

令和元年6月24日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01850

研究課題名(和文) ヒト非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の新規病態解明と画期的診断法への試み

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms of human non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

研究代表者

安田 和基 (Yasuda, Kazuki)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：80311611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: 以下NASH)の組織試料を用いて、網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、ステージの初期から、機能的に関連した遺伝子群が、協調して発現変動する「遺伝子クラスター」を形成していた。興味深い遺伝子群について、サイトカイン、脂質、酸化ストレスなど、発現を変化させるシグナルや転写因子を、ヒト細胞株を用いて探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは極めて頻度の高い疾患であるだけでなく、肝がんの発生源地として、また心血管病変のハイリスクとして重要であるが、病態の多くが不明で、侵襲的な肝生検以外に確定した診断方法がなく、さらに有効な治療薬もないなど、unmet medical needsの代表的疾患である。本研究は実際のヒト組織を用いてNASHの分子病態を明らかにし、画期的な診断・治療薬の開発への道を開く可能性を秘めた研究である。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive analysis of transcriptome of the liver obtained from Japanese NASH (non-alcoholic steatohepatitis) subjects.

Unsupervised two-way cluster analyses revealed that genes with similar function, such as inflammation, lipid metabolism, cell profanation or fibrosis, constituted co-regulated gene clusters, which were quite compatible with “multiple parallel hits hypothesis” of NASH development. We analyzed mechanisms of transcriptional regulation of two interesting genes, AKR1B10 and a novel member of the same family AKR1B15, using human HuH7 cells, and found specific upstream signals for each gene, suggesting complex pathophysiology of NASH.

研究分野：生活習慣病、内分泌・代謝学

キーワード：NASH 生活習慣病 mRNA 遺伝子発現調節 クラスター

1. 研究開始当初の背景

肝への脂肪蓄積を特徴とする「非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease: 以下 NAFLD）」のうち、約 10%は慢性炎症と肝細胞障害をともなう「非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis: 以下 NASH）」であるとされる。NAFLD、NASH の正確な患者数は不明だが、生活習慣の西洋化や肥満の増加を受けて日本でも急増し、それぞれ少なくとも 1000 万人、100 万人と想定されている。

NAFLD、特に NASH が臨床的に注目される点は 2 つある。1 つは、NASH の約 5-20%が放置すれば肝硬変に移行し、**肝がんの発生源**となることであり、ウイルス対策・治療が劇的に進歩した現在、肝がん対策として最も重要な疾患となりつつあること、もう 1 つは、**NASH は「メタボリック・シンドローム」の肝での表現型**とされ、代謝面で高率にインスリン抵抗性、糖尿病、などをとめない、心血管疾患の罹患率も高いこと、である。

NASH の確定診断には、侵襲的な肝生検が必須であるが、血液バイオマーカー、画像検査はともに診断の補助的な位置づけであり、また有効な薬物治療が存在しない。すなわち、NASH は典型的な「**unmet medical needs**」である。

NASH の病態としては、NAFLD 全体に共通の「肝への脂肪蓄積」（ステップ 1）から、一部が「炎症」の段階（ステップ 2）へ進行するという「two-step theory」が提唱されてきたが、最近では、さまざまな病態が初期から同時進行で関与する、「**multiple parallel hits hypothesis**」が支持されつつある。しかし「multiple hits」の中身は炎症性サイトカイン、酸化ストレス、インスリン抵抗性、遺伝素因ほかさまざまであり、個々の症例で何が生じているのかも全く不明であった。さまざまな NASH モデル動物が提唱されており、我々も、ヒト NASH に最も近いとされる STAM マウスで肝のメタボローム解析の結果を最近報告した（Saito K et al **Sci Rep** 2015）が、こうしたモデル動物ではヒト NASH の臨床像を完全に mimic できてはいない。すなわち、**ヒト組織を用いた NASH 病態の解明が求められていた。**

