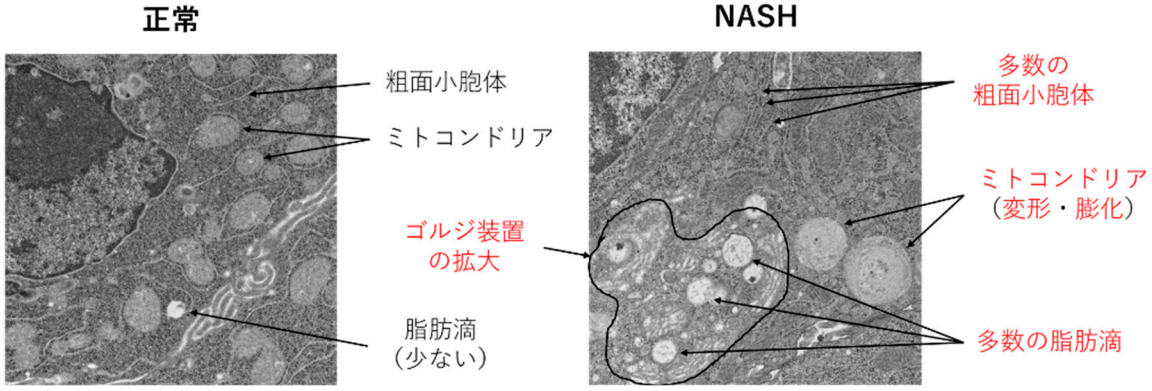
130　NASH病態進行における細胞内小器官異常機構の解明	臼井　達哉

【目的】近年、アルコール非依存性に脂肪肝を発症し、将来的に肝硬変・肝がんに進行する非アルコール性脂肪肝炎（NASH）罹患者が増加しており、国内には約 1,000 万人以上の患者およびその予備軍が存在する。NASH の前段階の病態である非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）発症の最も重要な要因は肥満であり、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧症などの生活習慣病や、性別、年齢、遺伝的素因も NAFLD／NASH の発症および進展に影響を及ぼすことが知られている。また、最近では酸化ストレスや小胞体（ER）ストレス、ミトコンドリア機能異常、オートファジーおよび腸内細菌叢の変化なども NASH における肝線維化の進行に関与することが示唆されているが、治療法開発につながる詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究課題では、我々が開発した NASH 肝臓オルガノイドを用いた詳細なメカニズム解明を進めることで、従来の NASH 研究とは異なる切り口で NASH 病態の改善につながる新たな治療薬開発や、有用な診断法の確立につなげることを目的とした。

【方法】12 週齢の NASH モデルマウスの肝臓組織由来オルガノイドと正常マウスの肝臓組織由来オルガノイドを用いて電子顕微鏡による細胞内小器官の観察を行った後に、活性酸素種（ROS）産生、ミトコンドリア呼吸鎖関連分子の発現量の変化を比較した。さらにミトコンドリア融合あるいは重合タンパク質阻害剤を NASH モデルマウス由来肝臓オルガノイドに 6 日間処置した後に、オルガノイドの形態や、線維化関連遺伝子 collagen I および α-SMA 発現に及ぼす影響を検討した。

【結果】NASH 肝臓オルガノイドにおいて正常肝臓オルガノイドに比べて脂肪滴および粗面小胞体の増加、ミトコンドリアの形態異常（変形や膨化）が観察された。そこで、ミトコンドリア由来の ROS 産生を、mtSOX を処置して観察したところ、NASH 肝臓オルガノイドにおいてスーパーオキサイド産生の増加が認められた。さらに、NASH 肝臓オルガノイドにおいてミトコンドリア分裂・融合関連タンパク質 MFF、DRP1 および OPA1 発現が亢進することが明らかになった。ミトコンドリア分裂阻害剤 Mdivi-1 を NASH 肝臓オルガノイドに 6 日間処置したところ、NASH 肝臓オルガノイドで特徴的に認められる樹状様形態を減少させ、オルガノイドの平均サイズを増加させた。さらに、Mdivi-1 処置は NASH 肝臓オルガノイドにおいて DRP1 タンパク発現を減少させ、Collagen I および α-SMA の mRNA 発現を抑制した。しかしながら、NASH 肝臓オルガノイドに OPA1 阻害剤を 6 日間処置した際には NASH 肝臓オルガノイドの形態変化には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、我々が開発した NASH モデルマウス由来肝臓オルガノイドにおいてミトコンドリアの機能異常による活性酸素種の異常産生が線維化の進展に影響を及ぼすことが初めて明らかになった。

