

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590851

研究課題名(和文) 肝臓低栄養・病態におけるオートファジーに関する研究

研究課題名(英文) Immunohistochemical study of relationship between autophagy marker LC3 and nutritional state in human livers.

研究代表者

中嶋 信(Nakajima, Makoto)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・技術専門員

研究者番号：70396696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝臓のミクロチューブ関連タンパク軽鎖3(LC3)免疫染色を行ったところ、LC3は、正常肝臓の門脈域よりも中心静脈周囲に強く、顆粒状に染まり、脂肪化に伴って、染色性が低下した。肝臓の脂肪化の指標であるAdipose differentiation-related protein (ADRP)の染色性と比較したところ、小脂肪滴の一部でLC3とADRPが共存していたが、中等度以上の脂肪化でLC3の染色性が低下し、LC3陽性面積と、ADRP陽性面積は逆相関を認めた。ヒトにおいてオートファジーの障害が、脂肪化を促進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) immunohistochemistry reproducibly delineated puncta in normal human liver, which were preferentially located around the central venal zone. The extent of LC3 immunostaining reduced as progressing steatosis. Double immunofluorescence for Adipose differentiation-related protein (ADRP) and LC3 demonstrated that positive area of the two protein have inverse relationship, as well as that they are co-localization on the membrane of small lipid droplets (LDs) but not of large LDs. These findings suggest that impaired autophagy promotes steatosis and that autophagy may be implicated in LD turnover.

研究分野：法医学

キーワード：オートファジー 肝臓 LC3 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

法医学の業務上、飢餓や高齢者の低栄養状態が死に寄与したと考えられるような事例を扱う一方で、死因とは直接の関係は無くとも明らかな肥満・高脂肪が背景にあるような事例も多く経験する。動物細胞には、非選択的な大規模な分解過程と、ユビキチンを介した制御された選択的な分解過程が存在する。非選択的な分解システムのオートファジーは飢餓で誘導されることが知られている。オートファゴソームという二重膜を伸長し、選択することなく細胞質・細胞小器官・蛋白質凝集塊を取り込み、さらにライソソームと融合してオートリソソームとなり、自らの細胞質成分を分解し、栄養に供して、最終的に個体の生存を図る過程である。

オートファゴソームの構成要素 Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) は、オートファジーの良い指標となっている。その LC3 とよく結合する輸送タンパクとして p62 がある。このタンパク質は、LC3 を介してオートファジーに代謝されるが、オートファジーが阻害されると p62 が蓄積し、逆にオートファジーが誘導されるとその発現レベルが減少することが知られている。ユビキチン・プロテアソーム系が阻害されるとオートファジーが活性化されること。オートファジー欠損マウスの研究では、ユビキチン結合タンパク群が蓄積することなどからオートファジーによるユビキチン・プロテアソーム系の補償機構が推定されている。p62 がオートファゴソームへ、ユビキチン結合タンパク質やユビキチン結合オルガネラを輸送するレセプターであることが報告されている。

2. 研究の目的

オートファジーの検出には、初期過程のオートファゴソームの構成要素 Microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) の発現を飢餓、健常、高脂肪で比較する。肝臓の脂肪化の指標である Adipose differentiation-related protein (ADRP) や、オートファジーの阻害の指標となる p62 と発現状態を比較し、生前の栄養状態の指標としての妥当性、およびヒト肝臓組織における LC3 の発現パターンについて検討する。

3. 研究の方法

ヒト正常肝細胞の LC3 の発現においては、倫理委員会の承認を得た、司法解剖時に採取したヒト肝臓を検査材料とし

た。組織免疫検査を行うため、肝臓組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋、薄切、脱パラフィンした後、抗原を賦活化、内在性ペルオキシターゼの不活化、ブロッキング処理を行い、検査に供した。処理した肝臓組織切片に、抗 LC3 のモノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体を 1 次反応し、次いで蛍光色素やペルオキシターゼで標識した 2 次抗体を反応させ、それぞれ、蛍光顕微鏡、光学顕微鏡で観察し、デジタルカメラでコンピューターに取り込み、比較検討を行った。

肝臓組織における LC3 と ADRP の発現部位の比較において、抗 LC3 抗体と抗 ADRP 抗体の二重蛍光染色を行い、発現領域の確認を蛍光顕微鏡の下で行った。

LC3 と p62 の発現部位を観察するため同一症例の連続切片を別々に、抗 LC3、p62 抗体と反応させ、2 次抗体でラベルし、発色させ光学顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

栄養状態の指標である Body Mass Index (BMI) を用いて、LC3 との関連性を調べたところ相関は認められなかった。

オートファジーの活性を調べるため、ヒトの正常肝組織を染色したところ、門脈域より中心静脈周囲に強く顆粒状に集まり、脂肪化が進むにしたがって染色性が低下していった。

LC3 と ADRP の二重染色によって、小脂肪滴では、LC3 と ADRP が部分的に共存していたが、中等度程度以上の脂肪肝では LC3 の染色性は軽微になり、LC3 陽性面積と ADRP 陽性面積には逆相関が認められた。

LC3 と p62 の比較では、LC3 の発現の強い領域では p62 は弱く、LC3 の発現の弱いところでは p62 の発現は強く、逆相関を示していた。

本研究によって、ヒトの正常肝組織においても LC3 染色が可能であり、中心静脈周囲にその染色性が強いこと、脂肪化指標の ADRP とオートファジー抑制の指標である p62 の発現から、オートファジーの阻害が肝臓の脂肪化を促進していることが示唆された。

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)

- 1) Kashima J, Shintani-Ishida K, Nakajima M, Maeda H, Unuma K, Uchiyama Y, Yoshida K.

