

氏名	猪俣 陽介
(ふりがな)	(いのまた ようすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第37号
学位審査年月日	令和 5年1月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Downregulation of miR-122-5p Activates Glycolysis via PKM2 in Kupffer Cells of Rat and Mouse Models of Non-Alcoholic Steatohepatitis (非アルコール性脂肪肝炎動物モデルのクッパー細胞内における miR-122-5p 発現減少は PKM2 を介して解糖系を亢進させる)
論文審査委員	(主) 教授 西川 浩樹 教授 中村 志郎 教授 朝日 通雄

学位論文内容の要旨

《目的》

近年、食生活の欧米化に伴い脂肪肝患者の割合が増えてきている。特に、アルコール摂取に依存しないものを非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) といい、成人の 20~40%が罹患し、そのうち 10~20%が非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) に進行するといわれている。NASH は肝硬変や肝細胞癌へ進行する可能性があることが最大の問題であるが、その病態は完全には解明されていない。今回、我々は肝特異的マクロファージであるクッパー細胞の解糖系と microRNA (miRNA) 制御機構の関連性に着目した。特に、解糖系律速酵素の一つである PKM2 と、肝特異的に高発現し PKM2 発現抑制効果を持つ miRNA-122-5p (miR-122-5p) の関連性を中心に NASH の病態生理を解明することを目的とした。

《方法》

本研究では、ラット・マウスの2種の動物 NASH モデルを使用した。ラット NASH モデルは10週齢 SHRSP5/Dmcr ラットに高脂肪・高コレステロール (HFC) 食を8週間投与し作製した。マウス NASH モデルは6週齢 C57BL/6J マウスにコリン欠乏メチオニン減量脂肪食 (CDAHFD) を12週間投与し作製した。早期 NASH モデルは上記マウスモデルに CDAHFD を1、3、9週間投与し作製した。コントロール群はマウス・ラット共に普通食を投与して作製した。

作製した NASH モデルの肝臓から、タンパク、RNA を抽出した。また同様の試料から組織標本作製した。抽出したタンパクはリン酸化プロテオーム解析・ウェスタンブロッティング法 (WB 法) で PKLR、PKM2、リン酸化 PKM2 の変化を解析し、RNA はリアルタイム RT-PCR 法で miR-122-5p の発現を解析した。組織標本は HE 染色、Sirius Red 染色、免疫組織染色に用いた。さらに、マウスモデル肝よりコラゲナーゼ法を用いてクッパー細胞のみを分離し RT-PCR 法で miR-122-5p の発現を解析した。

また、肝細胞癌細胞株 (HuH-7)・クッパー細胞株 (KUP5) に miR-122-5p を導入し、PKM2 の発現変化および結合能を WB 法、luciferase reporter assay を用いて検討した。

《結果》

① NASH 動物モデルの評価

NASH 動物モデルより摘出した肝臓に対して肉眼的・組織学的評価を行った。NASH 群では、肝腫大及び薄色に色調変化し、組織学的には炎症反応・脂肪滴・肝細胞風船様変性・線維化を認め、ヒト NASH の病理変化と矛盾しなかった。また NASH 群では血漿中肝逸脱酵素 (AST、ALT) が上昇し、NASH 患者と類似した結果であった。

② NASH 肝の解糖系及び律速酵素 PKM2 の測定

NASH 肝をリン酸化プロテオーム解析したところ解糖系全体が亢進していることが確認された。さらに、WB 法・免疫組織染色により、解糖系の律速酵素である PKM2 及び活性

型であるリン酸化 PKM2 発現が NASH 群で上昇していることも確認された。一方で、正常肝で高発現を認めたアイソザイムの PKLR は、NASH 群で発現が低下していた。

③ 早期 NASH モデルでの検証

早期 NASH モデルでは、脂肪食を与える週齢に比例して脂肪変性や炎症所見といった組織学的な病理変化を認めた。さらに PKM2、リン酸化 PKM2 の発現も週齢に比例して発現が亢進していた。

④ miR-122-5p による PKM2 発現抑制の評価と、クッパー細胞内での発現評価

HuH-7、KUP5 を用いて PKM2 の 3'-UTR に miR-122-5p が直接結合して発現を抑制することが luciferase reporter assay で確認された。さらに、NASH 肝免疫組織染色でクッパー細胞と一致して PKM2 が発現し、分離したクッパー細胞内では NASH 群で有意に miR-122-5p の発現が低下した。

