

論文の内容の要旨

論文題目 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態進展における脂質生合成経路の役割

氏名 川村 聡

近年我が国での食習慣の欧米化に伴い、肥満人口が増加し、肝臓に脂肪が蓄積する脂肪肝炎(nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD)罹患者数の増加が指摘されている。その中でも非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic steatohepatitis : NASH)とは、NAFLD の炎症・肝障害・線維化が特に顕著な形態であり、肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma : HCC)へと高率に至る。NASH を背景とした HCC 患者が増加している事が、我が国の非 B/非 C 型 HCC が増加傾向にある原因と推測される。しかし、NASH については未だ承認された治療薬が無く、新たな薬の開発が望まれている。

NAFLD 患者における肝障害は、活性化された肝臓での *De novo* 脂質合成による Lipotoxicity によるものと言われている。よって、脂質合成に関わる Fatty acid synthase (FASN)や Sterol-CoA desaturase 1(SCD1)といった酵素を標的とした薬の開発が進んでいる。これらの酵素活性を正に制御する脂質合成のマスターレギュレーターである分子が Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)であり、よって SREBP 阻害がより効果的な NAFLD の治療薬となる可能性があり治療ターゲットとして注目されている。しかし、SREBP の阻害が NASH と NASH 関連 HCC を予防するというはっきりとしたエビデンスは我々の知る範囲ではまだ無い。

よって、今回我々は SREBP の阻害が NASH と HCC の進展に及ぼす影響を調べる為に、SREBP が constitutive に活性化されている肝臓特異的 PTEN Knock out (KO)マウス ($PTEN^{ΔL}$)を $Pten^{lox/lox}$ マウスと Albumin-Cre (*Alb-Cre*)マウスを掛け合わせて作成し、このマウスで SREBP のエスコート蛋白である SCAP を阻害する事で SREBP 経路を阻害した。SREBPs は Endoplasmic reticulum に前駆体として存在しており、エスコート蛋白である SCAP に切断されて、Golgi apparatus に輸送され、SREBP は切断され N 末端部分が活性型として核内に移行して標的遺伝子の転写を活性化する。そして SREBPs は SREBP-1a、SREBP1c そして SREBP-2 というアイソフォームがあるが、SCAP の KO は SREBP のすべてのアイソフォームの活性を阻害する事ができる事が知られている。

しかし予想に反して $PTEN^{ΔL}$ マウスで SREBP 経路を阻害すると強い肝障害や肝線維化を呈し HCC 形成を促進する事が判明した。この予想外の表現型のメカニズムを探るために研究をする事とした。

<方法と結果>

$PTEN^{ΔL}$ マウスに $SCAP^{lox/lox}$ マウスを掛け合わせて肝臓特異的 $PTEN/SCAP$ double knock-out(DKO)マウスを作成した($PTEN/SCAP^{ΔL}$)。5 週齢の $PTEN/SCAP^{ΔL}$ マウスでは黄疸と血清

ALT ALP の上昇を認め ductal reaction とされる門脈周囲の強い炎症を認めた。

Immunohistochemical (IHC)分析でも炎症性細胞浸潤を肝臓で認め、細胞死のマーカーである Caspase-3 陽性細胞の割合も上昇していた。FASN や Scd1 などの SREBP-1 ターゲット遺伝子の mRNA レベルは *PTEN*^{ΔL} マウスで増加し SCAP KO 追加で有意に低下していることから、*PTEN*^{ΔL} マウスで SCAP を KO する事で肝脂肪化を抑制できるが、予想に反して著明な肝障害誘導させる事が確認された。

PTEN/SCAP^{ΔL} マウスは5週齢で血清 ALT 値が急激に上昇するがその後徐々に ALT 値は減少していき、200-300IU/l 程度を継続する。こういった慢性肝障害の結果として5ヵ月齢の *PTEN/SCAP*^{ΔL} においては著明な肝線維化を認め、ほぼ肝硬変と言えるような状態であった。そして7ヵ月齢では *PTEN*^{ΔL} マウスは強い脂肪肝を呈するのみであるのに対し、*PTEN/SCAP*^{ΔL} マウスでは驚くべき事に多発肝癌を呈した。