Immunohistochemical study of the autophagy marker microtubule protein 1 light chain 3 in normal and steatotic human livers. *Hepatol. Res.* 2014; 44: 779-787.

2) Unuma K, Aki T, Matsuda S, Funakoshi T, Yoshida K, Uemura K.
Inducer of heme oxygenase-1 cobalt protoporphyrin accelerates autophagy and suppresses oxidative damages during lipopolysaccharide treatment in rat liver. *Hepatol. Res.* 2013; 43(1): 91-96.

3) Shintani-Ishida K, Saka K, Yamaguchi K, Hayashida M, Nagai H, Takemura G, Yoshida K.
MDMA induces cardiac contractile dysfunction through autophagy upregulation and lysosome destabilization in rats. *Biochim Biophys Acta* (molecular basis of disease). 2013; 1842(5): 691-700

4) 加島淳平、前田秀将、中嶋 信、吉田謙一。
Immunohistochemical detection of autophagy maker LC3 in human livers related to steatosis.
日本法医学雑誌 2012; 66: 106

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1) 加島淳平、前田秀将、中嶋 信、吉田謙一。
Immunohistochemical detection of autophagy maker LC3 in human livers related to steatosis.
第96次日本法医学会学術全国集会 2012年6月7日~9日 静岡県 浜松市 アクトシティ浜松

〔学会発表〕(計 1 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:

出願年月日:

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
中嶋 信 (NAKAJIM, Makoto)
東京大学・大学院医学系研究科・
技術専門職員

研究者番号: 70396696

(2)研究分担者
吉田 謙一 (YOSHIDA, Kenichi)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40166947

(3)連携研究者 ()
研究者番号:

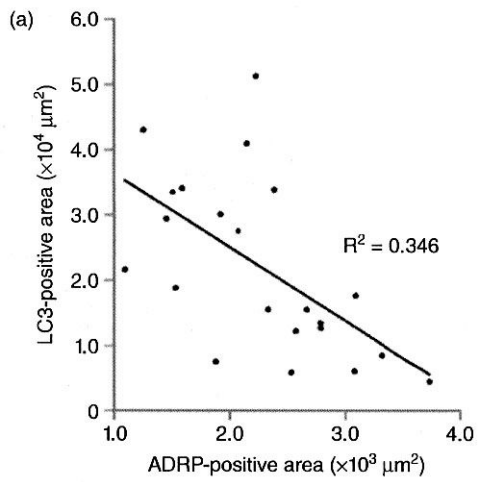


図 1
 二重蛍光染色による、オートファジーの指標 LC3 陽性領域と脂肪化の指標 ADRP 陽性領域は、相関係数 0.346 の逆相関を示していた。

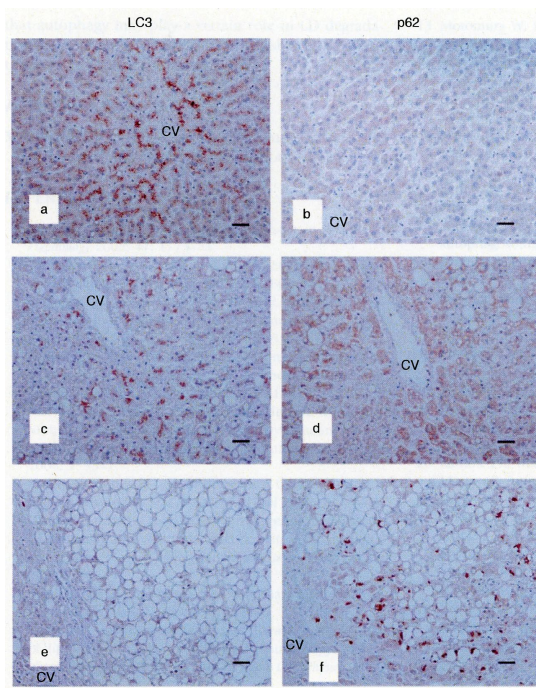


図 2
 a と b：脂肪化の少ない肝組織では LC3 の発現が強い一方、p62 の発現が弱かった。
 c と d：中等度の脂肪化では次第に LC3 の発現が弱まり、p62 の蓄積が見られ始めた。
 e と f：脂肪化が高度の症例では LC3 の染色はほとんど見られないが、p62 の蓄積が多く見られた。