

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461026

研究課題名(和文) 肝疾患における小胞体ストレスならびにそれに対する肝細胞の防御反応に関する検討

研究課題名(英文) Response of hepatocytes against endoplasmic reticulum stress in chronic liver diseases

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

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、ウイルス性肝炎やウイルソン病などの病態には肝細胞での小胞体ストレス(ER stress)が関与していた。

飽和脂肪酸によるER stressによってオートファジーが障害されており、不飽和脂肪酸や分子シャペロンが治療となると考えられた。銅による酸化ストレスとER stressを介した細胞障害があり、これは、亜鉛、抗酸化剤や分子シャペロンにより回避された。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic reticulum stress (ER stress) of hepatocytes is demonstrated in patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), viral hepatitis (V) and Wilson disease. Saturated fatty acids induce ER stress and inhibit autophagic flux. Unsaturated fatty acid or chemical chaperones cancels this phenomenon. Wilson disease is also associated with ER stress of hepatocytes demonstrated by the electron microscopy. Copper induced oxidative stress and ER stress in cultured cells of both hepatic origin and non-hepatic origin. Zinc and chemical chaperones cancel copper induced ER stress.

ER stress is involved in pathogenesis of various liver diseases and regulation of ER stress is important for the management of various liver diseases.

研究分野：消化器病学

キーワード：小胞体ストレス オートファジー 非アルコール性脂肪性肝疾患 ウイルソン病 酸化ストレス C型肝炎

## 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。その中でも小胞体は蛋白合成、脂質合成に重要な細胞内小器官である。様々な臓器の疾患において蛋白の遺伝子変異、ウイルス感染、メタボリック症候群における遊離脂肪酸の流入の増加や様々なストレスにより小胞体に負荷がかかる。その状態を小胞体ストレスと称するが、それに対して細胞は unfolded protein response という反応で防御するが、それでも修復不能な場合はアポトーシスを含む細胞死に陥る。しかし、様々な肝疾患における肝細胞でのこの詳細な反応は明らかでない。我々はこのような反応にケラチンのリン酸化、細胞内封入体である Mallory-Denk 体形成やオートファジーが重要であることを証明してきた。

## 2. 研究の目的

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、慢性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。またウイルス感染においてはウイルス蛋白産生のため小胞体ストレスが生じる。このことはこれらの疾患すべての進展に小胞体ストレスが関与していると考えられる。さらに小胞体ストレス自体が、酸化ストレス、インスリン抵抗性、脂肪化を引き起こしそれらはお互いにサイクルを作って細胞障害を引き起こす。これらは細胞発癌にも関与する。

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・ライソソーム系である。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、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、細胞の分解能を超える異常蛋白が蓄積した場合には

細胞内に封入体が形成される。様々な神経変性疾患でそのような構造物がみられるが、パーキンソン病の Lewy 小体等がそれに相当する。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 体と称される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。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。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。しかし、各種肝疾患において小胞体ストレスとそれに対する防御機構を明確に示した研究は少ない。本研究では、小胞体ストレス時の Mallory-Denk 体(細胞内封入体)形成、オートファジー、細胞死ならびに細胞増殖との関連とそれに対する細胞の反応を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞を用いた検討

肝癌細胞株と不死化ヒト肝細胞株を用いてプロテアソーム阻害剤、ツニカマイシン、タブシガルジンならびに様々な遊離脂肪酸負荷を行った。それらの細胞で異常蛋白の蓄積はユビキチンで、酸化ストレスの状態を HNE ならびに hexanoyl-Lys(HEL)で、小胞体ストレスの状態を BiP、XBP1 ならびに CHOP で、脂肪滴の沈着を Nile red 染色にて細胞死の状態を PARP と caspase 3 で、細胞増殖の状態を Ki67 で、DNA 損傷を H2AX で、オートファジーの状態を LC3 で、またオートファジー調節系の状態を mTOR、beclin 1、S6 kinase の Western blot ならびに免疫染色にて検討した。Mallory-Denk 体形成の状態はユビキチンとケラチンの免疫染色と電子顕微鏡にて検討する。さらにオートファジーを 3メチルアデニン(3MA)、beclin 1 の siRNA で阻害するとどのように変化するかを検討した。また、オートファジーへの関与が推測さ

