

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07980

研究課題名(和文) 非アポトーシス細胞死制御による非アルコール性脂肪肝炎の治療法確立の試み

研究課題名(英文) Regulation of non-apoptotic cell death to treat non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

柿坂 啓介 (Kakisaka, Keisuke)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：40583563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肥満に多く合併する非アルコール性脂肪性肝疾患における肝臓の炎症を制御するために、炎症の原因となる肝細胞死の仕組みを明らかにすることを目的とした。培養肝細胞を用いて、肥満の原因であるフルクトースと不飽和脂肪酸が肝細胞に活性酸素種産生を介してカスパーゼ非依存性細胞死を引き起こしていることを明らかにした。スクロース添加高脂肪食マウスでも活性酸素種産生亢進とカスパーゼ非依存性細胞死が引き起こされていた。非アルコール性脂肪性肝疾患患者の肝組織でも活性酸素種産生が亢進している領域でカスパーゼ非依存性細胞死が多く観察され、治療標的となりえる病態と推定できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変の原因として増加している非アルコール性脂肪性肝疾患の細胞死の新たな機序を明らかにした。本研究では、比較的毒性が低いとされていた不飽和脂肪酸も、フルクトース過多の環境では強く肝細胞死を誘導することが培養細胞でわかった。更に、マウス、ヒト肝臓でも同様の肝細胞死が確認できたことから、果糖および不飽和脂肪酸の新たな肝細胞障害機序が明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：To regulate liver inflammation in patients with obesity-related non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), we aim mechanism of hepatocyte death which is a cause of inflammation. Unsaturated fatty acid induced caspase-independent cell death via production of reactive oxygen species (ROS) at hepatocyte cell-line with fructose which was known as cause of obesity. ROS production and caspase-independent cell death were characterized as protein expression of hemoxygenase-1 and phosphorylation of MLKL. Furthermore, increase ROS production and caspase-independent cell death was found in mice which fed with high fat diet and supplementation of sucrose. In liver of patients with NAFLD, ROS production positively correlated with prevalence of number of hepatocytes with caspase-independent death. To control liver inflammation, ROS-induced caspase-independent cell death may be a therapeutic target in pathophysiology of NAFLD.

研究分野：非アルコール性脂肪性肝疾患

キーワード：カスパーゼ非依存性細胞死 フルクトース 不飽和脂肪酸 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) のうち非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) は脂肪毒性による肝細胞死とそれに続いて惹起される炎症と線維化により肝硬変へ進展する。Direct Acting Antivirals の開発を契機として C 型肝炎は完治が望める疾患になった。一方で、罹患患者数増加に伴い NASH は肝硬変の主要な原因の一つとなり、NASH 肝硬変や NASH 肝関連死は 2030 年までに増加すると考えられている。近年、NASH 肝ではアポトーシスだけでなく、ネクローシスやフェロプトーシスなどアポトーシス以外の細胞死 (非アポトーシス細胞死) が起きており、NASH 病態に関連することが報告されている。一般的にアポトーシス抑制は癌化の危険を含有するため、非アポトーシス細胞死の機序解明とその制御が NASH の新規治療標的になると考える。これまでに風船化肝細胞形成に細胞死シグナルとその不履行が関与している可能性を明らかにした。細胞死シグナルとシグナルへの多様な反応が非アポトーシス細胞死に関連している可能性に着目し研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は NASH におけるアポトーシス・非アポトーシス細胞死など多様な細胞死の病態解明とその適切な制御による NASH 進展抑制・発癌の予防を最終目的とし、当該研究では非アポトーシス細胞死の機序を細胞生物学的に解明し、その制御の標的分子を探索することを目的とした。ヒト培養肝癌細胞株 (Huh7) 及びスクロース+高脂肪食を負荷した C57BL/6J マウスを用いて脂肪毒性による非アポトーシス細胞死を分子生物学・病理学的に解析し、その機序と標的分子を明らかにすることを旨とする。

