

肝星細胞遊離コレステロール代謝機構を標的とした、非アルコール性脂肪肝炎を含む慢性肝疾患の新規診断法・治療法の解明

防衛医科大学校 消化器内科

講師 富田 謙吾

(共同研究者)

慶應義塾大学医学部 消化器内科 専任講師 海老沼 浩利

慶應義塾大学医学部 消化器内科 特任助教 寺谷 俊昭

はじめに¹⁾

非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現形と考えられている。肥満人口の増加に伴い増加の一途にあるNASHは、一部が肝硬変まで進展する進行性の疾患であり肝発癌も引き起こすため、治療法の確立は緊急課題である。

この飽食の時代に、メタボリックシンドロームを有する患者数が増加し、NASHを含む肝臓病患者でも、高コレステロール食摂取・高コレステロール血症を有する患者が増加している。高コレステロール食摂取は、NASHを含む肝臓病発症・進展の独立した危険因子と考えられているが、その病態機序の詳細は明らかとなっていない。最近、我々は、食事由来のコレステロールが肝臓構成細胞の1つである肝星細胞に遊離コレステロールとして蓄積し、TLR4シグナルの増強を介して肝星細胞のTGF β 感受性を増強することにより、肝臓線維化病態を悪化させることを明らかにした²⁾。これらの結果は、摂取コレステロール量が多い、または高コレステロール血症を有する、NASHを含む飽食の時代の肝臓病進展の病態機序に、肝星細胞内における遊離コレステロールの蓄積が重要な役割を果たすことを示唆している。一方で我々は、初代肝星細胞を用いた*in vitro*解析で、遊離コレステロールを蓄積した細胞がTLR4シグナルの増強を介してTGF β に対して易感受性を呈するのに対し、Cholesterol-esterを蓄積した細胞ではその現象が認められないことを明らかにした²⁾。この結果は、細胞内の全コレステロール量ではなく遊離コレステロール量が、肝星細胞のTGF β に対する感受性の規定因子の1つであることを示している。以上より我々は、肝星細胞内の遊離コレステロール代謝・調節が、NASHを含む肝臓病線維化進展の治療標的となり得るものと考えた。

細胞の過剰なコレステロールは、cholesterol ester (CE) として蓄えられる。細胞内でコレステロールは遊離コレステロール、またはCEとして存在するが、遊離コレステロールからCEへの変換酵素として、acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT) が知られている。哺乳類では、isoenzymeであるACAT1、およびACAT2が存在するが、ACAT1は多くの組織で発

現が認められるのに対して、ACAT2は主に肝臓および小腸で発現していることが報告されている³⁾。我々の今回の検討において、マウス肝臓では、ACAT1がマウス肝星細胞に発現する主要なisozymeであり、ACAT2は肝細胞およびKupffer細胞に発現する主要なisozymeであることが明らかとなった。我々は本検討で、ヒト肝星細胞でもACAT1が主要なisozymeであることを示しており、同酵素の活性調節が治療標的となる可能性を示唆するものである。

以上の結果を踏まえ、本研究では、ACAT1欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、マウス肝線維化モデルを作成・評価検討することにより、肝星細胞のACAT1活性調節がNASHを含む肝臓病肝線維化の治療標的となり得るか否かを探索することを目的とした。

結 果¹⁾

ACAT1は、ヒトおよびマウス肝星細胞では、主要なアイソザイムである。

ウエスタンブロッティングの結果より、ACAT1がマウス肝星細胞の主要なアイソザイムであり、ACAT2発現はほとんど認められなかった。ヒト正常肝より分離した肝星細胞でも、ACAT1が主要なアイソザイムであった。同様にヒト肝星細胞株化細胞である、LX2やhTERT導入ヒト肝星細胞でも、ACAT1が主要アイソザイムであった。そしてこれらのヒト肝星細胞ではACAT2発現はほとんど認められなかった。一方で、マウスより分離した肝細胞・Kupffer細胞では、ACAT2が主要なアイソザイムであった。

その結果、ACAT1欠損マウス由来の肝星細胞では、ACAT活性がほとんど消失していたが、肝細胞およびKupffer細胞では、ACAT活性が保持されていた。

ACAT1欠損は、有意に肝線維化病態を進展させた。

以上の結果より、ACAT1欠損マウスを利用することにより、肝臓中で、星細胞特異的なACAT欠損の影響を検討することが可能であるため、肝線維化モデルに供した。

肝線維化モデルの一つであるCCl₄投与による肝線維化モデルに供した結果、ACAT1欠損マウスは野生型マウスに比較して有意に肝線維化が増悪することが肝組織像において明らかとなった。Sirius-red染色面積による評価でも有意な線維化の増悪が確認された。また、肝星細胞活性化マーカーである α SMAの発現量、collagen1a1, collagen1a2発現量も、ACAT1欠損マウス肝臓で有意に発現量が増加していた。一方、肝臓TGF β 発現量は、ACAT1欠損マウスと野生型マウスとの間に有意差は認めなかった。

