

令和元年6月19日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08750

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームに対する抗酸化酵素PRDX4の予防メカニズムの解析

研究課題名(英文)Protective Effects of Peroxiredoxin 4 (PRDX4) on Metabolic Syndrome

研究代表者

山田 壮亮 (YAMADA, Sohsuke)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：90525453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいままで、「メタボリックシンドローム」を主な研究テーマとして、病変部における酸化ストレスの制御を切り口とした解析から、病変形成の一機序を解明してきた。特に、酸化ストレスが重要な炎症・アポトーシス誘発因子であることに注目して、唯一分泌型であることが知られている抗酸化酵素ヒトPRDX4のトランスジェニック(Tg)マウスを独自に作製し、様々な animal model の詳細な解析の中から、動脈硬化、糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎や肝細胞癌等を含む、生活習慣病から悪性腫瘍に亘る幅広い疾患に対するPRDX4の生体内防御作用を示してきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のグループでは、ヒトPRDX4 (hPRDX4)のトランスジェニックマウス(Tg)を独自に作製し、PRDX4が酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン、アポトーシスを抑制し、メタボリックシンドローム回避に傾かせしめ得ることを解明してきた。これらの研究成果により、PRDX4の特殊性、特異性を際立たせることが可能となった。

これら我々の包括的な基礎研究が、将来的に臨床応用にまで結びつけば、非常に有意な独創性・社会的意義を持っていると確信される。

研究成果の概要(英文)：The peroxiredoxin (PRDX) 4 is the only known secretory form and protects against oxidative damage by scavenging reactive oxygen species in both the intracellular compartments and the extracellular space. We generated unique human PRDX4 (hPRDX4) transgenic (Tg) mice and investigated the critical/diverse protective roles of PRDX4 against diabetes mellitus, atherosclerosis, insulin resistance, and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) as well as evaluated its role in the intestinal function in various animal models. Our published data have shown that PRDX4 helps prevent the progression of metabolic syndrome by reducing local and systemic oxidative stress and synergistically suppressing steatosis, inflammatory reactions, and/or apoptotic activity. These observations suggest that Tg mice may be a useful animal model for studying the relevance of oxidative stress on inflammation and the dysregulation of lipid/bile acid/glucose metabolism upon the progression of human metabolic syndrome.

研究分野：メタボリックシンドローム

キーワード：抗酸化ストレス因子 PRDX4 メタボリックシンドローム 予防

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

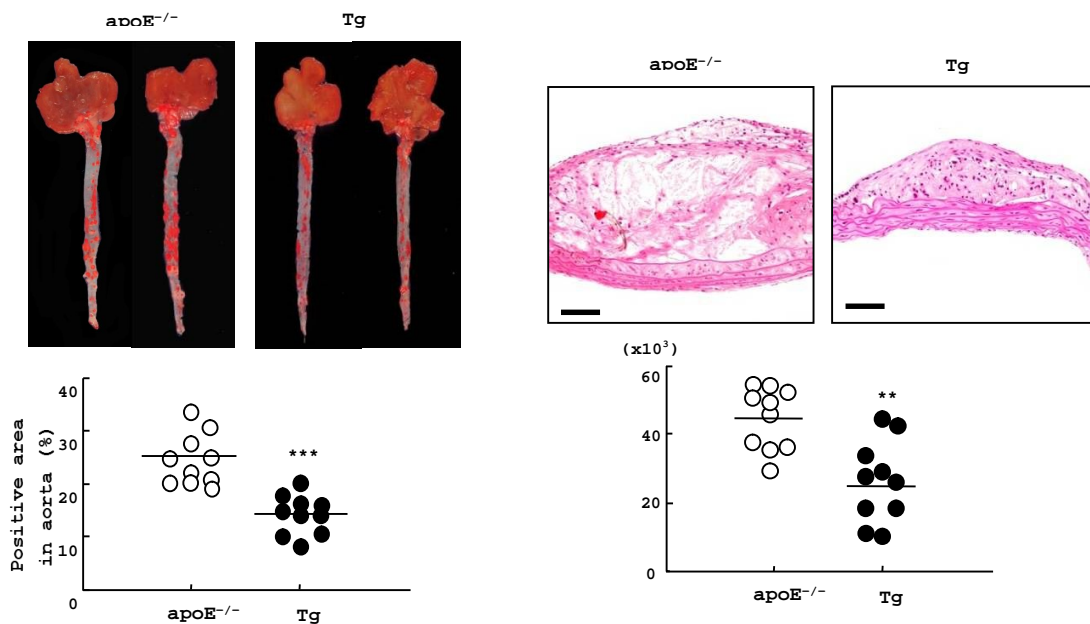
### 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームに対する抗酸化ストレスの防御的役割に関して、特に PRDX4 に焦点を当てて検索し、かつ、飽食・偏食・運動不足等に起因し増加している肥満、NASH、そして T2DM 等の緊急の問題点を解決する、独創的な実験研究を行って参りたい。

