

## 論文内容の要旨

c-Jun N-terminal kinase-mediated Rubicon expression enhances hepatocyte lipoapoptosis and promotes hepatocyte ballooning  
(c-Jun N 末端キナーゼに刺激された Rubicon は肝細胞の lipoapoptosis 肝細胞の ballooning を促進させる)  
(鈴木彰子, 柿坂啓介, 鈴木悠地, 王挺, 滝川康裕)  
(World Journal of Gastroenterology 22 巻, 28 号 平成 28 年 7 月掲載)

### I. 研究目的

飽和脂肪酸による肝細胞死は炎症を惹起し, 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の主要な病態と考えられ, 形態的には Balloon hepatocyte (BH) の出現が指標とされている. 飽和脂肪酸は肝細胞にカスパーゼ依存性のアポトーシスを惹起すると同時に, オートファジーを抑制することが報告されている. マウス脂肪肝モデルでオートファジーを促進させると, 肝炎や脂肪肝が改善することから, 飽和脂肪酸はアポトーシス促進とオートファジー抑制の両面から NASH の病態形成に関与していると考えられる. 従って, 飽和脂肪酸によるオートファジー抑制機序の解明は NASH の新規治療法開発につながる可能性がある. 本研究では, ①マウス NASH モデルでオートファジー関連蛋白の発現を評価し, これらを制御する蛋白を明らかにすること, ②培養肝細胞での飽和脂肪酸によるオートファジー制御機構を明らかにすること, ③オートファジーと BH との関連を明らかにすることを目的とした.

### II. 研究対象ならび方法

1. 6 週齢 C57/BL6J マウス各々 5 匹に 12 週間コントロール食 (CT), 高脂肪食 (HFD) を摂取させ, 肝重量と血清 ALT 値を比較検討した. その後, オートファジー関連蛋白の発現をウエスタンブロットで評価した.
2. マウス正常肝細胞株 AML12 を用い, 毒性 (飽和) 脂肪酸のパルミチン酸 (PA) 投与下での細胞増殖能を細胞増殖アッセイで評価した. 次に, PA 投与下でオートファジー関連蛋白, 小胞体ストレス関連蛋白, アポトーシス関連蛋白の発現をウエスタンブロット (WB), 免疫蛍光染色, 定量的 RT-PCR を用いて評価した.

### III. 研究結果

#### 1. マウス NASH モデル

HFD マウスは CT マウスと比較し、有意な体重の増加、血清 ALT 値の上昇を認めた。肝組織所見で、肝細胞の ballooning を伴う脂肪肝を認め、NASH モデルとして矛盾しなかった。肝組織のオートファジー関連蛋白を WB で評価したところ、CT マウスと比較して HFD マウスでは p62 蛋白と同時に LC3 蛋白の発現増加を認めた。オートファゴソーム形成は得られているもののオートリソソーム形成が阻害されていることが示唆された。また、オートリソソーム形成阻害作用が報告されている Rubicon 蛋白は HFD マウスで発現が亢進していた。

2. AML12 に対する PA 投与は、時間・濃度依存的に細胞死を誘導した。PA 投与によりカスパーゼ 3、JNK リン酸化は濃度・時間依存性に発現が亢進した。CHOP、p62、LC3 は、カスパーゼ 3 やリン酸化 JNK よりも短時間・低濃度で発現が亢進し、その後は低下した。Rubicon 蛋白も PA 投与で発現が亢進し、高濃度・長時間では減少した。Rubicon をノックダウンすると、PA による p62 蓄積や細胞死を抑制した。

Rubicon の発現機序を明らかにするため、PA による細胞死の代表的なシグナルである JNK、カスパーゼ 9、汎カスパーゼの阻害剤(それぞれ Sp600125、LEHD-fmk、QVD-OPh) を PA と共に添加した。Sp600125 は、Rubicon の mRNA 発現を抑制しており、Rubicon は JNK により正に制御されていた。また、LEHD-fmk 投与では PA 単独投与と比較して Rubicon の蛋白発現が上昇し、QVD-OPh では上昇しなかったことより、カスパーゼ 9 が Rubicon 蛋白発現を特異的に抑制していることがわかった。更に、LEHD-fmk 添加により小胞体ストレスシグナルである CHOP の蛋白発現量が増加していた。

BH が細胞質内に小胞体ストレスを蓄積していること、脂肪毒性下でカスパーゼ 9 を抑制すると BH と共通の細胞内シグナルを JNK 依存性に活性化することが報告されていたため、カスパーゼ 9 抑制および JNK により発現が亢進する Rubicon との関係を検討した。PA 添加とともに、LEHD-fmk によりカスパーゼ 9 を抑制すると細胞径が増大した。一方、この条件に siRNA による Rubicon ノックダウンを加えると、細胞径の差は解消した。

### IV. 結語

NASH マウスモデルでは Autophagy が抑制され、Rubicon 蛋白の発現が亢進していた。PA は JNK を介して Rubicon の発現を亢進させ、その結果オートファジーを抑制した。Rubicon はアポトーシスシグナルのうちカスパーゼ 9 の活性化により分解され、その結果アポトーシス・オートファジーの両方が亢進し、最終的に細胞死に至ると考えられた。カスパーゼ 9 活性の阻害は Rubicon の分解を抑制し、その結果細胞径を増大させ、BH の形態となった。

脂肪毒性とカスパーゼ 9 抑制による BH 形成仮説に、Rubicon によるオートファジー抑制が関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 齋野 朝幸 (解剖学講座：細胞生物学分野)

副査 教授 石垣 泰 (内科学講座：糖尿病・代謝内科分野)

副査 教授 佐々木 章 (外科学講座)

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の肝細胞では autophagy が低下することが報告され、マウス脂肪肝モデルでは autophagy を誘導すると肝の炎症や脂肪蓄積が改善することがわかっている。本研究論文は毒性脂肪酸のパルミチン酸による細胞死モデルで、autophagosome と lysosome の融合抑制性タンパクである rubicon に着目し、肝細胞の apoptosis の抑制に autophagy の誘導が有用であるかどうか等について細胞生物学的および免疫組織学的に検証した論文である。rubicon の発現亢進が autophagy 抑制の一因と考えられ、その発現が JNK 依存性であることを認めた。また、lipoapoptosis の間での caspase-9 の抑制により、rubicon 発現の持続と培養肝細胞の増大を確認した。本論文により、JNK-rubicon 系の増強により lipoapoptosis が増強し、rubicon および caspase-9 が肝細胞の ballooning に関係する事が初めて明らかになった。

本論文は、脂肪肝および脂肪肝炎の治療の可能性、さらには肝線維化・肝細胞癌への進行の制御法の開発に役立つ有用な知見を示した研究と言える。学位に値する論文である。

### 試験・試問の結果の要旨

本文の要旨についての質問に加え、autophagy および apoptosis、さらに肝臓の組織学に関する諮問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有しているものと認めた。

### 参考論文

- 1) Alpha-fetoprotein: A biomarker for the recruitment of progenitor cells in the liver in patients with acute liver injury or failure (急性肝不全患者の肝再生バイオマーカーとしての AFP) (葛西和博, 他 9 名と共著)
- 2) Hypothyroidism enhanced portal hypertension in a patient with alcoholic liver cirrhosis, resulting in the development of ascites (アルコール性肝硬変患者の甲状腺機能低下症に起因した門脈圧亢進症・難治性腹水症) (柿坂啓介, 他 10 名と共著)