《考察》

癌細胞特異的代謝機構として、好気性条件下でも解糖系で ATP を産生するという Warburg 効果が注目されており、PKM2 は Warburg 効果の律速酵素として知られている。我々は、肝細胞癌では miR-122-5p の PKM2 発現調節機構により Warburg 効果が亢進していることを見出してきた。また、大腸ポリープなどの前癌病変においても Warburg 効果を認めることも発表し報告してきた。

本研究では、NASH を前癌病変ととらえ解糖系の亢進を認めるかをラット・マウス動物モデルで検証した。ラット NASH モデルのリン酸化プロテオーム解析により NASH では解糖系全体が亢進していることが確認され、特に律速酵素である PKM2 及び、その活性型であるリン酸化 PKM2 の発現が亢進していた。特に、肝組織の中でも肝特異的マクロファージであるクッパー細胞内で解糖系亢進が有意であり、miR-122-5p が PKM2 発現の調節をしていることを明らかにした。

クッパー細胞は、NASHなどの炎症期にみられる活性化タイプのM1型に分極し炎症性サイトカインを放出する。一方、免疫応答を抑制させるM2型は正常肝細胞で多く観察される。また、Warburg効果を獲得した解糖系優位のクッパー細胞代謝経路を再プログラム(リプログラミング)することで、M1型からM2型への再分極をした報告もある。これらの報告と併せて考えると、Warburg効果の律速酵素であるPKM2を標的としたmiR-122-5pは、クッパー細胞のM2型への再分極を誘導することでNASH治療薬になり得る可能性が示唆された。

《結論》

本研究結果より、NASHでは、クッパー細胞においてmiR-122-5pの発現低下が解糖系酵素であるPKM2の発現を亢進させていることを明らかにした。miR-122-5pは、解糖系とWarburg効果を制御する重要な因子であると考えられる。

論文審査結果の要旨

癌の特異的代謝機構として、好気性条件下でも解糖系を用いて ATP を産生しており、Warburg 効果として知られている。pyruvate kinase M2 (PKM2)は Warburg 効果の律速酵素であり、申請者らは microRNA (miRNA) による PKM2 発現調整機構について研究を進めてきた。特に、肝細胞においては miRNA-122-5p (miR-122-5p)が PKM2 と直接結合し発現抑制をしているが、肝細胞癌の発癌過程で miR-122-5p が発現低下することにより PKM2 の発現が亢進し、結果として Warburg 効果をもたらしていることを見出してきた。そこで申請者は、肝細胞癌に移行することが知られている非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における糖代謝経路の変化を明らかにし、肝細胞癌と同様の機序で Warburg 効果を獲得しているかを確認するために本研究を計画した。

まず、検証に用いる動物モデルとしてマウス・ラット二種の食餌性 NASH モデルを作製した。このモデルは組織・病態学的にヒト NASH と矛盾しない結果であった。次に、ラット NASH モデルを用いてリン酸化プロテオーム解析を実施し、NASH 肝の詳細な糖代謝経路を解析した。NASH では PKM2 をはじめ解糖系全体が亢進しており、Warburg 効果を獲得していることが示唆された。次に、NASH における PKM2 の発現調節機構を miRNA の観点より解析した。NASH では肝組織特異的に発現する miR-122-5p の発現低下を認め、肝細胞癌と同様に PKM2 の発現を調節することが示唆された。この miR-122-5p による PKM2 調節機構は、肝特異的マクロファージであるクッパー細胞で生じていることが明らかとなった。

本研究は、NASH のクッパー細胞において、miR-122-5p が PKM2 の発現調節機構を介して、解糖系と Warburg 効果を制御する重要な因子であることを示している。また、糖代謝経路の変化とクッパー細胞の分極化の密接な関わりについての報告もあり、miR-122-5p は糖代謝経路変化を標的とした新規 NASH 治療薬となる可能性を示唆している。現在、NASH に対する有効な治療薬はないことから、創薬の面からも本研究は非常に重要な知見であると考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

International Journal of Molecular Sciences

23(9): 5230, 2022, May 7

doi: 10.3390/ijms23095230.