

平成 31 年 5 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05678

研究課題名(和文)統合的ストレス応答の制御によるNAFLDでの肝切除後肝再生障害の新規治療法の解明

研究課題名(英文) Analysis of the effects by the regulation of integrative stress response to impaired liver regeneration in NAFLD

研究代表者

稲葉 有香 (Inaba, Yuka)

金沢大学・新学術創成研究機構・助教

研究者番号：20571970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓の持つ強靱な再生能は、脂肪肝では障害され、肝切除術後の肝不全など合併症を引き起こす。脂肪肝での再生障害の危険性が広く知られる一方で、その病因・治療法は、十分に解明されていなかった。代表者は、脂肪肝での再生障害に、多様な細胞内ストレスに共通して誘導される「統合的ストレス応答」が、主要な役割を果たす事を見出している。本研究では、脂肪肝再生障害メカニズムとして、ストレス誘導性転写因子ATF3が重要な役割を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表者は、脂肪肝における重篤な再生障害を引き起こす誘因として、壊死を伴う細胞死が重要であること、その細胞死の誘導にストレス誘導性転写因子ATF3が重要な役割を担うことを明らかにした。本研究成果は、脂肪肝再生障害における細胞死誘導の新規メカニズムの解明という学術的意義を有する。また、再生障害の重症化の病態理解と新規治療標的に関する新たな知見という社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The liver has robust regenerative potential in response to damage, but hepatic steatosis weakens this potential. That is known the impaired liver regeneration causes complications after surgery, such as liver failure. However the detail of mechanisms was unclear. The enhanced integrated stress response (ISR) is commonly induced by various cellular stress. We found that ISR plays a key role in impaired regeneration of hepatic steatosis. In this study, we revealed that stress induced transcription factor has an important role as the mechanism of liver regeneration disorder in fatty liver disease.

研究分野：肝臓学・代謝学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 肝切除 肝再生 統合的ストレス応答 細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)に伴う肝再生障害は、肝切除術後の肝不全など合併症の誘因となっている。線維化を伴わない単純性脂肪肝においても、肝再生障害を起こしうるという事実は、実験動物での検討のみならず、臨床の場においても広く認識されている。NAFLDにおける肝再生障害の危険性が広く知られる一方で、その病因・治療法については、十分に解明されていなかった。

代表者は、肝臓の再生とその障害メカニズムの解明に取り組んできた。その過程で、脂肪肝再生過程で増強する統合的ストレス応答 (ISR) による肝細胞死促進が、肝再生障害の主因となることを見出している。ISR とは、多様なストレスに共通して誘導されるタンパク翻訳因子 eIF2 α リン酸化(p-eIF2 α)を介したストレス応答であり、ストレス誘導性脱リン酸化酵素 Gadd34 により抑制される。代表者らは、Gadd34 の過剰発現またはノックダウンによる検討から、脂肪肝再生過程での細胞死の多寡が、ISR の強度に相関することを見出している。ISR として、ストレス誘導性転写因子 CHOP・ATF3 の発現増加を介した、ストレス性タンパクの発現誘導から細胞死の誘導に至る幅広いストレス応答が知られている。Gadd34 ノックダウンによる ISR の増強モデルでは、CHOP・ATF3 の発現増加だけでなく、壊死誘導因子 RIPK3 の発現が増加する。RIPK3 は、プログラム壊死(ネクロプトーシス)の重要な調節因子であり、肝再生過程でアポトーシスとは異なる様式の細胞死が誘導される可能性が示唆された。しかし、脂肪肝再生過程における ISR による肝再生障害誘導の詳細な分子メカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

本研究課題では、「統合的ストレス応答の制御による NAFLD での肝切除後肝再生障害の新規治療法の解明」を目的とした。

3. 研究の方法

統合的ストレス応答(ISR)の増強により誘導される脂肪肝再生障害の発症メカニズムの検討の為に、以下の方法で研究を行った。

1) RIPK3 作用阻害の有用性の検討

ISR 増強脂肪肝は、2 週間の高脂肪食負荷による中等度脂肪肝マウスに対する Gadd34 ノックダウン(G-KD) により作成した。ISR 増強脂肪肝に対し、siRNA の尾静脈注射により、RIPK3 ノックダウンを行った。Gadd34/RIPK3 ダブルノックダウンマウス(GR-DKD)に対し、70%肝切除術を行い、肝再生過程を検討した。具体的には、肝再生過程の肝重量、血中 AST/ALT 値、肝細胞死に関連する遺伝子発現及びタンパク発現変化、TUNEL 染色により評価した。