れているトレハロースならびに mTOR 阻害剤の rapamycin の影響を検討した。

銅の細胞毒性を培養細胞を用いて検討した。その際、亜鉛、抗酸化剤ならびに分子シャペロンの影響も検討した。

#### (2) マウスを用いた検討

高脂肪食を負荷したマウスを作成した。これらのマウスの肝組織において酸化ストレスの状態を HNE ならびに hexanoyl-Lys (HEL) で、小胞体ストレスの状態を BiP、XBP1 ならびに CHOP で、細胞死の状態を PARP と caspase 3 で、細胞増殖の状態を Ki67 で、オートファジーの状態を LC3 で、またオートファジー調節系の状態を mTOR、beclin 1、S6 kinase の Western blot ならびに免疫染色にて検討する。Mallory-Denk 体形成とオートファジーの状態はコビキチンとケラチンの免疫染色で検討した。トレハロースと rapamycin は腹腔内投与を行った。

#### (3) ヒト肝組織を用いた検討

診断のために行った肝生検組織を使用した。脂肪性肝疾患、慢性ウイルス性肝炎、ウイルソン病ならびに肝細胞癌の肝組織において酸化ストレス (HNE、HEL)、小胞体ストレス (CHOP、eIF2 $\alpha$ )、Mallory-Denk 体形成 (コビキチン、ケラチン、p62)、アポトーシス (cleaved caspase 3)、細胞増殖 (Ki67) ならびにオートファジー (LC3 ならびに cleaved LC3) の状態を免疫染色により検討した。組織全体のみならず、細胞ごとにこれらに対比することにより Mallory-Denk 体形成やオートファジー活性化の状態と酸化ストレス、小胞体ストレス、細胞死ならびに細胞増殖との関連を検討した。

非アルコール性脂肪性肝疾患、ウイルス性肝疾患ならびにウイルソン病においては、脂肪沈着と肝での炎症の程度、酸化ストレス、小胞体ストレス、アポトーシスならびに細胞増殖の程度とオートファジーの関連を特に詳細に検討する。また一部の症例においては電子顕微鏡にて肝細胞内のオートファジーと脂肪滴や Mallory-Denk 体の関連を検討した。

#### 4. 研究成果

肝細胞に小胞体ストレスをきたす疾患と

して非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、ウイルソン病ならびに C 型肝炎ウイルス感染症を想定して培養細胞、マウスモデルならびにヒト肝生検組織にて検討を行った。

脂肪性肝疾患に関しては培養細胞、マウスならびにヒト肝生検組織にて検討を行った。マウスに高脂肪食を負荷した検討では小胞体ストレスが惹起された (splicerd XBP1、phospho-eIF2 $\alpha$ )。電子顕微鏡による検討でも小胞体の形態変化を認め、オートファゴゾームの増加を認めた。オートファジーのマーカである LC3-II と p62 の蓄積を認めた。Atg7 や beclin 1 の発現に変化はなかった。そのためオートファジーの変化の詳細を培養細胞にて検討した。肝由来の培養細胞を用いて飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の影響を検討した。飽和脂肪酸であるパルミチン酸で小胞体ストレスが惹起され、マウスと同様に LC3-II と p62 の蓄積を認めた。この原因を小胞体ストレスのさらなる負荷とシャペロンによる軽減で詳細に検討するとオートファゴゾームとライソゾームの癒合を小胞体ストレスが阻害していることが明らかとなった。そのため小胞体ストレスの解除がこの病態の治療となると考えられた。ヒト肝組織でも p62 と LC3 の発現亢進を C 型慢性肝炎と NAFLD で確認した。またオートファジーの状態と肝障害の程度に関連を認めオートファジーの調節が C 型慢性肝炎や NAFLD の治療となる可能性が示唆された。また C 型慢性肝炎や NAFLD ならびにウイルソン病において Mallory-Denk 体はその存在する細胞で酸化ストレスを軽減していたことから細胞障害の軽減に働いている可能性が示唆された。

ウイルソン病患者の肝組織の電子顕微鏡による観察で小胞体の形態変化を認めた。また培養細胞に硫酸銅を負荷すると酸化ストレスと小胞体ストレスが確認された。これにプロテアソーム阻害剤で軽度の小胞体スト

レスを負荷するとアポトーシスが誘導された。これらの変化は銅キレート剤、亜鉛、酸化ストレス薬ならびに分子シャペロンで改善された。このことから銅の細胞障害により酸化ストレスと小胞体ストレスが関与しており、これらの解除が治療に有用であることが示された。さらに亜鉛による肝細胞の直接的な保護作用も示された。