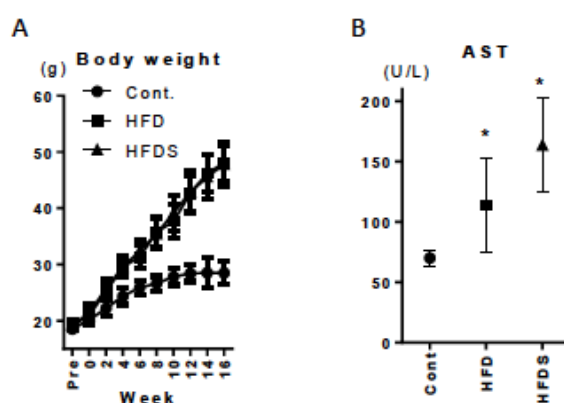
3. 研究の方法

6 週齢雄性 C57BL/6J に高脂肪食 (HFD) およびスクロース添加高脂肪食 (HFDS) を 14 週給餌し、組織学的所見、遺伝子発現、蛋白発現を評価した。肝癌細胞株 (HepG2、Huh7 細胞)、マウス初代培養肝細胞を用いて細胞内シグナル、細胞死について解析した。ヒト肝生検検体を用いて蛋白発現を検証した。

4. 研究成果

4-1. 動物モデルの検証

正常食給餌マウス (Cont.) と比較して HFDS・HFD で体重が増加し、HFDS は HFD と比較して AST が高値であった (右図)。HFDS で線維化マーカー上昇、HFD/HFDS で耐糖能障害を認め、HFD が単純脂肪肝、HFDS が NASH モデルであることが確認できた。

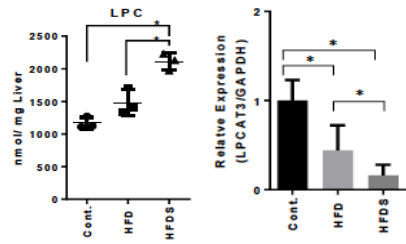


4-2. リゾリン脂質代謝酵素：リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ 3 (LPCAT3)

4-2-1. In vivo 実験 (HFDS 給餌マウス)

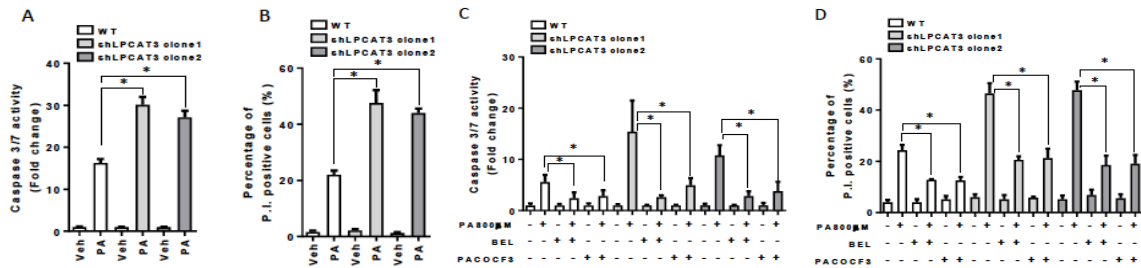
脂肪毒性の本態である飽和脂肪酸の代謝産物であるリゾリン脂質 (LPC) の肝重量当たりの含有量が最も多かった。LPC をアシル化する酵素リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼ (LPCAT) の

Isozyme である LPCAT1-4 発現をリアルタイム PCR で評価したところ、LPCAT3 のみが Cont.、HFD と比較して HFDS で低下していた (左図)。



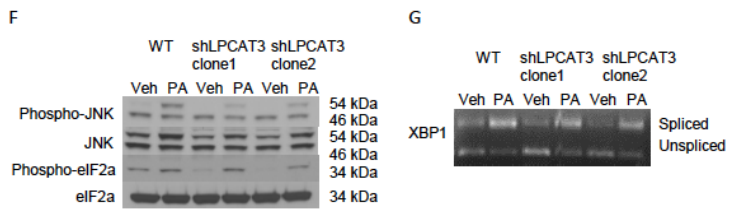
4-2-2. In vitro 実験(LPCAT3 と細胞死)

