

92. リン脂質代謝異常に基づく NASH の多角的病態解明

中川 勇人

三重大学 大学院医学系研究科 消化器内科学

Key words : 非アルコール性脂肪肝炎, 肝細胞癌, リン脂質, SREBP, 脂質合成

緒 言

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) は、肝細胞への脂肪沈着に加え、炎症・線維化を伴い、肝硬変や肝癌へと至る進行性の疾患であるが、未だ治療薬として承認された薬剤がない。また NASH 患者の予後に最も影響を与える因子は肝線維化であることから、特に肝線維化が進行した NASH に対する新たな治療法の開発が急務である。NASH は肝臓への脂肪沈着を特徴とするが、実際には肝線維化が進行すると肝組織中の脂肪沈着はむしろ減少・消失し、burned-out NASH と呼ばれる状態となり、肝硬変や肝発癌の高リスク群であることが知られている。burned-out NASH では脂質合成のマスターレギュレーター SREBP1c の発現が減少し、脂質合成が低下していることが一つの原因と報告されているが、burned-out という現象が NASH の病態進展においてもつ意義はほとんどわかっていない。我々はこれまで NASH 進展における脂質合成経路の役割について解析してきたが、予期せぬところから burned-out NASH を模倣したマウスモデルを樹立することに成功した。そこで本研究では、同モデルを用いて進行 NASH の病態について解析し、特にリン脂質代謝に着目して研究を行った。

方法および結果

1. NASH モデルマウスで SCAP を欠損させると肝臓の壊死炎症・線維化・発癌が増悪する

我々は以前に NASH・肥満関連肝臓に起きている代謝変化を網羅的に解析し、SREBP 活性化に伴う脂質合成亢進は NASH・肥満関連肝臓だけでなく肝細胞癌において幅広くみられる現象であることを見出した[1, 2]。そこで SREBP 活性化阻が NASH および肝臓の予防・治療につながるのではないかと考え、マウスモデルによる検証を行った。NASH 肝臓モデルとして、SREBP 活性化を伴って NASH から肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) を発症する肝臓特異的 *PTEN* 欠損マウス (Alb-Cre;*PTEN*^{F/F}) を用い、さらに SREBP 活性化に必須の分子 SCAP を欠損させたマウスを交配させ、肝臓特異的 *PTEN* 欠損 SREBP 不活性化マウスを作製した (Alb-Cre;*PTEN*^{F/F}; *SCAP*^{F/F}→*PS-DKO* マウス)。SREBP は活性化の際にエスコートタンパク SCAP により小胞体からゴルジ体に輸送される必要があり、SCAP が欠損すると SREBP 活性化がほぼ完全に阻害される。*PS-DKO* マウスでは予想通り肝細胞の脂肪滴形成が著明に抑制されたが、肝細胞障害・炎症はむしろ悪化し、5 か月齢で肝硬変、さらに 7 か月齢で多発肝臓を発症するという全く予想に反する結果となった (図 1a, b)。また別の NASH 肝臓モデルであるコリン欠乏高脂肪食モデルにおいても、同様の結果が得られた。ヒト NASH でも線維化が進行すると次第に肝脂肪蓄積が減少することが知られ、burned-out NASH と呼ばれているが、重要なことに、burned-out NASH では SREBP の発現レベルがむしろ低下することが報告されている。すなわち、本マウスモデルの実験結果と合わせて、進行 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・肝臓へと病態進展を加速させる因子なのではないかと仮説を立て検証することとした。

