

審査の結果の要旨

氏名川村 聡

本研究は NASH において脂質合成が果たす役割を明らかにするために、肝特異的 PTEN/SCAP Double Knockout (DKO)マウスの詳細な解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. 本研究では肝特異的 PTEN/SCAP DKO マウス(*PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>*)を用いた。NASH のモデルマウスとして用いられる肝特異的 PTEN KO (*PTEN<sup>ΔL</sup>*)マウスでは Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs)が常に活性化されており脂肪肝から 12 か月以上の経過で肝癌を発症する事が知られているが、この *PTEN<sup>ΔL</sup>* マウスで SREBP の活性化に必須の分子である SCAP を KO し脂質合成を低下させる事で NASH と NASH 関連肝癌の進展における脂質合成経路の役割を解析した。5 ヶ月齢の *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスでは肝細胞の脂肪沈着は *PTEN<sup>ΔL</sup>* マウスに比べて改善していたものの、門脈域に沿った炎症細胞浸潤を認め、肝硬変と言っていいような激しい線維化を認めた。7 か月齢では、*PTEN<sup>ΔL</sup>* マウスでは殆ど肝癌形成は認めなかったが、*PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスでは驚くべき事に多発肝癌を認めた。よって、*PTEN<sup>ΔL</sup>* マウスで脂質合成を阻害すると肝硬変から肝癌を発症するという全く予想外の結果が得られた。そして SCAP による活性化を機能発現に必要としない活性型 SREBP1a のトランスジェニックマウスを *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスに掛け合わせ(*PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>; S1aTg* マウス) SREBP 機能を回復させたところ、5 週齢での *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスの激しい肝障害は著明に改善し単純性脂肪肝となり、また長期の観察においても *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスにおける 5 ヶ月齢の線維化と 7 か月齢の発癌は著明に改善した。つまり、*PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスで観察したフェノタイプは SREBP 機能不全による脂質合成異常が原因である事がわかった。また、この *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスの組織像は、NASH の線維化が進行し脂肪沈着がむしろ減少した Burned-out NASH の組織像に酷似していた。そして重要な事にヒトの Burned-out NASH においても SREBP 経路が低下している事が報告されており、我々の実験結果と合わせて Burned-out NASH で生じている脂質合成低下はそれ自体が NASH から肝硬変・肝癌へと病態進展を加速させる因子なのではないかという仮説を立て、検討を進めた。
2. 各ジェノタイプの肝検体を用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行ったところ、*PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスでは ER stress が活性化していた。実際 *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスの肝臓では CHOP 等の ER stress マーカーのタンパク発現が亢進していた。そして ER stress を軽減する作用を持つシャペロンタンパクである GRP78 の強制発現が *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスの肝障害を著明に改善させたことから *PTEN/SCAP<sup>ΔL</sup>* マウスの肝障害

は、ER stress が大きく関与している事がわかった。次に、生体のマウス肝での外部環境による二次的な影響を除外する為に、cre 陰性  $PTEN^{fl}/SCAP^{fl}$  マウスから初代肝細胞を培養し、cre 発現アデノウイルスを用いて *in vitro* で遺伝子改変を誘導したところ、この実験でも ER stress マーカーの上昇がみられ、DKO 肝細胞は培養液中の脂質濃度が低下するに従って ER stress マーカー発現の増加を伴い細胞死していく事がわかった。すなわち  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスにおける ER stress は、肝細胞において起こるこれらの遺伝子改変が原因である事がわかり、また肝細胞はその生存を外因性脂質に依存している事が明らかとなった。

3.  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスにおける ER stress の原因となっている脂質を同定する為に各ジェノタイプ肝臓を用いた LC-MS による網羅的脂質分析をおこなったところ、多価不飽和脂肪酸を構成として持つ Phosphatidylcholine (PC) が  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスで低下している事がわかった。多価不飽和脂肪酸を含む PC の肝臓における低下は膜の流動性低下を伴い ER stress を惹起する事が報告されており、実際 PC カクテルを  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスに投与すると ER stress の改善をともなって肝障害が改善した事から  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスでも同様の現象が起こっている事が考えられた。又多価不飽和酸を PC に取り込む酵素である *Lpcat3* の発現が  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスで低下しており、DKO 初代肝細胞で *Lpcat3* を強制発現したところ、ER stress の改善を認めた。よって  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスでは *Lpcat3* の低下による不飽和脂肪酸の PC 取り込み阻害とそれによる PC プロファイルの異常が ER stress の原因である事が示唆された。
4. SCAP KO に PTEN KO を追加するとどうして激しい肝障害生じるのかという事に関しては、 $PTEN/SCAP^{ΔL}$  でオートファジーの基質である p62 タンパク質が蓄積しており、かつ mTOR inhibitor である PP242 の  $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスへの投与が肝障害を改善した事から PTEN KO による mTOR の活性化とそれによるオートファジーの低下が脂質合成阻害と協調的に肝障害を引き起こしているという仮説が考えられた。Autophagy に必須の分子である ATG5 を用いて肝特異的 ATG5/SCAP DKO マウス ( $ATG5/SCAP^{ΔL}$ ) を作成したところ、ATG5 KO マウス ( $ATG5^{ΔL}$ ) に比べて  $ATG5/SCAP^{ΔL}$  マウスでは肝障害の増悪が見られ、SCAP KO による脂質合成阻害はオートファジー阻害と協調的に肝障害を増悪させる事が実証され、我々の仮説を支持する結果が得られた。

以上本論文は、 $PTEN/SCAP^{ΔL}$  マウスにおける肝障害は 1)脂質合成阻害と不飽和脂肪酸のリン脂質への取り込み阻害による ER stress と 2)PTEN KO によるオートファジー障害が協調的に作用して生じるものである事を示した。また本マウスモデルの結果をヒトの臨床に当てはめると、NASH において強力に脂質合成を阻害する事はむしろ病態を悪化させる可能性があり、進行 NASH で生じている SREBP 機能低下はリン脂質組成の変化を介して病態進行を促進している可能性がある事を明らかにし、NASH の新たな病態解明と新しい治療法の開発に重要な貢献をなすものと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。