我々が PRDX family の中で PRDX4 に特に着目したのは、唯一分泌型として知られ、血管内を含む細胞外領域において酸化ストレスを排除し組織障害から防御し得る、独特な機能を有するとされているからである。ただ、生体内における役割については未だ解明されていない点も多かった。我々は、T1DM と動脈硬化(Figure 1)に対するヒト PRDX4 (hPRDX4) の保護・防御的機構を解明し発表した (Ding Y, Yamada S, Sasaguri Y et al., *Antioxid Redox Signal*, 13(10), 2010. [IF = 8.21] 掲載。Guo X, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 17(10), 2012. [IF = 7.19] 掲載。 Corresponding author)。

**Figure 1. High-cholesterol diet (HcD) 誘引粥腫モデルにおける、Tg mice の防御的特異性**

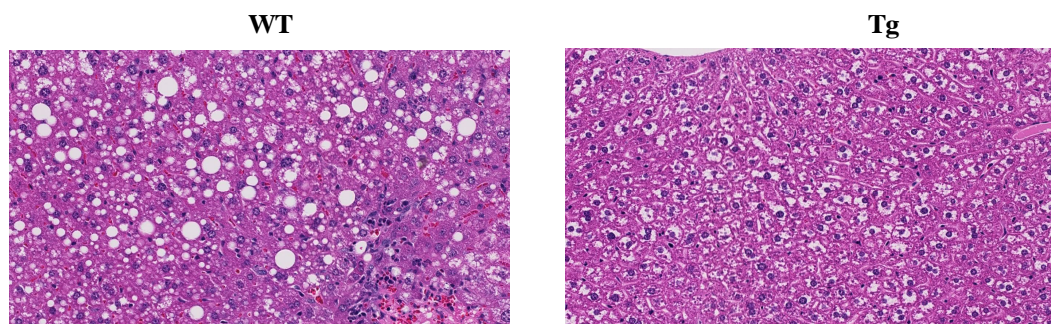
**HcD 12 wk 後、oil red-O 染色 (肉腫) および H&E 染色 (組織) にて、Tg 動脈粥状硬化は有意に減少した。**



さらなるターゲットとして生活習慣病に動物実験モデルを敷衍させ、hPRDX4 の高発現は NASH (Figure 2)/T2DM から保護・防御的に作用していることも報告し得た(Nabeshima A, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 19(17), 2013. [IF = 7.67] 掲載。 Corresponding author)。

**Figure 2. NASH モデルにおける、Tg mice の防御的特異性**

**Tg 肝の脂肪沈着、および炎症細胞浸潤の程度において、WT 肝に比較して有意に抑制されていた。**



特に、最近注目され解明の進んでいる NASH に関しては、'two-hit theory'なるものが良く知られており、'first hit'として肥満誘因性の脂肪肝、さらに'second hit'として

「酸化ストレス」を介しての肝細胞アポトーシスは必須で、後者が可逆的な脂肪肝を慢性進行性肝疾患へと移行させ得る。一方で、肥満により肥大化した脂肪細胞では、遊離脂肪酸 free fatty acid (FFA)が増加して「酸化ストレス」亢進状態に陥らせ、インスリンシグナル伝達障害、つまるところインスリン抵抗性が発生する、と考えられている。さらにそれら生じた「酸化ストレス」によって膵β細胞障害が直接惹き起こされることにより、インスリン抵抗性と相まって T2DM も発生するとされるメカニズムが提唱されている。以上より、keyword としての「酸化ストレス」を抑制することが、NASH や T2DM をも内包した、いわゆるメタボリックシンドロームを予防することに繋がり、ひいては動脈硬化関連性梗塞疾患の発生を未然に防ぎ得ると示唆される。我々の健康を守る、その one factor として、抗酸化作用を有する新しい蛋白群 PRDX family の一つ、**PRDX4** を我々は採り上げてきたのである。

しかしながら未だ、肝組織のみに焦点が当たっており、NASH 解明へ向けて生体内での全体病理像が見えていないのが実情である。ここで、メタボリックシンドロームの病因解明に向けて、我々は小腸組織にも着目した。生体と食餌間における生理学的門番 gatekeeper は正に小腸粘膜であり、栄養素の効果的吸収や代謝経路において中心的役割をも果たしている。一方で、腸内細菌叢の組成の変化と、T2DM および NASH 進行との深い関連性も多数報告されている。