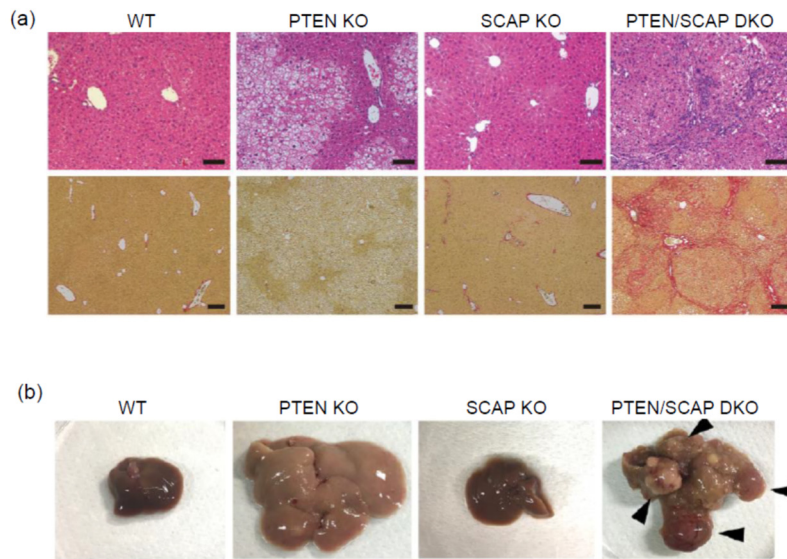


図 1. NASH 肝癌マウスモデルにおける SREBP 阻害効果

- a) 各マウスの 5 か月齢での肝臓病理像。上段：H&E 染色、下段：Sirius Red 染色。scale bar：上段 100 μ m、下段 250 μ m。
 b) 7 か月齢の PTEN KO マウスと PTEN/SCAP DKO マウスの肝臓肉眼像。

2. SREBP 機能回復による肝障害改善効果

SCAP 欠損によって NASH 肝癌が促進されることがわかったが、SCAP に SREBP 活性化以外の作用が存在する可能性が否定できない。そこで PS-DKO マウスに、SCAP による活性化を必要としない活性型 SREBP1a の肝臓特異的トランスジェニックマウスを交配させることによって、SREBP 機能を回復させる実験を行った (DKO+S1aTg マウス)。すると DKO+S1aTg マウスでは炎症細胞浸潤や肝細胞死が著明に改善し、いわゆる“単純性脂肪肝”となった。さらに長期観察すると肝線維化・発癌も著明に抑制された。また AAV ベクターを用いて SREBP 機能を回復させた実験でも同様の結果が得られた (図 2)。したがって PS-DKO マウスで起きている肝障害は SREBP 機能の喪失によるものであることが証明されるとともに、脂質生合成の回復が治療につながる可能性が示唆された。

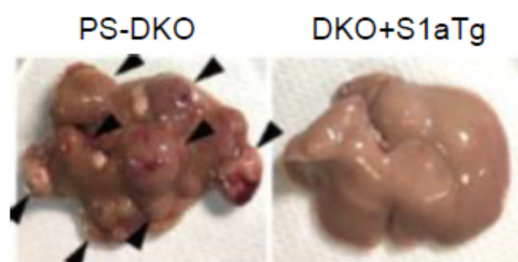


図 2. SREBP 機能回復による肝発癌抑制効果

7 か月齢の PS-DKO マウスおよび DKO+S1aTg マウスの肝臓肉眼像。

3. 脂質生合成機能障害による肝病態悪化にはリン脂質代謝異常が関与している

次いで PS-DKO マウスで起きている事象を明らかにするため、各 genotype のマウス肝組織を用いてトランスクリプトーム解析を行った。PTEN/SCAP DKO マウスでは、予想通り脂質代謝関連経路が著明に低下している一方で、小胞体ストレスシグナル経路が著明に活性化していた。そこで小胞体ストレスを軽減する作用を持つ分子シャペロンである GRP78 をアデノウイルスベクターによって PS-DKO マウスの肝臓に導入したところ、有意に肝障害が改善した。