ヒト肝癌細胞株 Huh-7 細胞を用いて脂肪毒性における LPCAT3 発現低下の意義を検討した。shRNA を用いて LPCAT3 発現抑制を行った shLPCAT の Clone を作成し (clone1, 2) と野生型 (WT) における飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA) による細胞毒性を検証した。shLPCAT3 では PA 投与により細胞死 (PI 染色、Caspase 3/7 assay) が WT よりも増加した。LPC は Phospholipase A2 の作用でフォスファチジルコリンから生成されるため、Phospholipase A2 阻害剤である BEL, PACOCF3 を投与したところ、細胞死が抑制できた。

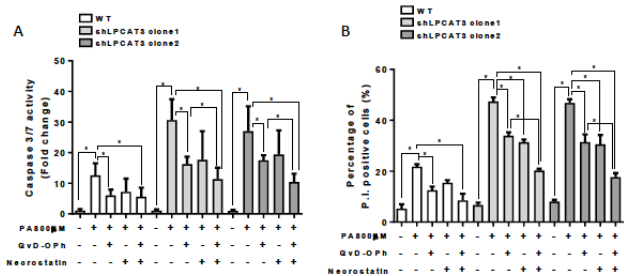


4-2-3. In vitro 実験(LPCAT3 抑制下の脂肪毒性による肝細胞死)

shLPCAT3 で PA による細胞死が増強した機序を明らかにするために、脂肪毒性における肝細胞死の主たる経路とされている小胞体ストレス、JNK リン酸化を確認した。小胞体ストレスは eIF-2 リン酸化、XBP1 splicing で評価した。小胞体ストレス、JNK リン酸化を WT と比較したが、shLPCAT3 と WT では明らかな差はなかった (右図)。

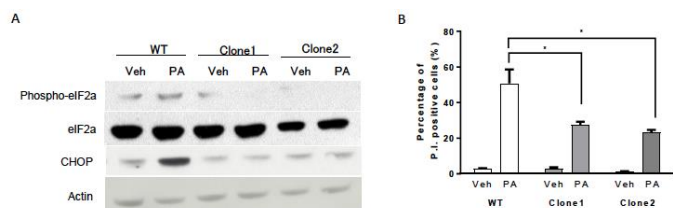


細胞死における Caspase の関与を確認するために Pan-Caspase 阻害剤である QvD-OPH を添加したが、PA による細胞死は shLPCAT3 において抑制できなかった。Caspase 非依存性細胞死を疑い、ネクロプトーシスの経路を阻害するために RIPK1 阻害剤である Necrostatin を併用した。shLPCAT3 において QvD-OPH と Necrostatin の併用は PA による細胞死を強く抑制した (右図)。



4-2-4. In vitro 実験(LPCAT3 強制発現による脂肪毒性への影響)

レンチウイルスベクターを用いて Huh-7 細胞に LPCAT3 を強制発現させた細胞株 (clone1-2) を作成し、PA による脂肪毒性への影響を評価した。LPCAT3 強制発現により PA 投与による CHOP 発現、eIF-2a のリン酸化が抑制され、細胞死も有意に抑制された (右図)。

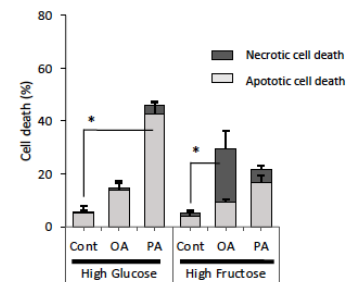


4-3. フルクトースと脂肪毒性

NASH モデルとした HFDS に添加したスクロースはグルコースとフルクトースの 2 糖類である。フルクトース消費量増加に伴い肥満人口も増加したこと、肥満度が上昇すると NAFLD 合併率が增加すること、スクロース添加により NASH モデルが作成できることからフルクトースと脂肪毒性には相乗効果があると仮説を立て、NASH 肝病態における脂肪毒性とフルクトースの関係を検討した。