今回我々は、メチオニン・コリン欠乏 + 高脂肪 (MCD + HF) 食による古典的 NASH モデルを作製し、肝・膵・腎だけではなく、腸管も含めた諸臓器の代謝・組織変化の検討を進める。

## 2. 研究の目的

我々は、抗酸化作用を有する新しい蛋白群、ペルオキシレドキシン peroxiredoxin (PRDX) family の一つである、ヒト *PRDX4* のトランスジェニックマウス(Tg)を作製し、膵島炎 (1型糖尿病) や動脈硬化だけでなく、2型糖尿病(T2DM)や非アルコール性脂肪性肝炎(NASH) にも、PRDX4 が生体における保護・防御的機構および抑制効果を有していることを明らかにしてきた (2010, 2012 and 2013 in *Antioxid Redox Signal* 掲載)。

これまでの研究から、ヒトにおけるメタボリックシンドロームに対して、PRDX4 が抑制的・予防的に働いているとの仮説を立てた。Tg マウスを用いた animal model の病理組織学的解析を中心に、さらにその予防メカニズムに対する検討を進め、PRDX4 を含む抗酸化酵素の治療応用を模索して参りたい。

## 3. 研究の方法

### (1). Tg に対する MCD + HF 食負荷による NASH モデルの作製

8 週令の Tg と C57BL/6 wild type (WT) マウス各々に、**Methionine- and choline-deficient diet** メチオニン・コリン欠乏(MCD) + high fat 高脂肪(HF) diet (MCD + HF)を継続負荷し、2 もしくは 4 週経過した時点で解剖を行い、肝・小腸を含めた全身各諸臓器を摘出する。

血清学的、肉眼的、組織学的、分子生物学的、様々な角度から、肥満・DM・NASH を評価し、両群間における比較検討を行って参りたい。

### (2). 小腸上皮培養細胞における検討

小腸粘膜組織より分離・培養した上皮細胞を用いて、酸化ストレスが及ぼす影響・効果等々を *in vitro* で追究して参りたい。

#### 4 . 研究成果

ペルオキシレドキシシン（以下 PRDX）は抗酸化作用を有する一酵素群であり、少なくとも 6 種類に及ぶ生体内発現が報告されている。特に PRDX4 は唯一の分泌型として発現しており、血管内を含む細胞外領域において酸化ストレスからの組織傷害を防御する役割を持っているとされている。我々が PRDX family の中で唯一分泌型の PRDX4 に、特に着目し、ヒト PRDX4 (hPRDX4)のトランスジェニックマウス(Tg)を独自に作製し、2 型糖尿病、動脈硬化、および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や胆管閉塞性肝障害に対する、hPRDX4 の保護・防御的機構および抑制効果を有していることを明らかにした (Ding Y, Yamada S, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2010. [IF = 8.21]; Guo X, Yamada S※, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2012. [IF = 7.19]; Nabeshima A, Yamada S※, et al., *Antioxid Redox Signal*, 2013. [IF = 7.67]; Nawata A, Yamada S※, et al., *PLoS One*, 2016. [IF = 2.81]; & Jing Z, Yamada S※, et al., *Int J Mol Sci*, 2018. [IF = 3.68]. ※Corresponding author)。

特に、Tg マウスでは、局所及び全身性に発現した PRDX4 が、肝臓だけでなく小腸組織においても、生体にとって有益に働いていることを明らかにした。これは、世界で初めての知見である。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件) Corresponding Author