次に PS-DKO マウスの肝組織を用いて GC-MS、LC-MS による網羅的リポミクス解析を行ったところ、リン脂質に組み込まれている脂肪酸の組成が大きく変化していることがわかった (図 3a)。特に小胞体膜の流動性維持に重要な C20:4 などの多価不飽和脂肪酸 (poly-unsaturated fatty acid : PUFA) を含むホスファチジルコリン (PC) が減少していたことから (図 3b)、PS-DKO マウスでは、*de novo* 脂肪酸合成能低下の結果として小胞体膜リン脂質の組成が変化し、小胞体ストレスが発生しやすい状況が生じているものと考えられた。そこで PS-DKO マウス由来初代肝細胞に、小胞体膜に取り込まれる特性を持つリポソームを用いて PUFA を含む PC 導入する実験を行ったところ、小胞体ストレスが有意に減弱した。さらに PS-DKO マウスに PC カクテルを補充することによって、小胞体ストレス・肝障害が有意に改善したことから、脂質生合成阻害は小胞体膜におけるリン脂質組成異常を介して小胞体ストレス・肝障害を惹起すると考えられた。

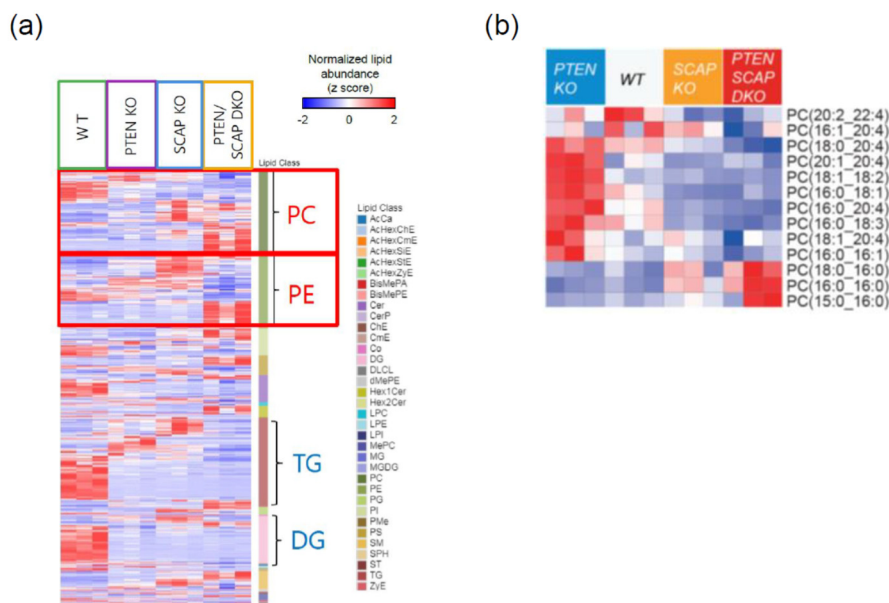


図 3. 網羅的リポミクス解析

- a) 各ジェノタイプの 5 週齢マウスの肝組織を用いた網羅的リポミクス解析。
- b) a) のホスファチジルコリンの部分拡大したヒートマップ。

4. SREBP 阻害は LPCAT3 によるリン脂質リモデリング障害を介してリン脂質代謝の恒常性破綻を招く

次に SREBP 機能を回復させることによってリン脂質組成異常が改善するか検討した。PS-DKO マウスと DKO+S1aTg マウスの肝組織中脂質プロファイルと比較したところ、脂質生合成全体が回復する一方で、PC 分画においては PUFA を含む PC だけが選択的に増加し、飽和脂肪酸からなる PC は減少していた。よって PS-DKO マウスにおいているリン脂質組成変化は、脂肪酸の合成低下だけでは説明できないことがわかった。生体膜リン脂質は新規合成と脂肪酸リモデリングの二つの過程を経て合成され、特に PUFA はリモデリングの過程で導入されるが、PS-DKO マウスでは脂肪酸リモデリングに関わるリゾリン脂質アシル転移酵素群の発現パターンが大きく変化していた。特に PUFA を PC へ組み込む酵素である LPCAT3 の発現は、PS-DKO マウスで大きく減少し、SREBP 導入によって回復することがわかった。そこで PS-DKO マウス由来初代肝細胞にアデノウイルスを用いて LPCAT3 を導入すると、その発現量に応じて小胞体ストレスが減弱した。さらに SREBP 機能障害による LPCAT3 発現低下は、核内転写因子 LXR の活性低下によるものであることもわかり、実際に LXR 作用薬によって PS-DKO マウスの肝障害が改善した。