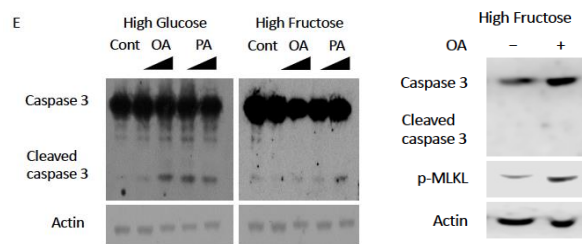
4-3-1. In vitro 実験 (フルクトースと脂肪毒性)

ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞を用いて、グルコース添加培養液を用いた場合、PA のみで強く細胞死が見られた。一方、フルクトース添加培養液では PA と不飽和脂肪酸であるオレイン酸(OA)で細胞死が見られた。それぞれの培養条件で観察された細胞死を蛍光染色 (cat. no. PK-CA707-30017, PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) で確認したところ、PA を負荷した場合の細胞死はいずれの培養条件下でもアポトーシスが主体であった。しかし、フルクトース添加培養条件下の OA による細胞死はネクローシスが主体であった (右図)。



4-3-2. In vitro 実験 (フルクトース・不飽和脂肪酸による細胞死機構)

HepG2 細胞でウエスタンブロット法により詳細な細胞内シグナル伝達を評価したところ、フルクトース添加培養条件下でのオレイン酸負荷ではカスパーゼ 3 の活性化しておらず、蛍光染色と矛盾しない結果であった (右図)。既報をもとにプログラムされた細胞死であるネクロプトーシスについて着目し検証を行った。ネクロプトーシスの実行分子である MLKL がリン酸化していた。細胞死アッセイによる蛍光染色でネクローシスとして捉えた細胞死はネクロプトーシスであった。



NASH における細胞死の原因として活性酸素種 (ROS) が知られていたことから、それぞれの条件で ROS 産生を確認したところ、フルクトース添加培養条件下にオレイン酸を負荷した群では細胞内 ROS が増加を示した。この ROS 増加はパルミチン酸添加では認めなかった。N アセチルシステイン (NAC) を投与したところ同処理群で増強した ROS 産生が抑制された。

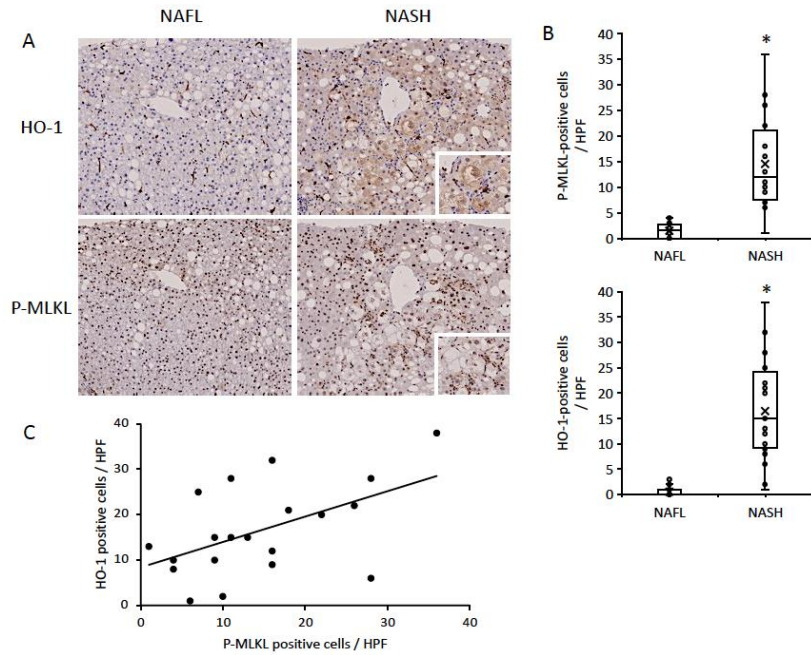
HepG2 は肝癌由来細胞株であり、癌細胞特有の代謝経路を有している可能性があったため、マウス初代培養幹細胞でも検討を行った。フルクトース添加培養条件下で OA を負荷した場合、カスパーゼ非依存性細胞死、MLKL のリン酸化が亢進しておりネクロプトーシスが誘導された。HepG2 と同様に同処理群では ROS の産生が亢進しており NAC の投与で抑制された。

