体ストレスが生じると考えられる。またウイルス性肝炎、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝疾患、ウイルソン病、胆汁うっ滞症では酸化ストレスにより異常蛋白が蓄積すると考えられる。このことはこれらの疾患の進展にも小胞体ストレスが関与していると考えられる。異常蛋白の蓄積による小胞体ストレスに対して細胞は unfolded protein response で対応するが、異常蛋白の蓄積の防止には細胞の蛋白分解系が重要と考えられる。細胞には主に2つの蛋白分解系が存在し、それらはユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・ライソゾーム系である。多くの蛋白質は厳密な制御のもとに分解されており、ユビキチン化された蛋白質はプロテアソームで分解を受ける。遺伝子変異やストレスの影響を受けた蛋白質は折り畳み(folding)が異常となり凝集する可能性があるが、これらは通常はプロテアソームで分解を受ける。しかし、肝細胞においてはアルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝疾患、ウイルソン病、慢性胆汁うっ滞症の場合には、異常蛋白の産生と分解のバランスが乱れユビキチン化蛋白が細胞内に蓄積し、中間径線維の構成成分であるケラチン8と18を含む Mallory-Denk 体という封入体が形成される。オートファジーは様々なストレスに対する細胞の適応反応と考えられており、微生物への防御抗原提示、細胞死ならびに発癌にも関連している³⁾。様々な疾患において異常蛋白の産生と分解のバランスが乱れることにより細胞内に異常蛋白が蓄積し、細胞障害やDNA損傷に関与している。このDNA損傷は、発癌にも関与していると考えられる。また肝細胞の脂肪化はインスリン抵抗性やそれに伴う発癌にも関与していると考えられている。近年細胞内の脂肪の分解にもオートファジーが重要な役割を演じていることが明らかとなってきている。しかし、各種肝疾患において細胞障害もしくは細胞保護と蛋白分解系の関与を明確に示した研究は存在しない。

2. 研究の目的

本研究では蛋白や脂質の代謝異常による小胞体ストレスが関与する肝疾患におけるオートファジーの役割を検討し、その調節がそれらの疾患の治療となり得るかを培養細胞、マウスモデルならびにヒト肝生検組織を用いて検討したい。

3. 研究の方法

培養細胞では肝癌培養細胞と不死化ヒト肝細胞を用いてプロテアソーム阻害剤、遊離脂肪酸(不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸)と銅を負荷して小胞体ストレス、酸化ストレス、細胞死、異常蛋白の蓄積、オートファジーならびに Mallory-Denk 体類似の凝集体形成への影響を検討した。

またオートファジーの調節が肝癌培養細胞の細胞死にいかに関わるかを分子標的薬との併用も含めて検討した。

マウスを用いた検討では DDC モデルと高脂質食モデルを用いてラパマイシンとトレハロースによるオートファジー亢進の影響を検討した。

ヒトにおいては診断に用いた肝生検組織の残りを使用して C 型肝炎、B 型肝炎と非アルコール性脂肪性肝疾患において小胞体ストレス、酸化ストレス、アポトーシス、Mallory-Denk 体形成とオートファジーの状態を免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

培養細胞においてプロテアソーム阻害剤を投与するとケラチン 8/18、ユビキチンならびに p62 からなる凝集体が形成され、小胞体ストレスと酸化ストレスの関与するアポトーシスが引き起こされた。この際細胞では LC3 の発現や GFP-LC3 の分布よりオートファジーが亢進していた。ラパマイシンにより mTOR を阻害するとオートファジーが亢進してプロテアソーム阻害剤によるアポトーシスが抑制された。またトレハロースの投与により mTOR と関連なくオートファジーが亢進し、プロテアソーム阻害剤によるアポトーシスが減少した。

飽和脂肪酸である palmitate(C16:0)と不飽和脂肪酸である oleate(C18:1)の投与により Neil red で染色される脂肪滴が形成されたが、oleate によるものがより顕著であった。また palmitate の投与により XBP1 の発現等が亢進して小胞体ストレスに対する unfolded protein response が起こっていると考えられた。また palmitate はアポトーシスを引き起こすが、oleate は引き起こさず、palmitate によるアポトーシスを抑制する効果もあった。Oleate はオートファジーも亢進させた。またオートファジーを rapamycin により亢進させると脂肪酸投与による脂肪滴は減少し、さらに palmitate によるアポトーシスも軽減された。このことよりオートファジーは脂肪滴の成分を分解しており脂肪酸負荷による脂肪毒性の軽減に有用と考えられた。

小胞体 Ca-ATPase 阻害剤である thapsigargin を投与すると小胞体ストレスが起こるが、これと palmitate の併用によりお互いにより少量の併用投与で小胞体ストレスが誘導された。これも rapamycin によるオートファジーの亢進により解除可能

であった。

培養細胞への銅の負荷でも小胞体ストレスと酸化ストレスは生じこれは銅キレート剤、抗酸化剤により回避された。

肝癌の治療としてプロテアソーム阻害剤とマルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブの細胞死に対する影響とオートファジーの関連を検討した。ソラフェニブによる細胞障害にオートファジーが関与していることを見出した。このことはオートファジーが肝癌の増殖に関与していることを再確認する結果と思われる。