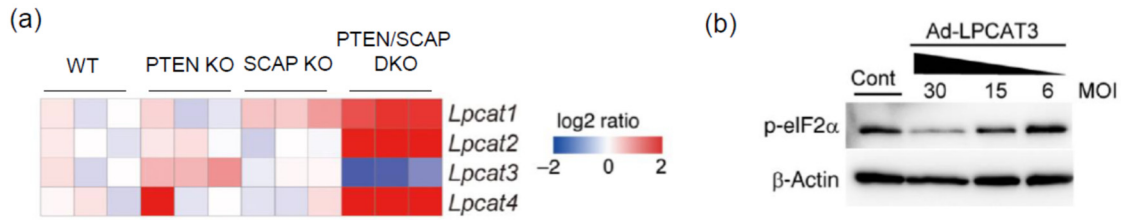


図4. LPCAT3の発現低下を介した小胞体ストレスの誘導

- a) 各ジェノタイプでの5週齢マウスの肝臓におけるLPCATファミリーの発現 (RNA-seqデータより)。
- b) TEN/SCAP DKO マウス由来の初代肝細胞にアデノウイルスを用いてLPCAT3を発現させ、小胞体ストレスマーカーの一つp-eIF2αの発現をウェスタンブロットにて検討。

5. 臨床検体を用いた検証

ヨーロッパから報告された206例のNASH肝生検のRNA-seqデータ [3] および我々のNASH肝生検94例のRNA-seqデータを解析し、本研究結果のヒトへの応用可能性を検証した。肝線維化進行に伴う *SREBF1* の発現低下は、本データセットでも確認することができ、さらに *SCAP* および *LPCAT3* も肝線維化進行とともにその発現が低下していた。また興味深いことに *SCAP*, *SREBF1*, *SREBF2*, *LPCAT3*, LXR target gene の *ABCG8* の間にはいずれも非常に強い正の相関があり、SCAP-SREBP-LXR-LPCAT3 axis は、ヒトNASHにおいても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

