

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02904

研究課題名(和文)新規マーカーによるNASH予防・診断・治療のための食品・薬剤探索システムの構築

研究課題名(英文) Construction of screening system of food and drug for prevention/diagnosis/treatment of NASH using new biomarker

研究代表者

森田 直樹 (MORITA, Naoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・総括研究主幹

研究者番号：60371085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：血液中p62/SQSTM1測定用ELISAのキット化に向けた研究を進めたが、従来の抗体を用いたp62/SQSTM1のELISA法には、感度の点で克服すべき問題が残された。

臨床研究においては、p62/SQSTM1を用いた診断の特異性を高める目的で、Keap-1分子を併用して評価を行い、抗酸化能とともに評価することの有用性を確認した。

さらに、脂肪化にともなう新たな分子マーカーを同定した。この分子は、脂肪化により脂肪を覆う脂質二重膜上に発現し、脂肪化をさらに増強し、また脂肪肝による肝細胞傷害を促進することでNASH病態の進行に関連することが考えられた。

研究成果の概要(英文)： We tried to measure p62/SQSTM1 in blood using ELISA method, however, the ELISA method for p62/SQSTM1 using conventional antibodies remains problems to be overcome in terms of sensitivity. It seemed that it is optimal at this time to perform measurement using liver tissue for the measurement of p62/SQSTM1 with molecular biological method. In the clinical study, we confirmed the usefulness of evaluating p62/SQSTM1 expression together with antioxidant capacity by using Keap-1 molecule. This combination method would improve the specificity of diagnosis. In addition, we identified new molecular marker(s) associated with lipidification. This molecule(s) is expressed on the lipid bilayer membrane that covers the lipid droplet. It is considered that the new molecule(s) enhanced further lipidification, and promoted liver cell injury by fatty liver, which is related to the progression of NASH pathology.

研究分野：分子生物学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH) 脂肪肝 マーカー分子 メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

(1) 運動不足、ストレス、過食・過栄養などにより内臓脂肪が蓄積すると、肥満に加えて、アディポサイトカインの分泌異常と遊離脂肪酸の増加が起こる。さらに、インスリン抵抗性等の病態が加わることで、全身的にメタボリック症候群が発症すると考えられている。増加した遊離脂肪酸は門脈を介して肝臓の組織に到達し、そこで中性脂肪として蓄積され、脂肪肝を形成する(単純性脂肪肝)。また、内臓脂肪の増加、遊離脂肪酸の分泌亢進、アディポネクチンの分泌低下、炎症性サイトカイン TNF- α の分泌亢進などをきたし、アディポサイトカインの分泌異常やインスリン抵抗性あるいは過剰な酸化ストレス、炎症性サイトカインが持続的に作用することで、肝臓においては、肝細胞傷害、炎症などが慢性化し、その結果、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) へ進展すると考えられている。

(2) NASH は、その病態が進行性であることが特徴であり、そのため NASH に陥ると高率に肝硬変・肝臓に移行することが明らかとなっている。そのため、NASH の予防あるいは NASH の進行阻止は、臨床的に極めて重要と考えられる。しかしながら、一般的に、「非アルコール性の脂肪肝」は可逆的であり、ダイエットなどにより正常化すると考えられているため、国民の関心は未だに低い。医療サイドとして、脂肪肝の予防に尽くすのみならず、「可逆性の脂肪肝の状態に留めておく」か、あるいは「NASH の進行を抑える」ことが重要である。そのため、有効な分子マーカーを用いて「NASH の程度を評価する」ことは極めて重要と考えられる。さらに「脂肪肝から NASH への進展の可能性」を、組織中あるいは血液中のバイオマーカーを指標にして評価(予測)するとともに、「NASH への移行を抑制する薬剤・機能性食品などを見出すシステム」ができれば、医療及びその周辺の産業にも多大なる貢献をすることができ、かつ国民の健康・福祉にも繋がる。

2. 研究の目的

(1) これまでに我々は、細胞・動物実験の結果から、単純性脂肪肝から NASH に至る鍵となる分子 (p62/SQSTM1) の同定に成功した (Haga et al. 2014)。肝細胞の脂肪化により、肝細胞内 p62/SQSTM1 レベルは低下し、結果的に FasL/Fas は増加し、抗酸化能は低下する。インスリン抵抗性(肝細胞内の Akt の応答不全)が持続すれば、さらに肝細胞の脂肪化は進行し p62/SQSTM1 は低下するという悪循環となる。肝細胞における Akt の応答不全は、肝細胞の生存能の低下(抗アポトーシス能、抗酸化能の低下)を引き起こし、細胞傷害性を高める結果となる。これらの結果は、単純性脂肪肝である場合でも、p62/SQSTM1 発現低下と Akt の応答不全が