さて、*PTEN/SCAP*^{ΔL} マウスでの肝障害の結果が、確かに SREBP 経路の阻害によるものである事を確かめる為に、マウスに活性化 SREBP1-a が発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせた(*PTEN/SCAP*^{ΔL}; *SlaTg* マウス)。驚くべき事に、5週齢 *PTEN/SCAP*^{ΔL} マウスに比べて5週齢 *PTEN/SCAP*^{ΔL}; *SlaTg* マウスは著明な肝障害の改善を認め、脂肪肝を呈するいわゆる単純性脂肪肝といわれる状態であった。またこの *PTEN/SCAP*^{ΔL}; *SlaTg* マウスマウスは *PTEN/SCAP*^{ΔL} マウスに比べて5ヵ月齢での線維化も著明に改善し、7ヵ月齢での腫瘍形成は著明に低下していた。

つまりこれら結果から、マウスにおける肝障害、線維化と発癌は SREBP 活性阻害によって引き起こされている事が分かった。

マウスにおける肝障害のメカニズムを解明する為に5週齢の各遺伝型マウス肝組織を用いて RNA sequencing を行った。マウスでは unfolded protein response 経路の上昇がみられ、ER stress の関連が示唆された。周囲環境による2次的な要因を排除するため、*PTEN/SCAP*^{ΔL} マウスから primary hepatocyte を抽出して Cre-recombinase を発現する adenovirus を投与して *PTEN/SCAP*^{ΔL} の遺伝子組み換えを誘導したところ、ER stress marker である CHOP と pEIF2α タンパクの発現が誘導され、よってマウスにおける肝障害は肝細胞内で *PTEN/SCAP*^{ΔL} が KO さえる事における現象である事が確認された。また ER stress を軽減する作用をもつ GRP78 を adenovirus を用いてマウスに強制発現させると、CHOP タンパクは減少し肝障害も改善した。よって、マウスの肝障害は少なくとも部分的には ER stress による引き起こされているといえる。

より全体的な脂質プロファイルを理解する為に我々は各遺伝型の肝臓の LC-MS による脂質成分解析を行った。この中で phosphatidylcholine(PC)の構成が大きく変化しており、マウスにおいては調査不飽和脂肪酸(poly unsaturated fatty acid: PUFA)を含む PC で減少しており、かつこういった PUFA を含む PC の減少が ER stress に関与している事は知られていた。実際に PC カクテルをマウスに党紆余する事で著明に肝障害が改善した。

実際に肝障害が改善した5週齢のマウスではマウスに比べて PUFA を含む PC が増加して

いた。さて PUFA を PC に取り込む酵素である Lpcat3 酵素があるがこの酵素の発現が *PTEN/SCAP^{ΔL}* マウスにおいては減少し、他の LPCAT family である Lpcat1 Lpcat3 Lpcat4 の発現は増加していた。よって、マウスでの肝障害は脂肪酸合成のみならず、脂肪酸のリン脂質への取り込み制御の異常によって引き起こされている可能性が考えられた。

しかし、PUFA を含む PC は SCAP マウス肝臓でも減少していたがマウスでは特に肝障害を認めなかったため、PTEN KO により肝障害に至る何らかの要因が必要である。PTEN の KO によって AKT-mTOR パスウェイが活性化する事が知られており、AKT-mTOR パスウェイは autophagy 阻害効果があり、これは一般的に ER stress に繋がる事が知られている。実際 autophagy の基質である p62 タンパク発現が *PTEN/SCAP^{ΔL}* マウスで増加しており、*PTEN/SCAP^{ΔL}* マウスでの autophagy 抑制が示唆された。また、mTOR inhibitor である PP242 を投与すると p62 タンパク CHOP タンパクの発現が改善している事から、やはり PTEN KO による AKT-mTOR パスウェイを通じた autophagy 抑制が *PTEN/SCAP^{ΔL}* マウスにおける肝障害に寄与している可能性が示唆された。

<考察>

我々の実験結果からは、SREBP 経路の強力な阻害はむしろ肝障害を悪化させる可能性がある事を示唆しており、NASH の治療という観点からこれはとても重要な知見である。実際に、進行したヒトの Burned-out NASH では脂肪蓄積が減少し SREBP を介した脂質合成はむしろ抑制されている事が知られている。つまり適度な SREBP 活性の維持が肝臓の恒常性には必要である可能性が示唆される。

又、*PTEN^{ΔL}* マウスは主に *De novo* 脂質合成経路の活性化による脂肪肝のモデルであり、High fat food を与えるモデルよりよりヒトの NASH に近いと思われる。また PTEN KO でみられるオートファジー抑制はヒトの NASH でも観察されている。よって、今回我々の使用した *PTEN/SCAP^{ΔL}* マウスは Burn-out NASH のモデルとして適切なものであると言える。