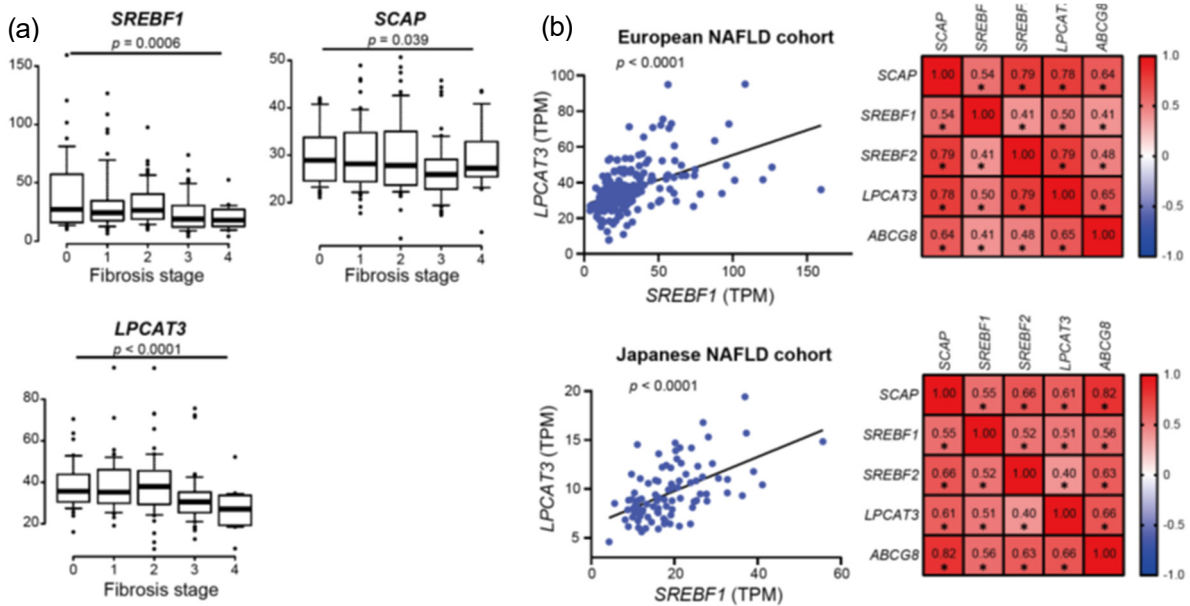


図5. NAFLD肝生検検体を用いた検討

- a) 各種遺伝子発現量と肝線維化との相関。
- b) *SREBF1* と *LPCAT3* の発現量の相関 (左図)、および各種遺伝子の Spearman's rank-correlation matrix (右図)。

6. SREBP機能低下とオートファジー障害は協調的に肝病態を悪化させる

SCAP 単独欠損では肝障害を生じないが、*PTEN* 欠損を組み合わせることで著明に病態が悪化する。その理由についてオートファジーに着目した。オートファジーは、小胞体を含む不要な細胞内小器官を分解する作用を有するが、*PTEN* 欠損に伴う mTOR 経路活性化によりオートファジー機能が低下すると膜の流動性が低下した異常な小胞体を

除去できず、結果として小胞体ストレスや細胞死を招くと考えた。そこで mTOR 阻害剤を PTEN/SCAPDKO マウスに投与したところ、肝障害が改善した。さらに、より直接的にオートファジーの関与を調べるため、SCAPKO マウスにオートファジー誘導に必須の分子 ATG5 を DKO したマウスを作製したところ、SCAP 欠損と ATG5 欠損は協調的に肝障害を悪化させ、肝発癌を促進することがわかった [4]。オートファジー障害はヒト進行 NASH でも生じており、同機序による病態悪化はヒト NASH でも生じている可能性が示唆された。

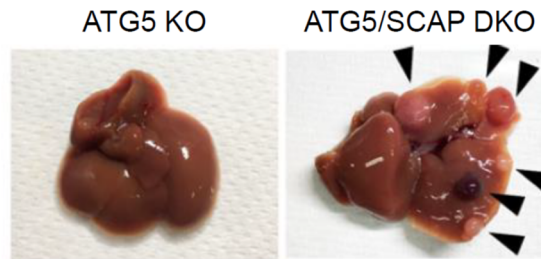


図6. SCAP 欠損と ATG5 欠損による協調的発癌促進効果
10 か月齢の ATG5 KO マウスおよび ATG5/SCAP DKO マウスの肝臓肉眼像。

考 察

これらの研究結果から、進行した burned-out NASH で生じている SREBP を介した脂質合成機能低下は、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り、リン脂質の補充や脂肪酸組み込み異常の是正が、進行 NASH の治療法の一つとなる可能性が示唆された。また現在 NASH に対して脂質合成酵素を標的とした薬剤の開発が盛んに行われているが、過剰かつ広範な脂質合成阻害はかえって病態を悪化させる可能性もあることがわかり、このことは今後の薬剤開発において重要な示唆を与えると思われる。加えて、初期の NASH と burned-out NASH では、病態における脂質代謝経路の働きが大きく変化しており、将来的には個々のステージに応じて、より個別化された治療戦略が必要になると考えられる。

謝 辞

本研究に対しご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, et al. ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell*. 2014 Sep 8;26(3):331-343. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.001. PMID: 25132496
- 2) Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, et al. CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity. *Gut*. 2018 Aug;67(8):1493-1504. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315193. PMID: 29437870
- 3) Govaere O, Cockell S, Tiniakos D, et al. Transcriptomic profiling across the nonalcoholic fatty liver disease spectrum reveals gene signatures for steatohepatitis and fibrosis. *Sci Transl Med*. 2020 Dec 2;12(572):eaba4448. doi: 10.1126/scitranslmed.aba4448. PMID: 33268509
- 4) Kawamura S, Matsushita Y, Kurosaki S, et al. Inhibiting SCAP/SREBP exacerbates liver injury and carcinogenesis in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2022 Jun 1;132(11):e151895. doi: 10.1172/JCI151895. PMID: 35380992