我々は平成 22 年より、医薬基盤研究所と国立高度専門医療研究センター（ナショナルセンター）を中心とした、「多層的疾患オミックス解析に基づく創薬標的の網羅的探索を目指した研究」プロジェクト（以下「多層的疾患オミックス解析プロジェクト」）にて、高品質のヒト肝組織検体を収集し解析を行ってきた。トランスクリプトーム解析としては、**NASH（境界例を含む）及び非 NASH 合計 104 症例について、マイクロアレイによる網羅的な mRNA 解析を行い、まず NASH の有無や、進行度による分類による群間比較（supervised 解析）にて、AKR1B10 を含む約 500 の遺伝子の、NASH 特異的、あるいはステージ特異的な発現変化を見出した。**

2. 研究の目的

NASH について、ヒト肝組織試料を用いて、遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、病態の分子機序を解析する。さらに遺伝子発現調節機序の観点から、NASH の病態を解析し、NASH の各病態レベルでの非侵襲的な診断への道を拓く。

3. 研究の方法

我々は平成 22 年より、医薬基盤研究所と国立高度専門医療研究センター（ナショナルセンター）を中心とした、「多層的疾患オミックス解析に基づく創薬標的の網羅的探索を目指した研究」

プロジェクトにて、高品質のヒト肝組織検体を収集し解析を行ってきた。トランスクリプトーム解析としては、NASH（境界例を含む）及び非NASH 合計 104 症例について、マイクロアレイによる網羅的な mRNA 解析を行い、NASH の有無や、進行度による分類による群間比較（supervised 解析）にて、*AKR1B10* を含む約 500 の遺伝子の、NASH 特異的、あるいはステージ特異的な発現変化を見出している。

そこで本研究では、サンプルとプローブ双方について unsupervised two-way clustering を行い、発現変動パターンの類似した遺伝子クラスターを解析する。

また、得られた遺伝子から興味深い遺伝子を選び、ヒト肝実質細胞の系として HuH7 細胞および HepG2 細胞を用い、NASH に関与する刺激・病態として、脂質（パルミチン酸）、ER ストレス（タプシガルギン）、炎症シグナル（ $TGF\beta$ 、 $IL-1\beta$ 、LPS など）、酸化ストレス（過酸化水素や、 $NRF2$ 活性化剤 tBHQ など）、低酸素、線維化誘導（ $TGF\beta$ ）、などにより、目的遺伝子の発現が変化するかどうかを調べ、変化を認めた場合はそれを仲介するプロモータ領域の解析、などを行った。

4. 研究成果

- 1) サンプルとプローブ双方について unsupervised two-way clustering を行ったところ、プローブ（遺伝子）側は発現変動パターンの類似したいくつかのクラスターに分かれた。少なくとも 10 以上の遺伝子を含むサブクラスターについて詳細

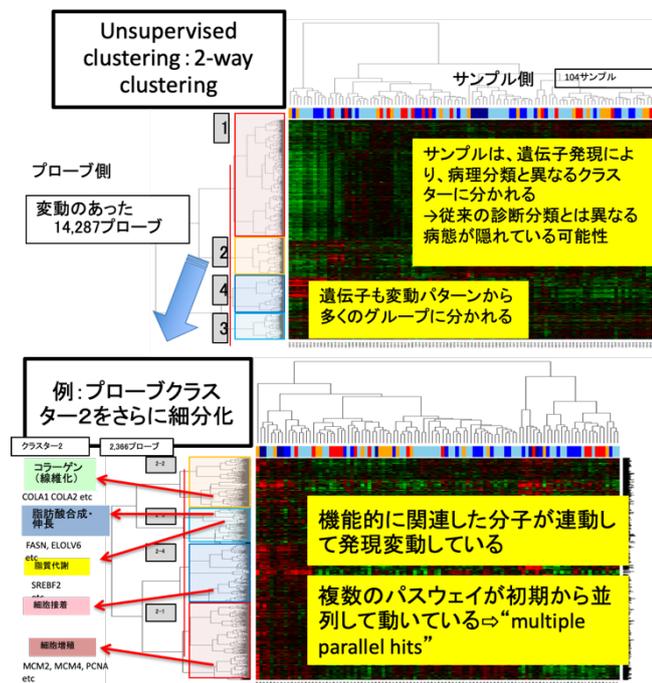
に検討すると、の中には、「細胞周期・細胞増殖」「脂質代謝」「脂肪酸合成」「線維化」など特定の機能や病態ときわめてよく関連するものが認められた（図 1）。また驚いたことに、遺伝子全体を用いた場合のサンプル側のクラスターは、病理診断による進行度分類とあまり一致せず、遺伝子クラスター（あるいはサブクラスター）との相関により、さまざまに分類されることがわかった。すなわち、NASH は単純な病態が一方向性に進行するのではなく、複数の病態が様々な割合で同時に