2) CHOP 作用阻害の有用性の検討

上述と同様、Gadd34 ノックダウンによる ISR 増強脂肪肝に対し、siRNA の尾静脈注射により、CHOP ノックダウンを行った。Gadd34/CHOP ダブルノックダウンマウス(GC-DKD)に対し、70%肝切除術を行い、肝再生過程を検討した。評価法は、上述の 3. 1) に準じた。

3) ATF3 作用阻害の有用性の検討

代表者は、ATF3 の NAFLD での肝再生障害における役割を解明するために、本研究計画に先駆けて、肝臓特異的 ATF3 欠損マウス(A-KO)を作成している。そこで、野生型・ATF3 欠損型マウスに対し、2 通りの方法で、肝再生過程で ISR が増強するモデルを作成した。①2 週間の高脂肪食負荷を行い、Gadd34 ノックダウンを、②16 週間の高脂肪食負荷を行い、高度脂肪肝を作成し、70%肝切除術後再生過程を評価した。評価法は、上述の 3. 1) に準じた。

4. 研究成果

1) RIPK3 作用阻害の有用性の検討

脂肪肝再生時の Gadd34 欠損に伴う血漿 ALT 値の増加・壊死の増大を、RIPK3 ノックダウンは、いずれも軽減し、脂肪肝再生障害を改善した。また、GR-DKD 群では、対照と比し、脂肪肝再生過程における p-eIF2 α は差を認めず、CHOP 発現が軽度に減少した。G-KD 群で増加した、肝切除後の TUNEL 陽性細胞(死細胞)が、GR-DKD 群では減少した。一方で、抗アポトーシス因子 BclxL とプロアポトーシス因子 Bax の発現量、及び BclxL/Bax 比は、GR-DKD 群と対照群で明らかな変化を示さなかった。活性型カスパーゼ 3 も、RIPK3 ノックダウンによる変化を示さなかった。TUNEL 染色はネクロプトーシス細胞においても陽性となることが知られており、これらの結果は、RIPK3 ノックダウンによる、ネクロプトーシスの軽減を示唆している。また、肝組織学的検討では、G-KD 群で、肝再生過程に孤発性細胞死だけでなく、壊死を伴う広汎細胞死が誘導されるが、GR-DKD 群では、広汎細胞死のみが抑制され、孤発性細胞死は残存した。以上の結果より、RIPK3 のノックダウンは、ネクロプトーシスの抑制により、

広汎細胞死を阻害し、肝再生障害を改善した可能性が示唆された。

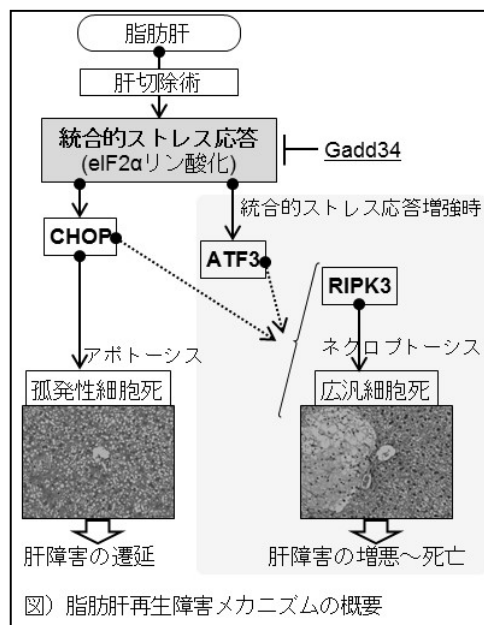
2) CHOP 作用阻害の有用性の検討

脂肪肝再生過程の p-eIF2 α は、G-KD 群と GC-DKD 群で有意な差を示さなかった。すなわち、両群での統合的ストレス応答は同等であることを示唆している。一方で、切除後肝再生過程の血漿 ALT 値は、GC-DKD 群で持続的に減少した。また、G-KD 群では、壊死を伴う広汎細胞死を認めたが、CHOP をノックダウンすることにより、広汎細胞死が消失し、肝再生障害が改善した。TUNEL 染色による検討では、GC-DKD 群は、対照と比し、脂肪肝切除後肝再生過程での広汎細胞死だけでなく、孤発性細胞死も減少させた。細胞死関連因子の検討の結果、CHOP ノックダウンは、BclxL/Bax 比を有意に増加させた。また、G-KD による活性型カスパーゼ 3 の増強が、CHOP ノックダウンにより減弱した。さらに、G-KD により増加した、脂肪肝再生過程での RIPK3 発現が、CHOP ノックダウンにより減少した。以上の結果より、CHOP のノックダウンは、アポトーシス・ネクロプトーシスを抑制することにより、孤発性細胞死・広汎細胞死の両者の発症を阻害し、肝再生障害を改善した可能性が示唆された。