正常の肝臓オルガノイドと NASH 肝臓オルガノイドにおける細胞内小器官の構造比較



130. NASH 病態進行における細胞内小器官異常機構の解明

臼井　達哉

東京農工大学 農学部 共同獣医学科 獣医薬理学研究室

Key words：NASH，ミトコンドリア，ROS，肝線維化，オルガノイド

緒　言

1. 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の現状と課題

近年、アルコール非依存性に脂肪肝を発症し、将来的に肝硬変・肝がんに進行する非アルコール性脂肪肝炎（NASH）罹患者が増加しており、国内には約 1,000 万人以上の患者およびその予備軍が存在する。C 型肝炎などのウイルス性肝炎の治療法が進歩したことで、ウイルスによる肝がんが減少しつつあるため、今後は NASH を基盤とした肝がんが増加することが懸念されている。

NASH の前段階の病態である非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）発症の最も重要な要因は肥満であり、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧症などの生活習慣病や、性別、年齢、遺伝的素因も NAFLD／NASH の発症および進展に影響を及ぼすことが知られている。また、最近では酸化ストレスや小胞体（ER）ストレス、ミトコンドリア機能異常、オートファジーおよび腸内細菌叢の変化なども NASH における肝線維化の進行に関与することが示唆されているが、治療法開発につながる詳細なメカニズムは明らかになっていない。

2. さまざまな新規三次元オルガノイド培養モデルの開発

近年開発された三次元オルガノイド培養法［1］は、臓器から上皮細胞を単離してマトリゲルと混合し、幹細胞性を高める因子を含む特殊な培養液で培養することで、上皮細胞および上皮幹細胞を三次元的に長期培養し、ヘテロジェネイティや極性といった組織本来の性質を維持できることから注目されている。

本研究課題では、我々が開発した NASH 肝臓オルガノイドを用いた詳細なメカニズム解明を進めることで、従来の NASH 研究とは異なる切り口で NASH 病態の改善につながる新たな治療薬開発や、有用な診断法の確立につなげることを目的とする。

3. NASH 線維化病態を再現する新規オルガノイド培養法の確立

最近、我々は NASH モデルマウス由来の肝臓組織に着目して肝線維化を再現する新たな三次元培養モデルの開発に成功した。6 週齢の C57/BL マウスに NASH 誘発用飼料を 4、8、12 週間給餌し、進行度の違う NASH モデルマウス群（NASH A、NASH B、NASH C）を作製し、オルガノイド培養を行った。各ステージの NASH モデルマウスの肝臓組織では、給餌期間の延長とともに肝臓の線維化、脂肪滴の沈着および肝障害マーカーの上昇が観察された。NASH C オルガノイドでは上皮・間葉転換（EMT）様の上皮組織構造が観察され、コラーゲンの蓄積や、活性化星細胞マーカーであるα-SMA 発現の上昇が認められたが、組織で観察された脂肪滴の沈着は認められなかった。炎症性反応に関しては、NASH A で IL-1b 発現が特異的に上昇することが示された。オルガノイドの形成効率が、NASH A のオルガノイドで上昇したことから、NASH A オルガノイドでの炎症反応を介した幹細胞性の亢進が示唆された。さらに、各病態ステージのオルガノイドにおいて特異的に上昇する遺伝子や、全ステージのオルガノイドで発現が高い遺伝子を複数同定した（特許出願中、特願 2019-230780）。以上の結果から、進行度の異なる NASH モデルマウスの肝臓由来オルガノイドが、NASH の線維化病態を培養ディッシュ上で再現することが明らかになった。また、NASH オルガノイドにおいて発現が上昇した遺伝子が今後新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された（Biomaterials. 2020、日経新聞 2020 年 2 月 24 日号「NASH 病態再現 創薬研究に寄与」）。