4-3-3. In vivo 実験 (HFDS におけるネクロプトーシスと ROS)

4-1 で作成したものと同様の負荷で、Cont.、HFD、HFDS を作成した。肝酵素や線維化マーカーは HFDS で有意に高値、組織学的に脂肪沈着を認め NASH モデルであることを確認した。このモデルの肝組織を用いて抗酸化作用をもつ Hemoxygenase-1 (HO-1) とリン酸化 MLKL の発現を免疫組織化学染色で確認したところ、Cont.、HFD と比べて HFDS で HO-1、リン酸化 MLKL 陽性細胞数が有意に増加していた。

4-3-4. ヒト肝生検組織を用いた検討

NAFLD8名の肝生検検体（単純脂肪肝4名、NASH4名）を用いて、HO-1陽性細胞数、リン酸化MLKL陽性細胞数を免疫組織化学染色で評価した。単純脂肪肝群と比してNASH群でHO-1、リン酸化MLKL陽性細胞は有意に増加していた。NASH肝の各視野でNASHの組織学的特徴である風船様肝細胞(ballooning)が顕著に見られ、ballooningした肝細胞においてHO-1およびリン酸化MLKLが共に陽性であった。HO-1とリン酸化MLKL陽性細胞数の間には正の相関が確認された(右図)。



4-4. 研究成果のまとめ

NASHモデルマウスにおいてLPCAT3の発現低下により脂肪毒性の本態であるリゾリン脂質が増加し、局所に強い炎症を惹起しうる非アポトーシス細胞死であるCaspase非依存性細胞死が起きることが明らかとなった。更に強制発現させることで、アポトーシス経路である小胞体ストレスが軽減すること、Caspase非依存性細胞死も抑制できることから、リゾリン脂質アシルトランスフェラーゼのうちLPCAT3は治療標的になり得ることがわかった。また脂肪毒性に伴うリン脂質代謝の変化が多様な細胞死の一因になっていることが明らかとなった。

肝細胞に対する高フルクトース環境は、比較的毒性が低いと知られていた不飽和脂肪酸であるオレイン酸負荷でROS産生増加を介してネクロプトーシスを誘導した。高脂肪食によるマウス脂肪肝にスクロースを加えた脂肪肝モデルでも、細胞実験と同様に酸化による傷害とネクロプトーシスが引き起こされていた。更にヒトNASH肝でも同様の結果であった。フルクトースの過剰摂取と脂肪毒性はROS産生増加を介して肝細胞にネクロプトーシスを誘導することでヒトNASH肝の病態の一部を形成していた。フルクトース代謝経路が治療標的になり得る可能性を明らかにできた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kakisaka K, Suzuki Y, Fujiwara Y, Suzuki A, Kanazawa J, Takikawa Y	4. 巻 Epub ahead on print
2. 論文標題 Caspase-independent hepatocyte death: A result of the decrease of lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in non-alcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jgh.14461.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柿坂啓介
2. 発表標題 フルクトースはROS産生亢進を介して不飽和脂肪酸の細胞毒性を増強する
3. 学会等名 酸化ストレスと肝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿坂啓介
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝におけるLPCAT3発現低下は脂肪毒性を増強する
3. 学会等名 酸化ストレスと肝研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 悠地 (Suzuki Yuji) (00779332)	岩手医科大学・医学部・助教 (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	滝川 康裕 (Takikawa Yasuhiro) (50254751)	岩手医科大学・医学部・教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関