C型肝炎感染細胞(JFH-1)でも同様な検討を行い、脂肪負荷と類似な小胞体ストレスの関与とオートファジーの障害を認めて検討を続けている。

#### 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24件)

1. Miyashima Y, Shibata M, Honma Y, Matsuoka H, Hiura M, Abe S, Harada M. Severe alcoholic hepatitis effectively treated with vitamin E as an add-on to corticosteroids. Intern Med (査読有)(in press).
2. Harada M, Yoneda A, Haruyama S, et al (9名中1番目). Bullous pemphigoid associated with the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin in a patient with liver cirrhosis complicated with rapidly progressive hepatocellular carcinoma. Intern Med (査読有) (in press).
3. Honma Y, Sato-Morita M, Katsuki Y, Mihara H, Baba R, Harada M. Trehalose activates autophagy and decreases proteasome inhibitor-induced endoplasmic reticulum stress and oxidative stress-mediated cytotoxicity in hepatocytes. Hepatol Res (査読有) (in press).
4. Harada M. Management for acute liver failure of Wilson disease: indication for liver Transplantation. Hepatol Res (査読有) 47;281-282:2017.
5. Miyashima Y, Honma Y, Miyagawa K, Oe S, Senju M, Shibata M, Hiura M, Abe S, Harada M. Daclatasvir and Asunaprevir Combination Therapy-induced Hepatitis and Cholecystitis with Coagulation Disorder due to Hypersensitivity Reactions. Intern Med (査読有) 55;3595-3601:2016.
6. Oe S, Miyagawa K, Honma Y, Harada M. Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. Exp Cell Res (査読有) 347;192-200:2016.
7. Ide T, Eguchi Y, Harada M et al (25名中3番目). Evaluation of resistance-associated substitutions in NS5A using direct sequence and cycleave method and treatment outcome with daclatasvir and asunaprevir for chronic hepatitis C genotype 1. PLoS One (査読有) 11:e0163884:2016. doi: 10.1371/journal.pone.0163884.
8. Miyagawa K, Oe S, Honma Y, Izumi H, Baba Y, Harada M. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy at the step of autophagosome-lysosome fusion in hepatocytes. Am J Pathol (査読有) 186; 1861-1873: 2016.
9. 原田 大、大江晋司、本間雄一. ウイルソン病. 肝胆膵 (査読無)72;149-154:2016.
10. 原田 大. Wilson 病. 小児内科 (査読無)48;875-877:2016.
11. 原田 大. 広がるオートファジーの世界. 肝胆膵(査読無)73;145-147:2016.
12. 本間雄一、日浦正明、原田 大. 肝疾患における Mallory-Denk 体形成とオートファジーの意義. 肝胆膵 (査読無)73;181-187:2016.

13. 原田 大、大江晋司. ウイルソン病 (Wilson 病). 肝胆膵 (査読無)73;963-969:2016.
14. Hiura M, Honma Y, Miyagawa K, Oe S, Shimajiri S, Mihara H, Oe M, Sato-Morita M, Katsuki Y, Harada M. Alleviation mechanisms against hepatocyte oxidative stress in patients with chronic hepatic disorders. *Hepatol Res* (査読有) 45;1124-1135:2015.
15. 原田 大. ウイルソン病 .肝臓 (査読有) 56;639-644:2015.
16. 原田 大. 非 B 非 C 肝癌の危険因子と発癌機序 代謝性肝疾患 ウイルソン病と肝細胞癌 . 日本臨床 (査読無) 73;113-115:2015.
17. 原田 大. ウイルス排除困難症例に対する治療 肝庇護療法 . 新ウイルス性肝炎学 日本臨床(査読無)73;274-277:2015.
18. Harada M. Pathogenesis and management of Wilson disease. *Hepatol Res* (査読有) 44;395-402:2014.
19. Honma Y, Harada M. A new therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma by molecular targeting agents via inhibition of cellular stress defense mechanisms. *J UOEH* (査読有) 36:229-235:2014.
20. 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* (査読有) 49;517-526:2014.
21. Tai M, Matsuhadhi N, Ichii O, Suzuki T, Ejiri Y, Kono S, Miyajima H, Harada M. Case of presymptomatic aceruloplasminemia treated with deferasirox. *Hepatol Res* (査読有) 44;1253-1258:2014.
22. 原田 大. 銅代謝とウイルソン病 . 細胞 (査読無)46;15-17: 2014.
23. 原田 大. ウイルソン病、ヘモクロマトーシスの進展と改善 . 肝胆膵 (査読無)68;685-688; 2014.
24. 原田 大. 銅、鉄代謝異常 . 診断と治療 (査読無)102;1721-1725:2014
- [学会発表](計 15 件)
1. 原田 大. 肝疾患における肝細胞のストレス対応. 第 11 回 臨床ストレス応答学会大会. 山口大学医学部霜仁会館(山口県宇部市) 2016 年 11 月 11-12 日
  2. 宮川 恒一郎、原田 大. 肝細胞における選択的オートファジーは飽和脂肪酸による小胞体ストレスで障害される. 第 52 回日本肝臓学会総会. ホテルニューオータニ幕張(千葉県千葉市) 2016 年 5 月 19-20 日
  3. 大江 晋司、宮川 恒一郎、本間 雄一、原田 大. 脂肪性肝疾患における脂肪滴と Mallory-Denk body の意義. 第 52 回日本肝臓学会総会. ホテルニューオータニ幕張(千葉県千葉市) 2016 年 5 月 19-20 日
  4. Oe S, Miyagawa K, Honma Y, Harada M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in excess copper-induced hepatotoxicity. APASL 2016 in Tokyo. グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区) 2016 年 2 月 20-24 日
  5. Miyagawa K, Oe S, Honma Y, Harada M. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress impairs selective autophagy in hepatocytes. APASL 2016 in Tokyo. グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区) 2016 年 2 月 20-24 日
  6. Oe S, Miyagawa K, Honma Y, Harada M. The effect of treatment with chemical chaperones and zinc acetate on hepatocytes treated with excess copper. AASLD. San Francisco(USA) 2015 年 11 月 13-17 日
  7. Miyagawa K, Oe S, Honma Y, Harada M. Lipid-induced endoplasmic reticulum stress but not hepatic steatosis