そこで本研究課題では、我々が開発した NASH 肝臓オルガノイドを用いた詳細なメカニズム解明を進めることで、

従来の NASH 研究とは異なる切り口で NASH 病態の改善につながる新たな治療薬開発や、有用な診断法の確立につなげることを目的とした（図 1）。

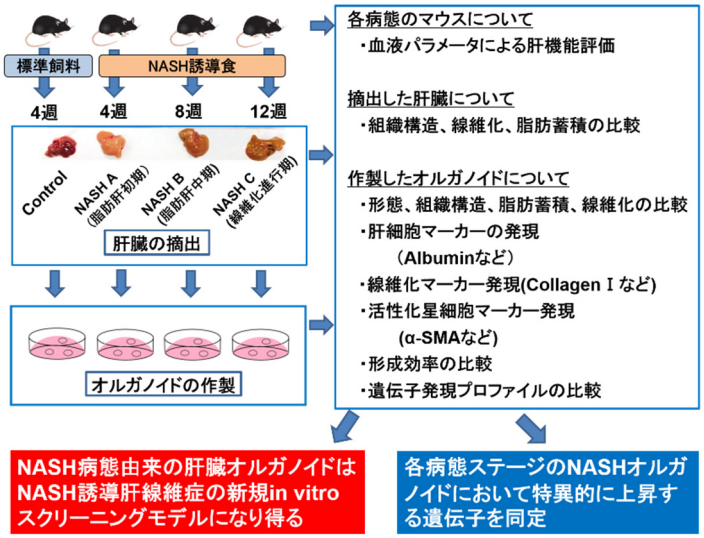


図 1. 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態進行を再現する三次元オルガノイド培養モデルの確立

方　法

12 週齢の NASH モデルマウスの肝臓組織由来オルガノイドと正常マウスの肝臓組織由来オルガノイドを用いて電子顕微鏡による細胞内小器官の観察を行った後に、活性酸素種（ROS）産生、ミトコンドリア呼吸鎖関連分子の発現量の変化を比較した。さらにミトコンドリア融合あるいは重合タンパク質阻害剤を NASH モデルマウス由来肝臓オルガノイドに 6 日間処置した後に、オルガノイドの形態や、線維化関連遺伝子 collagen I および α-SMA 発現に及ぼす影響を検討した。統計分析は t 検定および一元配置分散分析（One-way ANOVA）によって行い、bonferroni 検定により評価した。P 値は $P<0.05$ で有意差ありとした。

結果および考察

1. 正常および NASH マウス由来肝臓オルガノイドにおける細胞内小器官の構造比較解析

NASH 肝臓オルガノイドにおいて正常肝臓オルガノイドに比べて脂肪滴および粗面小胞体の増加、ミトコンドリアの形態異常（変形や膨化）が観察された。これらの結果から、NASH 肝臓オルガノイドにおいて生体の肝臓組織同様に各細胞小器官の異常が認められることが明らかになった。そこで、我々はミトコンドリアの形態異常に関連する活性酸素種産生や、関連遺伝子発現の比較解析を行った（図 2）。