1. *Antioxid Redox Signal*, Guo X, Noguchi H, Ishii N, Homma T, Hamada T, Hiraki T, Zhang J, Matsuo K, Yokoyama S, Ishibashi H, Fukushima T, Kanekura T, Fujii J, Uramoto H, Tanimoto A, **Yamada S** . 論文(原著) 査読あり  
The Association of Peroxiredoxin 4 with the Initiation and Progression of Hepatocellular Carcinoma. (2019, 30(10): 1271-1284.)
2. *Int J Med Sci*, Shioya A, Guo X, Motono N, Mizuguchi S, Kurose N, Nakada S, Aikawa A, Ikeda Y, Uramoto H, **Yamada S** . 論文(原著) 査読あり  
The Combination of Weak Expression of PRDX4 and Very High MIB-1 Labelling Index Independently Predicts Shorter Disease-free Survival in Stage I Lung Adenocarcinoma. (2018, 15(10): 1025-1034.)
3. *Int J Mol Sci*, Zhang J, Guo X, Hamada T, Yokoyama S, Nakamura Y, Zheng J, Kurose N, Ishigaki Y, Uramoto H, Tanimoto A, **Yamada S** . 論文(原著) 査読あり  
Protective Effects of Peroxiredoxin 4 (PRDX4) on Cholestatic Liver Injury. (2018, 19(9). pii: E2509.)
4. *Pathol Int*, **Yamada S** , Guo X, 論文(総説) 査読あり  
Peroxiredoxin 4 (PRDX4): Its critical in vivo roles in animal models of metabolic syndrome ranging from atherosclerosis to nonalcoholic fatty liver disease. (2018, 68(2): 91-101)
5. *J Atheroscler Thromb*, **Yamada S**, Kawaguchi H, Yamada T, Guo X, Matsuo K, Hamada T, Miura N, Tasaki T, Tanimoto A . 論文(原著) 査読あり  
Cholic Acid Enhances Visceral Adiposity, Atherosclerosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Microminipigs. (2017, 24(11): 1150-1166.)

6. *Histol Histopathol*, **Yamada S**, Noguchi H, Tanimoto A. 論文(総説) 査読あり  
Critical and diverse in vivo roles of apoptosis signal-regulating kinase 1 in animal models of atherosclerosis and cholestatic liver injury. (2017, 32(5): 433-444.)
7. *Nat Commun*, Schweiger M, Romauch M, Schreiber R, Grabner GF, Hütter S, Kotzbeck P, Benedikt P, Eichmann TO, **Yamada S**, Knittelfelder O, Diwoy C, Doler C, Mayer N, De Cecco W, Breinbauer R, Zimmermann R, Zechner R. 論文(原著) 査読あり  
Pharmacological inhibition of adipose triglyceride lipase corrects high-fat diet-induced insulin resistance and hepatosteatosis in mice. (2017, 8: 14859.)
8. *PLoS One*, Nawata A, Noguchi H, Mazaki Y, Kurahashi T, Izumi H, Wang KY, Guo X, Uramoto H, Kohno K, Taniguchi H, Tanaka Y, Fujii J, Sasaguri Y, Tanimoto A, Nakayama T, **Yamada S**. 論文(原著) 査読あり  
Overexpression of Peroxiredoxin 4 Affects Intestinal Function in a Dietary Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. (2016, 11(4): e0152549)
9. *Pathol Int*, **Yamada S**, Tanimoto A, Sasaguri Y. 論文(総説) 査読あり  
Critical in vivo roles of histamine and histamine receptor signaling in animal models of metabolic syndrome. (2016, 66(12): 661-671)

〔学会発表〕(計 6件)

1. Yamada S. The Association of Peroxiredoxin 4 with the Initiation and Progression of Hepatocellular Carcinoma. Forum on Taiwan-Japan Clinical Research and Application of Regenerative Medicine, Kaohsiung City, Taiwan. October 4, 2018.
2. 山田壮亮. 動脈硬化から Metabolic syndrome へ ~ 遺伝子改変動物モデルを用いた病理組織学的検討 ~ 第 107 回日本病理学会総会、北海道. 2018 年 (\*ワークショップ)
3. Yamada S, Noguchi H, Guo X, Ikeda Y, Tanimoto A, Sasaguri Y, Hirano KI. An Outside-In Signaling by Cuff-Injury Induces Vascular Remodeling Mimicking Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy. 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、広島. 2017 年(\*優秀ポスター賞 受賞)
4. 山田壮亮. 遺伝子改変動物モデルを用いた、動脈硬化における炎症病理学的検討. 第 63 回日本病理学会秋期特別総会、東京. 2017 年 (\*日本病理学会平成 29 年度学術研究賞 (A 演説) 受賞)
5. 山田壮亮. 抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン(PRDx)4 と metabolic syndrome. 第 14 回日本病理学会カンファレンス、名古屋. 2017 年 (\*講演)
6. Yamada S, Nawata A, Noguchi H, Wang KY, Nakayama T, Sasaguri Y. PRDX4 overexpression

induces an adaptive intestinal lipid metabolism in a NAFLD mouse model. 第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

1. 山田壮亮, 笹栗靖之. マウスモデルおよび細胞培養と実験的粥状動脈硬化症. 粥状動脈硬化症. アトムス, 東京. p.143–155, p.223–234. (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<https://clinpath.wixsite.com/clinpathsite>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：郭 シン

ローマ字氏名： (GUO, Xin)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ): 40816328

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：谷本 昭英

ローマ字氏名： (TANIMOTO, Akihide)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。