マウスではマウスの Mallory-Denk 体形成モデルにおいてオートファジーを誘導するとされるラパマイシンとともにトレハロースが Mallory-Denk 体の形成を阻害した。

ヒトにおいては C 型慢性肝炎 (CHC), B 型慢性肝炎 (CHB) と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) において酸化ストレス、小胞体ストレス、ユビキチンの蓄積、Mallory-Denk 体形成、細胞増殖、オートファジーの状態を検討し、血液生化学所見とあわせて検討した。CHC と NAFLD においては酸化ストレスの多い領域に Mallory-Denk 体の形成を認めた。CHB にはその傾向はなく Mallory-Denk 体も認めなかった。異常より CHB と CHC においてはストレスに対する細胞の反応が異なると考えられた。また CHC と NAFLD においては酸化ストレスの領域とオートファジーが活性化された症例で肝障害が軽減しておりオートファジーが細胞の保護に重要と考えられた。

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 20 件)

1. Honma Y, Shimizu S, Takehara T, Harada M. Sorafenib enhances proteasome inhibitor-induced cell death via inactivation of Akt and stress-activated protein kinases. *J Gastroenterol* 49;517-526:2014.
2. Harada M. Pathogenesis and management of Wilson disease. *Hepatol Res* 44;395-402:2014.
3. 原田 大. 銅代謝とウイルソン病. *細胞* 46;15-17:2014.
4. Honma Y, Harada M. Sorafenib enhances proteasome inhibitor-mediated cytotoxicity via inhibition of unfolded protein response and keratin phosphorylation. *Exp Cell Res* 319;2166-2178:2013.
5. 原田 大、本間雄一、原田理子、草永真志、久米井伸介、日浦政明、柴田道彦、渡邊龍之. ウイルソン病の予後. *肝胆膵* 66;479-483:2013.
6. Kwan R, Hanada S, Harada M, (equal

contribution), Strnad P, Li DH, Omary MB. Keratin 8 phosphorylation regulates its transamidation and hepatocyte Mallory-Denk body formation. *FASEB J* 26;2318-2326:2012.

7. Hanada S, Harada M, Akiba J, Abe M, Sakata M, Taniguchi E, Kawaguchi T, Koga H, Nagata E, Ueno T, Omary MB, Sata M. Aging modulates susceptibility to mouse liver Mallory-Denk body formation. *J Histochem Cytochem* 60;475-483:2012.

8. Hiura M, Abe S, Tabaru A, Shimajiri S, Hanami K, Sato K, Tanaka Y, Harada M. Case of severe liver damage after the induction of tocilizumab therapy for rheumatoid vasculitis. *Hepatol Res* 41; 492-496: 2011.

9. Yanagimoto C, Harada M, Kumemura H, Abe M, Koga H, Sakata M, Kawaguchi T, Terada K, Hanada S, Taniguchi E, Ninomiya H, Ueno T, Sugiyama T, Sata M. Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann-Pick C1 protein. *Hepatol Res* 41; 484-491: 2011

10. Harada M, Miyagawa K, Honma Y, Hiura M, Shibata M, Matsushashi T, Abe S, Harada R, Tabaru A. Excess copper chelating therapy for Wilson disease induces anemia and liver dysfunction. *Intern Med* 50;1461-1464:2011.

11. Hayashi H, Narita R, Hiura M, Abe S, Tabaru A, Tanimoto A, Sasaguri Y, Harada M. A case of adult autoimmune hepatitis with histological features of giant cell hepatitis. *Intern Med* 50;315-319:2011.

12. Yamamoto K, Hiura M, Tabaru A, Honma Y, Narita R, Abe S, Shimajiri S, Okamoto K, Yamaguchi K, Harada M. Rapid progression of hepatocellular carcinoma in a patient with autoimmune hepatitis. *Intern Med* 50;1409-1413:2011.

13. Honma Y, Harada M, Sato M, Katsuki Y, Hiura M, Shibata M, Narita R, Harada R, Abe S, Tabaru A, Tajiri N, Shimajiri S. Late diagnosed Wilson disease with hepatic and neurological manifestations. *Hepatol Res* 41; 270-276: 2011.

14. 原田 大, 本間雄一, 日浦政明. 肝細胞 Mallory-Denk 体の形成と細胞生物学的意義. *細胞* 43;444-447:2011.

15. 原田 大. 肝疾患でのオートファジーの意義. *産業医科大学雑誌*. 33;337-344:2011.

16. 原田 大. B 型肝炎ウイルスは宿主の細胞のオートファジーを利用して増殖している. *Frontiers in Gastroenterology* 16;150-151:2011.

17. 原田 大. 小胞体ストレスにより activating transcription factor-6(ATF-6) 欠損マウスは脂肪肝を起こす. *Frontiers in Gastroenterology* 16;152-153: 2011.