総胆管結紮による肝線維化モデルでも同様の結果であった

ACAT1欠損は、TLR4タンパクレベルの増加を介して、肝星細胞のTGF β 感受性を増強し、肝星細胞活性化を促進する。

ACAT1欠損マウスより分離直後の肝星細胞では、野生型肝星細胞に比し遊離コレステロール量が有意に増加していた。一方CE量には違いを認めなかった。これらの肝星細胞に

TGF β を添加する刺激培養実験を施行したところ、肝星細胞の活性化が促進され、 α SMA、collagen1a1、collagen1a2発現が有意に増加したが、ACAT1欠損によりそれらの反応がさらに有意に増強した。分離直後の肝星細胞の検討では、TGF β 偽受容体であり、TLR4の下流分子であるBambi (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) の発現が、ACAT1欠損肝星細胞で有意に低下していた。TGF β receptot-1、receptor-2の発現量には差を認めなかった。そして、TLR4タンパクレベルはACAT1欠損肝星細胞で野生型肝星細胞に比較して増加していた。一方、TLR4 mRNAに関しては、遺伝子型による違いは認められなかった。また、分離Kupffer細胞では、遺伝子型によるTLR4タンパクレベルの違いを認めなかった。

TLR4タンパク質の細胞内移行はリガンド形成により促進し、細胞膜よりエンドソームへ移行しユビキチン化され、リソソームへ輸送され分解を受ける^{4,5)}。培養肝星細胞を用いた検討で、野生型肝星細胞では、LPS投与60分後に、TLR4タンパク発現レベルは有意に減少したが、ACAT1欠損肝星細胞では高い発現量を維持していた。

我々は以前の検討で、肝星細胞の遊離コレステロール蓄積が、リガンド結合により促進されるTLR4タンパク質の分解を抑制することで、その下流のBambi発現を減弱させ、肝星細胞の、TGF・刺激に対する感受性を増強し、結果として肝星細胞の活性化が促進されることを明らかにした²⁾。今回の結果は、同様の機序で、ACAT1欠損が遊離コレステロールの蓄積を介して、肝星細胞のTGF・惹起活性化を促進することを示唆するものである。

ACAT1欠損は、TLR4シグナル依存的に肝線維化進展を増悪させた。

さらに我々は、ACAT1欠損マウスとTLR4欠損マウスとを交配させ、その2重欠損マウスを作成した。TLR4欠損マウスおよびTLR4/ACAT1 2重欠損マウスを2種類の肝線維化モデル(総胆管結紮モデル、CCl₄投与モデル)に供し、肝線維化進展に及ぼすACAT1欠損の影響が、遊離コレステロール蓄積により増強するTLR4シグナルに依存的であるか否かを検討した。四塩化炭素肝線維化モデルで、TLR4シグナルが欠損した状態では、ACAT1欠損は肝線維化進展に影響を及ぼさなかった。Sirius-red染色面積、肝臓 α SMA、collagen1a1、collagen1a2発現量の検討でも、ACAT1欠損による影響は認めなかった。総胆管結紮による肝線維化モデルでも同様の結果であった。

TLR4シグナルが欠損した状態でも、ACAT1欠損により肝星細胞の遊離コレステロール蓄積が有意に増強したが、CE蓄積には影響していなかった。各マウスより分離直後の肝星細胞にTGF β 刺激を施行したところ、collagen 1a1、collagen1a2発現が有意に増加したが、TLR4シグナルが欠失している状態では、ACAT1欠損による反応性の増強は認めなかった。各マウスより分離直後の肝星細胞の検討では、TLR4シグナル存在下ではACAT1欠損によりBambi発現が有意に減弱していたが、TLR4シグナル非存在下ではBambi発現はACAT1の影響を受けていなかった。

これらの結果は、遊離コレステロール蓄積により増強したTLR4シグナルが、ACAT1欠損による肝線維化の増悪に重要な役割を果たすことを示唆するものである。

考 察¹⁾

本研究で我々は、ACAT1欠損が、2つの肝線維化モデル（総胆管結紮モデル、CCl₄投与モデル）における肝線維化進展を増悪させることを明らかとした。本病態機序は、肝細胞障害やKupffer細胞活性化を介していなかった。ACAT1は肝星細胞における主要なACATアイソザイムであり、一方ACAT2は肝細胞およびKupffer細胞での主要なアイソザイムであるため、ACAT1欠損マウスを用いた本検討では、主として、肝星細胞での遊離コレステロール蓄積増強を介した機序により、肝線維化が増強していた。蓄積した遊離コレステロールは、肝星細胞のTLR4タンパク質発現を増強し、Bambi発現低下を介して、TGF β 刺激への易感受性を惹起し、肝星細胞活性化を促進するものと考えられた。