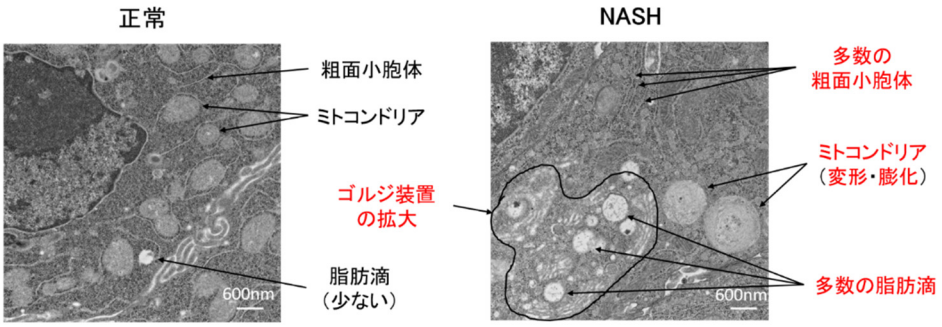


図 2. 正常肝臓・NASH 肝臓オルガノイドの組織構造の比較
NASH オルガノイドにおいて、脂肪滴及び粗面小胞体の増加、ミトコンドリアの形態異常が見られた。

2. 正常および NASH マウス由来肝臓オルガノイドにおけるミトコンドリア由来活性酸素種産生の比較

ミトコンドリア由来の ROS 産生を、mtSOX を処置して観察したところ、NASH 肝臓オルガノイドにおいてスーパーオキサイド産生の増加が認められた（図 3）。

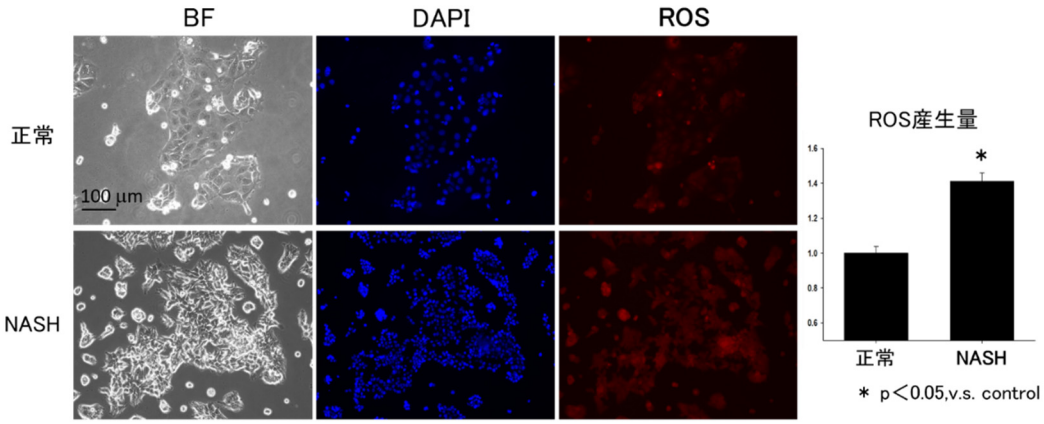


図 3. 正常肝臓・NASH 肝臓オルガノイドにおけるミトコンドリア由来活性酸素種（ROS）産生量
NASH オルガノイドにおいて、ROS 産生量の増加が認められた。

3. 正常および NASH マウス由来肝臓オルガノイドにおけるミトコンドリア関連タンパク質発現の比較

NASH 肝臓オルガノイドにおいてミトコンドリア分裂・融合関連タンパク質 MFF、DRP1 および OPA1 発現が亢進することが明らかになった。これらの結果から、NASH 肝臓オルガノイドではミトコンドリアの分裂・融合の亢進によって、形態が変化し、ROS 産生の亢進が引き起こされている可能性が示唆された（図 4）。

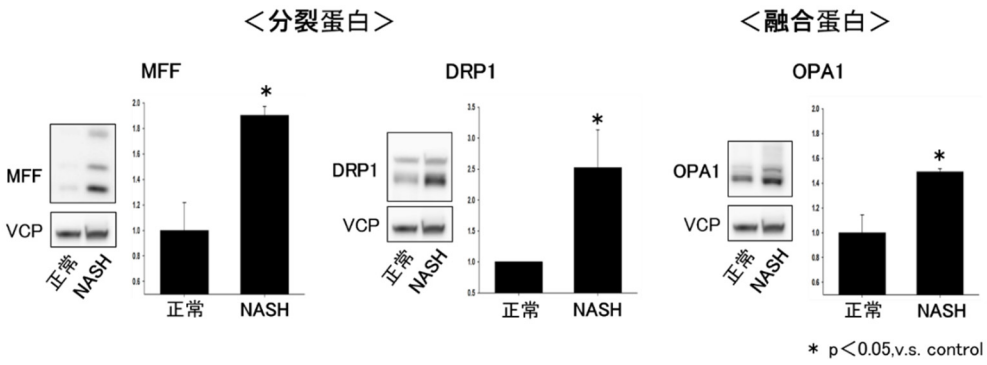


図 4. 正常肝臓・NASH 肝臓オルガノイドにおけるミトコンドリア分裂・融合蛋白質量の測定
NASH オルガノイドにおいて、ミトコンドリア分裂・融合に関連する蛋白質が有意も増加した。