18. 原田 大. ウイルソン病での銅沈着へ

の細胞レベルでの反応. *Frontiers in Gastroenterology* 16;154-155:2011.
19. 原田 大. ケラチンの変異は急性肝障害の進展に關与する. *Frontiers in Gastroenterology* 16;156-157:2011.
20. 原田 大. 中間径線維の構成成分であるケラチンの糖化は細胞の保護に重要である. *Frontiers in Gastroenterology* 16;158-159:2011.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 本間雄一、原田 大. 非アルコール性脂肪肝炎モデルに対するトレハロースの影響. 第 19 回肝病態生理研究会 東京 2013 年 6 月
2. 原田 大. 代謝性肝疾患. 日本肝臓学会教育講演会 東京 2013 年 8 月
3. 本間雄一、大江晋司、宮川恒一郎、日浦政明、原田 大. 小胞体ストレスによる肝細胞障害へのオートファジーの作用. 第 44 回日本臨床分子形態学会 福岡 2013 年 9 月
4. 日浦政明、本間雄一、原田 大. C 型慢性肝炎患者における酸化ストレスがウイルス増殖およびインターフェロン治療効果に及ぼす影響. 第 40 回 日本肝臓学会西部会 岐阜 2013 年 12 月
5. 本間 雄一、原田 大. トレハロースはオートファジーを介して肝細胞の小胞体ストレスを軽減するか. 第19回浜名湖シンポジウム 浜松 2011年12月
6. 原田 大. 培養肝癌細胞への分子標的薬の影響 第 29 回犬山シンポジウム 犬山 2012 年 8 月
7. 本間雄一、原田 大. トレハロースのオートファジーを介した肝細胞の小胞体ストレスへの作用. 第 44 回日本臨床分子形態学会 高知 2012 年 9 月
8. 本間雄一、原田 大、田原章成. 肝癌細胞における sorafenib とプロテアソーム阻害薬の相互作用. 第 16 回肝臓学会大会 神戸 2012 年 10 月
9. Harada M, Honma Y. Autophagy eliminates components of hepatocyte inclusions Mallory-Denk bodies. The 6th international symposium of autophagy 2012. 沖縄 2012 年 10 月
10. 本間雄一、原田 大. 肝由来培養細胞における分子標的薬と小胞体ストレス応答. 第 20 回浜名湖シンポジウム 浜松 2012 年 12 月
11. Harada M, Yanagimoto C. Mechanisms of intracellular copper metabolism regulated by ATP7B and Niemann-Pick C1 protein in hepatocytes. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco 2011 年 11 月
12. 本間 雄一、日浦 政明、柴田 道彦、阿部 慎太郎、田原 章成、原田 大. Wilson

病における銅過剰と Mallory-Denk 体形成の肝細胞への影響. 第 15 回ウイルソン病研究会学術集会. 東京 2011 年 5 月

13. 原田 大: 指定講演. 先天性銅代謝異常症・ウイルソン病の分子機構. 日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会 福岡 2011 年 5 月
14. 本間雄一、原田 大、日浦政明、柴田道彦、阿部慎太郎、田原章成. ウイルソン病において銅過剰は肝細胞へ如何なる影響を与えているか. 第 19 回肝病態生理研究会 東京 2011 年 6 月
15. 原田 大、本間雄一、日浦政明. 肝細胞での Mallory-Denk 体形成を伴う肝障害におけるケラチン 18 の役割. 第 47 回肝臓学会総会 東京 2011 年 6 月
16. 本間雄一、原田 大. 小胞体ストレスならびに酸化ストレス関連肝障害におけるオートファジーの役割. 第 47 回肝臓学会総会 東京 2011 年 6 月
17. 原田 大. 中間径線維の構成成分であるケラチン 18 はペプチドとして肝細胞保護に働く 第 43 回日本臨床分子形態学会総会 大阪 2011 年 9 月
18. 原田 大、柳本親利. ウイルソン病蛋白(ATP7B)を介した肝細胞内での銅代謝機構. 第 15 回日本肝臓学会大会 福岡 2011 年 10 月

〔図書〕(計 7 件)

1. 原田 大. 培養肝癌細胞への分子標的薬の影響. *メディカルトリビューン*. ウイルス肝炎・肝癌の病態と治療. 167-172:2013.
2. 原田 大. 代謝性肝疾患. 日本肝臓学会. 教育講演会テキスト;85-93:2013.
3. 原田 大. ウイルソン病. 朝倉書店 朝倉内科学;1160-1162:2013.
4. 原田 大. 肝細胞 Mallory-Denk 体の生成機構. 文光堂. N A S H・アルコール性肝障害の診療を極める 基本から最前線まで; 384-385:2013.
5. 原田 大、本間雄一、千手倫夫. ウイルソン病. 最新医学社. 肝硬変 改訂第 2 版 147-151:2013.
6. 本間雄一、原田 大. トレハロースはオートファジーを介して肝細胞の小胞体ストレスを軽減するか? *アークメディア 分子生物学が可能とした個別化医療*. 124-125:2012.
7. 原田 大、本間雄一、原田理子. ウイルソン病. 学際企画. *モノグラフ 病気の分子形態学* 133-135:2011.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 大 (HARADA, Masaru)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：00241175