併存し、かつその状態の改善がない場合には慢性的な肝細胞傷害と二次的な肝炎状態 (NASH) が誘導される可能性を示唆している。我々は、それとは逆に肝における p62/SQSTM1 発現を増強させると脂肪化自体は改善されないものの、細胞傷害は改善され実際に肝傷害も改善することを確認している。

(2) 本研究では、まず臨床検討を行い、既に我々が報告した肝細胞における「p62/SQSTM1 発現」と「Akt 応答性あるいはインスリン抵抗性」の二つが、NASH への移行に対するバイオマーカーとして有用かどうかを検討した。p62/SQSTM1 は細胞外に分泌されることを確認しており、既に ELISA による測定法も確立しているため、①肝組織中あるいは血液中 p62/SQSTM1 レベル、②肝組織中 Akt リン酸化若しくはインスリン抵抗性の 2 つを主要な評価項目として、脂肪肝、肝炎、肝硬変にいたる臨床病態の変化、肝の生化学的・形態学的・機能的変化及び画像診断データと比較・検討した。

(3) NASH 予防・進行抑制のためのスクリーニングシステムの構築も並行して検討した。NASH への移行マーカーとして、既に我々が報告した p62/SQSTM1 と肝細胞における Akt 応答性の 2 つをバイオマーカーとして、NASH を予防する食品等の肝機能への機能性・安全性の客観的評価系を確立し、実際に候補物資となる機能性食品の探索に応用した。

3. 研究の方法

(1) 金沢大学にてフォローされている患者(正常、脂肪肝、NASH、肝炎、肝硬変)を対象として、i) 肝生検検体における p62/SQSTM1 タンパク質発現・リン酸化、Akt タンパク質発現・活性化(リン酸化)を、免疫組織染色にて評価し、ii) 血液中 p62 レベルを ELISA 法にて評価を試みた。それらの結果と、従来の臨床検査データ(血液生化学、血中インスリン値・血糖値、画像診断データ等)を検討し、これらマーカーの病態生理学的意義について検討した。

(2) p62/SQSTM1 レポータープローブ、小胞体ストレスプローブ、Akt 活性化プローブ、プログラム細胞死(ネクロプトーシス、アポトーシス)を反映するプローブの各種光プローブの作製を試みた。これらの光プローブを非腫瘍性肝細胞株への安定導入を試みる。NASH 状態を反映させるため、肝細胞株を脂肪化させ、また高インスリン状態におくことで、細胞アッセイ系の構築を試みた。

(3) 血液中 p62/SQSTM1 を ELISA 法にて評価する方法の確立を目指した。細胞外 p62/SQSTM1 を ELISA 法にて測定する手

法の条件設定を行った。また、臨床検体において、タンパク質濃縮を加えるなど、p62/SQSTM1 の確実な測定・評価を試みた。

4. 研究成果

(1) 新規マーカー (p62/SQSTM1) に関する臨床検体を用いた研究を進めた。研究期間内に、13 例の非ウイルス性患者の肝臓、20 例のウイルス性患者の肝臓の検討を行うことができた。p62/SQSTM1 染色に関して、C 型肝炎背景肝の多くで染色が認められないため、脂肪化に伴う p62/SQSTM1 発現の増減評価は困難であった。同時に検討した Keap-1 発現は、C 型肝炎背景肝及び非ウイルス肝背景ともに、癌が発生してくる場合、背景肝、癌ともに発現している例が多く、抗酸化作用が減弱した背景から出現する可能性が示唆された。p62/SQSTM1 と Keap-1 の関連による影響の評価は現時点では難しいと考えられたが、これらを組み合わせることでより正確な診断ができる可能性が示された。今後の検討課題としては、男女に分けて、それぞれのグループでの症例数を追加する、あるいはアルコール性肝炎、ウイルス性肝炎との相違が明瞭であれば、「非アルコール性、非ウイルス性脂肪性肝炎」に絞って検討を進めることが考えられた。