4. NASH マウス由来肝臓オルガノイド形態に及ぼすミトコンドリア分裂阻害剤の影響

ミトコンドリア分裂阻害剤 Mdivi-1 を NASH 肝臓オルガノイドに 6 日間処置したところ、NASH 肝臓オルガノイドで特徴的に認められる樹状様形態を減少させ、オルガノイドの平均サイズを増加させた。これらの結果から、ミトコンドリアの分裂異常が線維化の進展に関与する可能性が示唆された（図 5）。

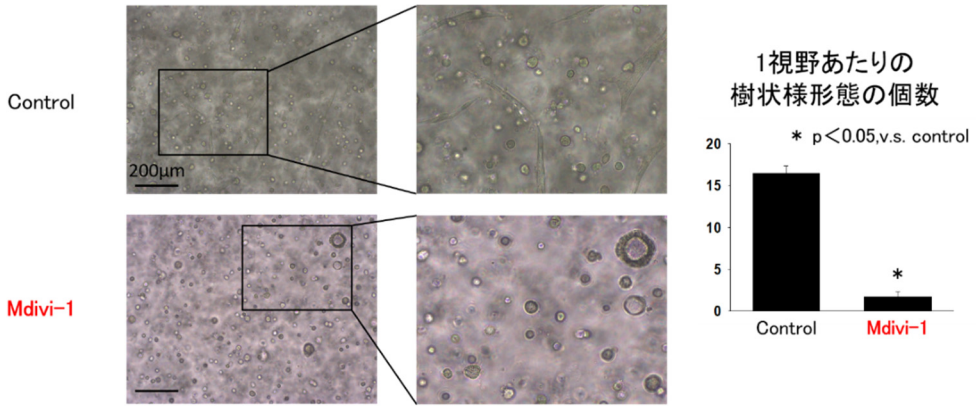
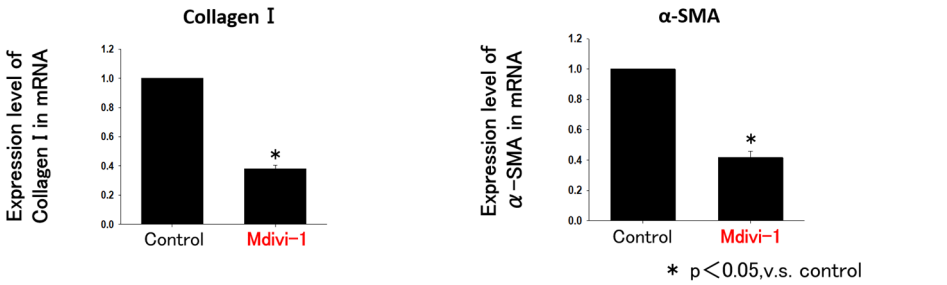


図 5. NASH 肝臓オルガノイドにおけるミトコンドリア分裂阻害剤（Mdivi-1）の処置
Mdivi-1 処置により NASH オルガノイドにおける樹状形態の形成数が有意に減少した。

5. NASH マウス由来肝臓オルガノイドの線維化関連遺伝子発現に及ぼすミトコンドリア分裂阻害剤の影響

Mdivi-1 処置は NASH 肝臓オルガノイドにおいて Collagen I および α-SMA の mRNA 発現を抑制した（図 6）。



Collagen Ⅰ：上皮間葉転換のマーカー

α-SMA：線維を産生する活性化した肝星細胞のマーカー

図 6. NASH 肝臓オルガノイドに対する線維化関連マーカー発現量の測定
Mdivi-1 処置により、NASH オルガノイドにおける線維化マーカー発現が抑制された。