3) ATF3 作用阻害の有用性の検討

Gadd34 ノックダウンによる ISR 増強脂肪肝においては、A-KO 群では、脂肪肝再生過程の脂肪肝再生過程の血漿 ALT 値が有意に減少し、壊死を伴う広汎細胞死が消失し、肝再生障害が改善した。一方で、p-eIF2 α は、A-KO 群と対照群で有意な差を示さず、両群での統合的ストレス応答は同等であることが示唆された。TUNEL 染色の結果、A-KO 群では、脂肪肝切除後肝再生過程での広汎細胞死のみが消失し、孤発性細胞死は残存した。細胞死関連因子の検討の結果、ネクロプトーシス誘導因子 RIPK3 の発現が A-KO 群で減少した。一方、アポトーシスに関連する CHOP 発現、BclxL/Bax 比、活性型カスパーゼ 3 は、両群間で有意な差を認めなかった。高度脂肪肝においても同様の結果を得た。これらの結果は、ATF3 欠損は、アポトーシスではなく、ネクロプトーシスを阻害することにより、広汎細胞死の発症を阻害し、肝再生障害を改善する可能性を示唆している。

本研究課題において、脂肪肝再生過程における ISR 増強は、CHOP・ATF3 の発現を亢進し、「アポトーシス」と、RIPK3 を介した「ネクロプトーシス」を誘導し、肝再生を障害する可能性が示唆された(図)。また、重篤な肝再生障害の改善には、脂肪肝再生過程のネクロプトーシスの阻害が重要であること、その制御因子として、ATF3 が重要な役割を担う可能性を見出した。しかし、その詳細な分子メカニズムはまだ明らかではなく、その解明は今後の課題である。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件) (全て査読有)

1. Kimura K, Inaba Y*, Watanabe H, Matsukawa T, Matsumoto M, Inoue H. Nicotinic alpha 7 acetylcholine receptor deficiency exacerbates hepatic inflammation and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Diabetes Investig.* 2019 May;10(3):659-666. doi: 10.1111/jdi.12964.
2. Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Asahara S, Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M. PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes. *Sci Rep.* 2018 Sep 24;8(1):14290. doi: 10.1038/s41598-018-32575-z.
3. Watanabe K, Igarashi M, Li X, Nakatani A, Miyamoto J, Inaba Y, Sutou A, Saito T, Sato T, Tachibana N, Inoue H, Kimura I. Dietary soybean protein ameliorates high-fat diet-induced obesity by modifying the gut microbiota-dependent biotransformation of bile acids. *PLoS One.* 2018 Aug 13;13(8):e0202083. doi: 10.1371/journal.pone.0202083. eCollection 2018.
4. Watanabe H, Inaba Y, Kumi Kimura, Michihiro Matsumoto, Shuichi Kaneko, Masato Kasuga, and Hiroshi I. Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein. *Nat Commun.*; 2018 Jan 2;9(1):30. doi: 10.1038/s41467-017-02537-6.
5. Onogi Y, Wada T, Kamiya C, Inata K, Matsuzawa T, Inaba Y, Kimura K, Inoue H,

- Yamamoto S, Ishii Y, Koya D, Tsuneki H, Sasahara M, Sasaoka T. PDGFR β regulates adipose tissue expansion and glucose metabolism via vascular remodeling in diet-induced obesity. *Diabetes*. 2017 Apr;66(4):1008-1021. doi: 10.2337/db16-0881.
6. Watanabe H, Inaba Y, Kimura K, Asahara SI, Kido Y, Matsumoto M, Motoyama T, Tachibana N, Kaneko S, Kohno M, Inoue H. Dietary Mung Bean Protein Reduces Hepatic Steatosis, Fibrosis, and Inflammation in Male Mice with Diet-Induced, Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Nutr*. 2017 Jan;147(1):52-60. doi: 10.3945/jn.116.231662.
 7. Morimoto M, Lee EY, Zhang X, Inaba Y, Inoue H, Ogawa M, Shirasawa T, Yokosuka O, Miki T. Eicosapentaenoic acid ameliorates hyperglycemia in high-fat diet-sensitive diabetes mice in conjunction with restoration of hypoadiponectinemia. *Nutr Diabetes*. 2016 Jun 27;6:e213. doi: 10.1038/nutd.2016.21.
 8. Kimura K#, Tanida M#, Nagata N, Inaba Y, Watanabe H, Nagashimada M, Ota T, Asahara S, Kido Y, Matsumoto M, Toshinai K, Nakazato M, Shibamoto T, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H. Central Insulin Action Activates Kupffer Cells by Suppressing Hepatic Vagal Activation via the Nicotinic Alpha 7 Acetylcholine Receptor. *Cell Rep*. 2016 Mar 15;14(10):2362-74. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.032. (#; contributed equally)
 9. Inaba Y#, Furutani T#, Kimura K, Watanabe H, Haga S, Kido Y, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, Inoue H. Growth arrest and DNA damage-inducible 34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2015 Apr;61(4):1343-56. doi: 10.1002/hep.27619. (# ; contributed equally)