並行して進行しており、「multiple parallel hits hypothesis」が裏づけられた。

- 2) 得られたサブクラスター、および NASH における発現のたかい遺伝子から、興味深い遺伝子として、*AKR1B10* (Aldo-keto reductase family 1 member B10) および *AKR1B15* を取り上げ、肝細胞における発現誘導因子の探索と発現制御機構の解析を行った。

AKR1B10 は、すでに NASH や NASH 発がんにおける発現や病態との関係が病理学的、生化学的に注目されているが、その機能的な意義や発現調節機構については十分わかっていない。HuH7 細胞と HepG2 細胞に、塩化コバルト ($CoCl_2$) 刺激を行うと、*AKR1B10* 発現量は

図 1: ヒト NASH 肝のトランスクリプトーム



20, 2.7 倍にそれぞれ増加した。また、ヒト *AKR1B10* プロモーターを用いたレポーターアッセイにより CoCl_2 刺激の応答領域は転写開始点上流 1kb までのプロモーター内に存在することが示唆された (図 2)。 CoCl_2 刺激は低酸素の効果をミミックするとされているので、HIF1A、HIF2A のノックダウン実験を行なったが、内因性の *AKR1B10* の発現はそれぞれ増加 (図 3)、不変、であった。すなわち HIF1A、HIF2A は CoCl_2 刺激による *AKR1B10* の発現誘導に寄与していないこと、HIF1A はそれとは別に、発現抑制に働いている可能性が示唆された。従って、 CoCl_2 の効果を仲介する転写因子は不明であり、現在検討中である。なお *AKR1B10* はこのほか、脂肪酸、酸化ストレス、などでも発現が誘導された。

図 2 : *AKR1B10* 転写開始点上流における、 CoCl_2 刺激応答領域の探索

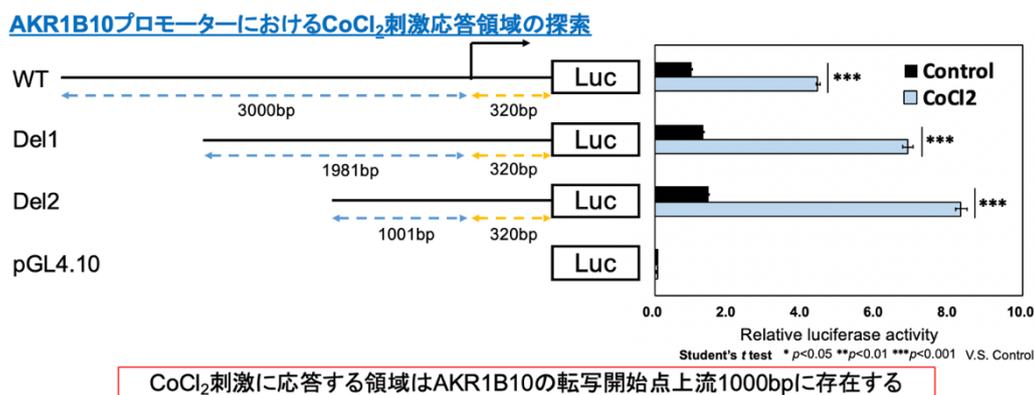
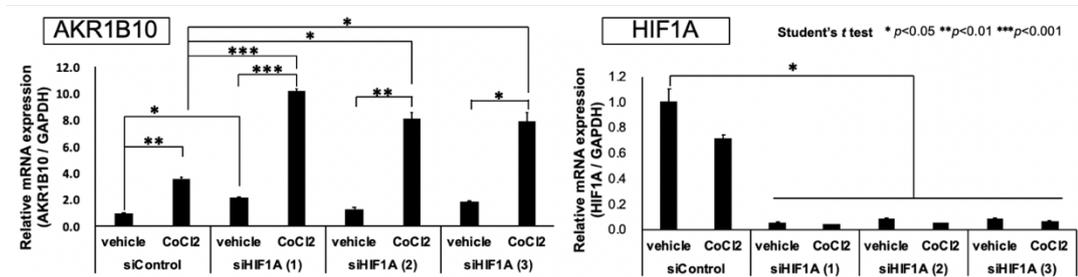