6. NASH マウス由来肝臓オルガノイドの DRP1 およびα-SMA タンパク質発現に及ぼすミトコンドリア分裂阻害剤の影響

Mdivi-1 処置は NASH 肝臓オルガノイドにおいて DRP1 およびα-SMA タンパク発現を減少させた（図 7）。

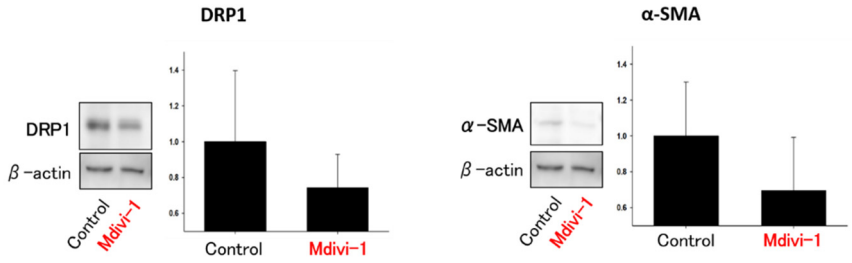


図 7. NASH 肝臓オルガノイドに対するミトコンドリア分裂蛋白（DRP1）及び線維化関連蛋白（α-SMA）発現量の測定

Mdivi-1 処置により、NASH オルガノイドにおけるミトコンドリア分裂蛋白（DRP1）及び線維化関連蛋白の発現が抑制された。

7. NASH マウス由来肝臓オルガノイドの線維化関連遺伝子発現に及ぼすミトコンドリア分裂阻害剤の影響

NASH 肝臓オルガノイドに OPA1 阻害剤を 6 日間処置した際には NASH 肝臓オルガノイドの形態変化には影響を及ぼさなかった（図 8）。

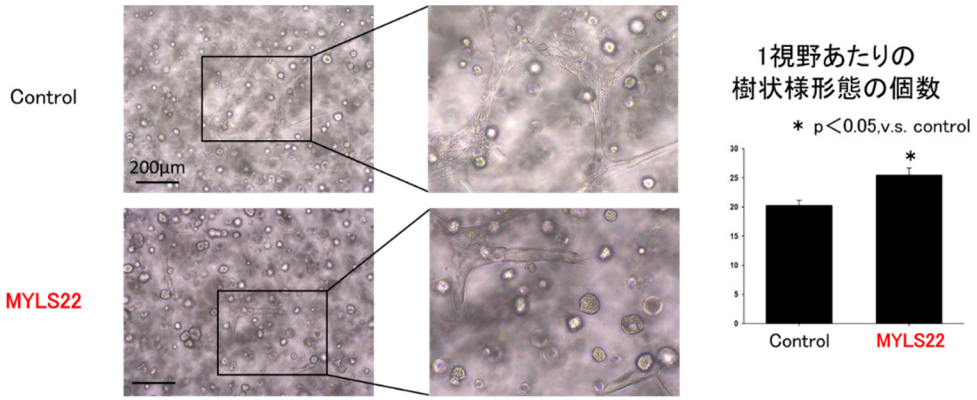


図 8. NASH 肝臓オルガノイドに対するミトコンドリア融合阻害剤（MYLS22）の処置

MYLS22 の処置により NASH オルガノイドにおける樹状様形態の形成数が有意に増加した。

以上の結果から、我々が開発した NASH モデルマウス由来肝臓オルガノイドにおいてミトコンドリアの機能異常による活性酸素種の異常産生が線維化の進展に影響を及ぼすことが初めて明らかになった。今後は、本研究で得られたミトコンドリア分裂タンパク質 DRP1 が NASH モデルマウスの線維化発症にどのような役割を果たしているのかを検討し、NASH 治療や診断の開発につなげていきたいと考えている。

文　献

1） Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, Clevers H. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature. 2009 May 14;459(7244):262-5. Epub 2009 Mar 29, PMID: 19329995 DOI: 10.1038/nature07935.