細胞におけるコレステロール蓄積は、主としてlow-density lipoprotein (LDL) 取り込みによるものか、新規合成に基づくものである³⁾。これらのコレステロールは最終的にはERに到達し、その一部は主としてACAT1によりCEへ変換され、主に細胞質中の脂肪滴として存在する。CE生合成と加水分解反応は持続的に起こり、遊離コレステロール/CEサイクルを形成する³⁾。本研究で我々は、ACAT1が、肝星細胞での遊離コレステロール蓄積に関わる重要な調節因子であることを明らかとした。肝星細胞ではコレステロールのほとんどは遊離コレステロールとして存在しており、ACAT1欠損は、肝星細胞の遊離コレステロールを増加させるが、CE蓄積には影響を及ぼさなかった。ACAT1欠損による肝星細胞での遊離コレステロール蓄積は、リガンド結合により惹起されるTLR4タンパク質の分解を阻害していた。これらの検討結果は、我々の以前の報告に合致するものである^{2,6)}。

動脈硬化に際しては、マクロファージでの慢性的なCEの蓄積により、泡沫化マクロファージが形成され、病態に寄与するものと考えられている。そのため、複数のACAT阻害剤が合成され、動脈硬化病態の加療での有効性が検討されてきた。しかしながら、その有効性に関して未だ一定の見解が得られていない³⁾。高コレステロール血症患者に対するACAT阻害剤の投与で、動脈硬化病変が改善しないばかりか、逆に増悪し、心血管イベントが増加したとの報告がなされた⁷⁾。同様に、ACAT阻害が冠動脈疾患患者の動脈硬化を増悪させたとの報告⁸⁾や、脂質異常症に関連するマクロファージでの選択的なACAT阻害が、動脈壁での遊離コレステロール蓄積を増強し、かえって動脈硬化病態を増悪させたとの報告も散見している^{9,10)}。これらの報告と我々の今回の結果を踏まえると、ヒト疾患病態でACAT活性減弱が病態機序に及ぼす役割は、細胞内CE減弱による作用というよりも、むしろ細胞内遊離コレステロール蓄積増強に起因するものであることが推察される。

細胞膜構造は、多くの基本的な細胞機能に重要であり、ACAT1により調節される遊離コレステロールは、多くの疾患の病態機序に関与している可能性がある。今回、肝星細胞での遊離コレステロール蓄積が、肝線維化病態進展 機序に重要な役割を果たすことが明らかとなった。そのため、肝星細胞でのACAT1活性調節は、肝線維化の新たな治療戦略として期待されるものである。ヒト検体を用いた検討で、ACAT1遺伝子多型が血清脂質レベルに影響を与えることが報告されている¹¹⁾。今後のヒト検体を用いた、ACAT1遺伝子多型と肝線維化進展

との相関解析により、肝線維化が進展しやすい患者群の遺伝子診断が可能となるものと推察される。

我々は本研究で、ACAT1が肝線維化病態に果たす、新たな病態機序を明らかとした。肝星細胞のACAT1活性をターゲットとした、新たな肝線維化治療戦略につながるものと期待される。

要 約¹⁾

我々は近年、肝星細胞の遊離コレステロール蓄積が肝線維化を進展させることを明らかとした。Acetyl-CoA acetyltransferase (ACAT) は、細胞内の遊離コレステロールをコレステロールエステルへ変換する酵素であるが、ACAT1はヒトでもマウスでも肝星細胞に優位に発現するアイソザイムであった。その発現調節が肝線維化の治療標的となる可能性が示唆されたが、ACAT1欠損マウスを肝線維化モデルに供したところ、野生型マウスに比して肝線維化が有意に進展した。ACAT1欠損により肝星細胞に遊離コレステロールが蓄積し、TLR4シグナルの増強を介して肝星細胞のTGF β 感受性を増強することにより、肝臓線維化病態が増悪する病態機序が明らかとなった。今後、ACAT1発現調節を介した肝星細胞の遊離コレステロール調節が、非アルコール性脂肪肝炎などの肝臓病肝線維化の新規治療ターゲットとして期待される。

文 献

1. Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., *et al.* Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 mediates liver fibrosis by regulating free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells. *J Hepatol* **61**, 98-106 (2014) .
2. Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., *et al.* A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **142**, 152-164 e110 (2012) .
3. Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C., *et al.* Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E1-9 (2009) .
4. Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., *et al.* Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* **25**, 683-692 (2006) .
5. Wang, Y., Chen, T., Han, C., *et al.* Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood* **110**, 962-971 (2007) .
6. Tomita, K., Teratani, T., Suzuki, T., *et al.* Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* **59**, 154-169 (2014) .
7. Meuwese, M.C., de Groot, E., Duivenvoorden, R., *et al.* ACAT inhibition and progression of carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia: the CAPTIVATE randomized trial. *JAMA* **301**, 1131-1139 (2009) .

8. Nissen, S.E., Tuzcu, E.M., Brewer, H.B., *et al.* Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med* **354**, 1253-1263 (2006) .
9. Accad, M., Smith, S.J., Newland, D.L., *et al.* Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J Clin Invest* **105**, 711-719 (2000) .
10. Fazio, S., Major, A.S., Swift, L.L., *et al.* Increased atherosclerosis in LDL receptor-null mice lacking ACAT1 in macrophages. *J Clin Invest* **107**, 163-171 (2001) .
11. Ohta, T., Takata, K., Katsuren, K., *et al.* The influence of the acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 gene (-77G-->A) polymorphisms on plasma lipid and apolipoprotein levels in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. *Biochim Biophys Acta* **1682**, 56-62 (2004) .