非ウイルスおよびc型肝炎背景からの肝細胞癌の p62、Keap-1 染色

非ウイルス肝背景 (M/F: 9/4, 73.8 ± 5.5 歳)					
p62	背景肝 +、癌+	4 (31%)	Keap-1	背景肝 +、癌+	7 (53.8%)
	背景肝 -、癌+	3 (23%)		背景肝 -、癌+	1 (7.6%)
	背景肝 +、癌-	2 (15%)		背景肝 +、癌-	3 (23%)
	背景肝 -、癌-	4 (31%)		背景肝 -、癌-	2 (15%)
c型肝炎・肝硬変背景 (M/F: 13/7, 68.0 ± 8.2 歳)					
p62	背景肝 +、癌+	3 (15%)	Keap-1	背景肝 +、癌+	17 (85%)
	背景肝 -、癌+	4 (20%)		背景肝 -、癌+	2 (10%)
	背景肝 +、癌-	0 (0%)		背景肝 +、癌-	1 (5%)
	背景肝 -、癌-	13 (65%)		背景肝 -、癌-	0 (0%)

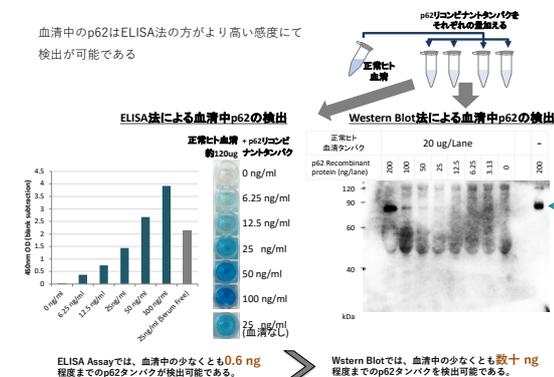
(2) 機能性食品のスクリーニングシステムの構築を目指し、その基盤となる分子及び分子機能反映プローブの作成と細胞レベルでの機能確認を進めた。各プローブは、分子の遺伝子発現及び機能を生きた細胞で観察できるように、ルシフェリン/ルシフェラーゼの発光システムを用いた。細胞レベルでのプローブ機能観察の結果、p62/SQSTM1 レポータープローブ等、一部が想定通りの機能性を示さないものがあった。これらについては、再度プローブの構造検討段階から再検討を行い、反応性の高いプローブの作製を目指す必要があることがわかった。構造を熟慮してプローブの設計を行っているが、実際にプローブとして正しく機能するかは細胞実験を行い判断せざるを得ないのが現状である。

(3) これまでの検討で、p62/SQSTM1 は、肝細胞から同じ抗原性を維持したまま細胞

外へと放出されることが明らかになっている。p62/SQSTM1 の測定について、当初の細胞実験 (腫瘍細胞などの癌細胞を使用した検討) により細胞外 (培養液中) に漏出する p62/SQSTM1 の測定に成功していた。腫瘍細胞では強く p62/SQSTM1 が発現していたため、培養液中での ELISA 法による測定は充分可能であった。

血液中 p62/SQSTM1 測定用 ELISA のキット化に向けた研究を進めたが、ELISA 法にて用いるための抗体感受性などの技術的な問題が解決できず、p62/SQSTM1 の ELISA 法による臨床検体の測定には至らなかった。これには、実際の生体内での p62/SQSTM1 の血液中濃度がかかなり低いこと、腫瘍性病変と違い良性病変では発現強度が低いこと、NASH などの疾患では p62/SQSTM1 の変化の程度・割合が少ないことがその原因と考えられた。ELISA 法に用いる抗体を開発するなどして、ELISA 法の感度を 1 桁ないし 2 桁上げる必要があることが判明した。現時点では、肝組織を用いた分子生物学的な手法による測定法を行うことが現時点では最適であると考えられた。

また、上述の様に臨床研究においては、p62/SQSTM1 を用いた診断の特異性を高める目的で、Keap-1 分子を併用して評価を行い、抗酸化能とともに評価することの有用性を確認した。