図 3 : HIF1Aのノックダウンにより、 CoCl_2 刺激による*AKR1B10*発現誘導は、減弱せずむしろ増強する



また *AKR1B15* は、2011 年に新規の AKR family 遺伝子として報告され、ヒトでは *AKR1B10* と 91% 相同性があり、かつ同じ染色体上に近接して存在するため、機能的な関連が示唆されるが、これまで発現調節や機能についてはほとんど報告がなかった。*AKR1B15* には、転写開始点の異なる 2 つのアイソフォーム (*AKR1B15.1* および *AKR1B15.2*) が存在するが、我々は HuH7 細胞において、NRF2 活性化剤とされる tBHQ 刺激により *AKR1B15.1* の発現が約 6 倍上昇すること、NRF2 の過剰発現でも発現が誘導されること、この作用を、転写開始点上流 1.5kb から 1kb までの間の領域が主に仲介し、そこに存在する、NRF2 結合予測部位のうちの一つが関与していること、を見出した。すなわち *AKR1B10* と *AKR1B15* は、先の解析で同じ遺伝子クラスターに存在し、機能的な類似性も予想されるにも関わらず、少なくとも *in vitro* ではかならずしも調節機構が完全に同一ではないことが明らかになった。

〔雑誌論文〕（計 2 件）

Kuramoto J, Arai E, Tian Y, Funahashi N, Hiramoto M, Nammo T, Nozaki Y, Takahashi Y, Ito N, Shibuya A, Ojima H, Sukeda A, Seki Y, Kasama K, Yasuda K, Kanai Y. Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: Comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis. **Carcinogenesis**, 38(3): 261-270, 2017.

Uehara D, Hayashi Y, Seki Y, Kakizaki S, Horiguchi N, Tojima H, Yamazaki Y, Sato K, Yasuda K, Yamada M, Uraoka T, Kasama K. Non-invasive prediction of non-alcoholic steatohepatitis in Japanese patients with morbid obesity by artificial intelligence using rule extraction technology. **World J Hepatol** 10(12): 934-943, 2018.

〔学会発表〕（計 3 件）

- ・ 舟橋伸昭、宇田川陽秀、南茂隆生、上番増喬、西村渉、平本正樹、松本健治、関洋介、笠間和典、安田和基「日本人高度肥満症由来 NASH 肝のトランスクリプトーム解析」第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会、平成 28 年 7 月 16 日、金沢
- ・ 舟橋伸昭、宇田川陽秀、南茂隆生、安田和基「肝細胞における AKR1B10 の発現制御メカニズムの解析」第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会、平成 30 年 5 月 24 日～26 日、東京
- ・ 舟橋伸昭、宇田川陽秀、南茂隆生、安田和基「ヒト NASH 肝で高発現する AKR1B15 の発現制御機序および機能解析」第 5 回肝臓と糖尿病・代謝研究会、平成 30 年 7 月 21 日、米子

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者: なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 南茂 隆生、舟橋 伸昭

ローマ字氏名: Nammo Takao, Funahashi Nobuaki