〔学会発表〕（計 16 件）

1. 稲葉有香：第 30 回分子糖尿病学シンポジウム「脂肪肝再生障害における肝細胞死様式の役割とその選択メカニズム」2018 年 12 月 1 日（東京）
2. 稲葉有香：自然科学研究機構生理学研究所研究会「脂肪肝再生過程における ATF3 の役割」2018 年 9 月 22 日（岡崎）
3. 稲葉有香、春日雅人、井上啓：第 5 回肝臓と糖尿病・代謝研究会「脂肪肝再生過程で生じる肝細胞死様式誘導メカニズム」2018 年 7 月 21 日（鳥取）
4. Inaba Y, Inoue H: Australia-Japan Meeting on Cell Death “The role of cell death induced by integrated stress response in fatty liver regeneration” 2018 年 5 月 22 日（東京）
5. 稲葉有香、渡辺一史、木村久美、井上啓：第 38 回日本肥満学会 脂肪肝 I 「脂肪肝再生障害における統合的ストレス応答による細胞死誘導のメカニズムの検討」2017 年 10 月 7 日（大阪）
6. 稲葉有香、春日雅人、井上啓：第 35 回内分泌代謝学サマーセミナー YEC シンポジウム「肝再生過程における統合的ストレス応答による細胞死誘導メカニズムの解明」2017 年 7 月 14 日（群馬）
7. 稲葉有香、井上啓：第 27 回日本レチノイド研究会（若手シンポジウム）「脂肪肝と統合的ストレス応答による細胞死」2016 年 10 月 23 日（東京）
8. 稲葉有香、春日雅人、井上啓：第 37 回日本肥満学会「脂肪肝再生過程での細胞傷害関連転写因子の役割」2016 年 10 月 7 日（東京）
9. 稲葉有香：平成 28 年度 自然科学研究機構生理学研究所研究会 臓器相関による生体制御システムとその変容の仕組み「脂肪肝における肝再生障害のメカニズムの解明」2016 年 9 月 11 日（岡崎）
10. 稲葉有香、北嶋繁孝、春日雅人、井上啓：第 21 回 アディポサイエンスシンポジウム「脂肪肝再生過程での細胞傷害関連転写因子の役割 (The role of transcriptional factor associated with cell death in fatty liver regeneration)」2016 年 8 月 20 日（大阪）
11. 稲葉有香、渡辺一史、木村久美、井上啓：第 34 回 内分泌代謝学サマーセミナー「脂肪肝再生過程での肝細胞障害関連転写因子の役割」2016 年 7 月 15 日（福岡）
12. 稲葉有香、春日雅人、井上啓：第 89 回日本内分泌学会学術総会「脂肪肝での肝再生障害における肝細胞死誘導メカニズムの解明」2016 年 4 月 21 日（京都）
13. 稲葉有香、春日雅人、井上啓：第 36 回日本肥満学会「脂肪肝再生における統合的ストレス応答による肝細胞死誘導メカニズムの解明」2015 年 10 月 2 日（名古屋）
14. 稲葉有香、春日雅人、井上啓：第 20 回 アディポサイエンスシンポジウム「脂肪肝再生過程における肝細胞死制御に対する統合的ストレス応答の重要性 (The integrated stress response promotes hepatocyte death during regeneration of fatty liver)」2015 年 8 月 22 日（大阪）
15. 稲葉有香、芳香早苗、尾崎倫孝、春日雅人、井上啓：第 33 回 内分泌代謝学サマーセミナー「統合的ストレス応答による脂肪肝再生障害の分子メカニズムの解明」2015 年 7 月 9 日（福岡）
16. 稲葉有香、芳香早苗、尾崎倫孝、春日雅人、井上啓：第 22 回 肝細胞研究会「統合的ストレス応答による脂肪肝再生障害の分子メカニズムの解明」2015 年 6 月 5 日（鳥取）

[その他]
ホームページ等

<http://inoue.w3.kanazawa-u.ac.jp/index>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。