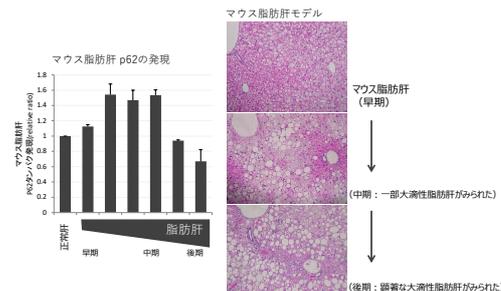


(4) NASH 病態の進行に関連する分子として、脂肪化にともなう新たな分子マーカーを同定した。この分子は、脂肪化により脂肪を覆う脂質二重膜上に発現し、脂肪化をさらに増強し、また脂肪肝による肝細胞傷害を促進することで NASH 病態の進行に関連することが考えられた。今後、この分子の NASH 進行における役割を、特にプログラム細胞死の観点から検討する予定である。

(5) p62/SQSTM1 分子に関しては、NASH 病態に対しての特異性を検討した。p62/SQSTM1 は正常な臓器においてもユビキタスに発現するが、腫瘍などにおいても発現が増強することが確認された。また、マウ

ス肝においては、肝脂肪化が起こるとp62/SQSTM1の発現が上昇し、脂肪化の程度と相関してさらにその発現を増加させた。しかし後期脂肪肝になると、その発現は低下した。そのマウス脂肪肝モデルにおいて、初期には、肝細胞に小滴性脂肪蓄積が認められ、中～後期では大滴性脂肪蓄積が認められたことから、脂肪肝～NASHにおける病態に関して、p62/SQSTM1が何らかの臨床的な意義を持っていることが推測された。

脂肪肝～NASHにおける病態に関して、p62/SQSTM1が臨床的な意義を持っている可能性が示唆された



(6) 最終目標である機能性食品のスクリーニングシステム構築のための研究は、その対象として病態モデル細胞及び疾患モデル動物の作製・利用して研究を進める予定である。これらモデルを用いて、各種プローブの応用研究、マーカー分子の意義・重要性の検討を行い、スクリーニングシステムの開発に役立てていきたい。

<引用文献>

- Haga S, Ozawa T, Yamada Y, Morita N, Nagashima I, Inoue H, Inaba Y, Noda N, Abe R, Umezawa K, Ozaki M、p62/SQSTM1 plays a protective role in oxidative injury of steatotic liver in a mouse hepatectomy model、Antioxidants & Redox Signaling、21 巻、2014、2515-2530

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝、“光”を利用した肝細胞機能制御技術の開発、第 22 回肝細胞研究会、米子コンベンションセンター (鳥取県米子市)、2015/6/4-5
- 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田 直樹、伊 敏、p62/SQSTM1 を基軸とした新たな肝臓・肝細胞保護・機能維持法の探索、第

42 回日本臓器保存生物医学会学術集会、いわて県民情報交流センター (アイーナ) (岩手県盛岡市)、2015/11/13-14

- 芳賀 早苗、荘厳 哲哉、森田 直樹、浅野 真末、尾崎 倫孝、ビルベリーによる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の予防に向けた基礎的検討、第 23 回肝細胞研究会、大阪大学中之島センター (大阪府大阪市)、2016/7/7-8
- 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田 直樹、FXR を起点とした脂肪肝傷害抑制と脂肪化改善の機序、第 25 回日本肝臓生物学会研究会; LBSG-J (プロメテウスの会)、ナスパニューオータニ (新潟県南魚沼郡湯沢町)、2016/9/17
- 芳賀 早苗、荘厳 哲哉、伊 敏、森田 直樹、浅野 真末、尾崎 倫孝、脂肪化肝細胞・脂肪肝に対するビルベリーの効果とその機序の検討、第 24 回肝細胞研究会、旭川市民文化会館 (北海道旭川市)、2017/6/30-7/1

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 直樹 (MORITA, Naoki)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域生物プロセス研究部門・総括研究主幹
研究者番号： 60371085

(2)研究分担者

芳賀 早苗 (HAGA, Sanae)
北海道大学・大学院保健科学研究院・特任講師
研究者番号： 60706505

野田 なつみ (NODA, Natsumi)
北海道大学・大学院保健科学研究院・助教
研究者番号： 30624358
(平成 27 年度まで)

坂井 佳夫 (SAKAI, Yoshio)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・准教授
研究者番号： 80401925
(平成 28 年度まで)

(3)連携研究者

小澤 岳昌 (OZAWA, Takeaki)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号： 40302806

坂下 真実 (SAKASHITA, Mami)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生

命工学領域生物プロセス研究部門・主任研
究員

研究者番号： 20357099

(4)研究協力者

尾崎 倫孝 (OZAKI, Michitaka)