contributes to blockage of autophagosome-lysosome fusion. AASLD. San Francisco(USA) 2015年11月13-17日

8. 大江 晋司、宮川 恒一郎、南 創太、本間 雄一、原田 大. 高脂肪食投与マウスへのオートファジー誘導は肝内遊離脂肪酸を増加させる. 第19回日本肝臓学会大会. グランドプリンスホテル新高輪、他(東京都港区)2015年10月8-9日

9. 宮川 恒一郎、大江 晋司、本間 雄一、原田 大. 肝細胞におけるオートファジーは脂肪酸組成により変化する. 第19回日本肝臓学会大会. グランドプリンスホテル新高輪、他(東京都港区)2015年10月8-9日

10. 宮川 恒一郎、大江 晋司、本間 雄一、馬場 良子、原田 大. 肝におけるオートファジーは脂肪酸流入による小胞体ストレスで障害される. 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 長崎大学医学部良順会館、他(長崎県長崎市)2015年9月18-19日

11. 原田 大. 遺伝性代謝性肝疾患. 平成27年度日本肝臓学会教育講演会 砂防会館(東京都千代田区)2015年8月16日

12. 宮川 恒一郎、大江 晋司、原田 大. 非アルコール性脂肪肝炎モデルにおける細胞内凝集体とオートファジーの影響. 第51回日本肝臓学会総会. ホテル日航熊本、他(熊本県熊本市)2015年5月21-22日

13. 大江 晋司、宮川 恒一郎、南 創太、本間 雄一、日浦 政明、原田 大. 肝細胞における銅の毒性とそれに対する亜鉛の影響. 第51回日本肝臓学会総会. ホテル日航熊本、他(熊本県熊本市)2015年5月21-22日

14. 宮川 恒一郎、大江 晋司、南 創太、本間 雄一、日浦 政明、原田 大. 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFD)におけるオートファジーの役割. 第18回日本肝臓学会大会. 神戸国際展示場、ほか(兵庫県神戸市)2014年10月23-24日

15. 原田 大、日浦 政明. 慢性ウイルス性肝疾患におけるストレスと細胞の反応. 第30回犬山シンポジウム. 名鉄犬山ホテル(愛知県犬山市)2014年8月7日

〔図書〕(計7件)

1. Hino K, Harada M. Metal Metabolism and Liver. "The Liver in Systemic Diseases" Springer pp.343(123-146):2016.

2. 原田 大. アルコール性肝障害. 「今日の治療指針 Today's Therapy 2016」医学書院. pp.2096(583-584):2016.

3. 原田 大. 代謝性肝疾患(ヘモクロマトーシス・Wilson病). 「消化器 研修ノート 第2版」診断と治療社. pp.664(473-475):2016.

4. 原田 大. 遺伝性代謝性肝疾患. 日本肝臓学会教育講演会テキスト、日本肝臓学会. pp.161(69-79):2015.

5. 原田 大. ウイルソン病. 南山堂 医学大辞典 第20版 南山堂. p.3101(180):2015.

6. 原田 大、原田 理子. ウイルソン病. HEPATOLOGY PRACTICE VOL4 難治性肝疾患の診療を極める. 文光堂. pp.341(331-334):2014.

7. 原田 大. 代謝性肝障害. 「消化器病診療」第2版 医学書院. pp.509(178-181):2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/3nai/intr\\_o\\_j.html](http://www.uoeh-u.ac.jp/kouza/3nai/intr_o_j.html)

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