

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08781

研究課題名（和文）ヒト型NASHモデルマウスの病態発症機序に対する多臓器連関からのアプローチ

研究課題名（英文）A multi-organ linkage approach to the pathogenesis of disease in human like NASH model mice

研究代表者

蕨 栄治（Warabi, Eiji）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70396612

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）：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が肝細胞に起こり、炎症・線維化をきたす致死性の疾患である。本研究は、NASHを自然発症するp62ならびにNrf2遺伝子を二重欠損した（DKO）マウスを用いて、その発症機序について解析した。その結果、DKOマウスは、野生型マウスと比較してグラム陰性菌の割合が増加していること、さらに糞便中に炎症性の代謝物質が多く含まれること、腸管バリア機能の低下、肝クッパー細胞の貪食能の低下が病態に深く関わっていることが示された。また、これらの原因には、Nrf2の欠損の影響が大きいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では200万人以上のNASH罹患者がいると推定され、今後も増大することが予想されており、その対策が社会的急務となっている。NASH患者には肥満・糖尿病・脂質異常症などを持つ人が多く、生活習慣病を背景に発症するものと考えられているが、詳細な機序は不明である。また、治療は食生活の改善、運動療法が有効であるが、根本的な治療法、治療薬は存在しない。本研究は、代表者らが新たに開発したヒトNASHと類似した病態を呈するマウスモデルを用いて、NASH発症機序を解析した。得られた成果は、NASHの予防、治療に有用な知見となる。

研究成果の概要（英文）：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a fatal disease caused by the accumulation of fat, mainly triglycerides, in hepatocytes, resulting in inflammation and fibrosis. In the present study, we analyzed the pathogenesis of NASH in spontaneously developing p62 and Nrf2 double-deleted (DKO) mice. The results showed that the increased percentage of gram-negative bacteria in DKO mice compared to wild-type mice, high levels of inflammatory metabolites in the feces, decreased intestinal barrier function, and decreased phagocytosis of hepatic kupffer cells were deeply involved in the disease. It was suggested that Nrf2 deficiency was a major factor in these causes.

研究分野：分子生物学

キーワード：NASH

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NASH 患者には肥満・糖尿病・脂質異常症などを持つ人が多く、生活習慣病を背景に発症するものと考えられているが、詳細な機序は不明である。また、治療は食生活の改善、運動療法が有効であるが、根本的な治療法、治療薬は存在しない。

その原因には有用なモデル動物がないことが挙げられる。これまでに報告されている NASH モデル動物としては、メチオニン・コリン欠乏食投与による食餌誘導性マウス、ラットモデルや、数種の遺伝子改変マウスが知られている(World J Gastroenterol., 2012)が、いずれも過剰な高脂肪食の投与を必要としたり、不自然な体重の減少や急激な症状の進行を認めたりと、これらのモデルは生活習慣病を基盤とするヒト NASH の病態とはかなり乖離しているという問題点があった。

そこで、その遺伝子欠損マウスが過食肥満を呈する p62 と、酸化ストレス防御系に中心的な役割を果たす転写因子である Nrf2 に着目し、それらの遺伝子を二重欠損したマウスを作製した。その結果、p62:Nrf2 遺伝子二重欠損(DKO)マウスは、通常の飼育環境下、通常の食事下でメタボリックシンドロームを発症し、壮年期以降に肝臓組織に炎症、線維化をきたし、加齢とともにその病態が悪化する NASH 自然発症マウスであることが明らかとなった。更に、このマウスは 50-60 週齢の高齢期に約 10%の確率で前癌病変と見られる肝腫瘍を発生することもわかり、ヒト NASH の転帰と極めて類似したこれまでにない新規な NASH モデルを作製することに成功した(特開 2013-208062)。DKO マウスの性質として以下のことが明らかになりつつある。

- (1) 過食に起因する内臓脂肪の増大と腸内細菌叢の変容に伴うエンドトキシン産生量の増大
- (2) 腸管バリア機能低下による肝臓へのエンドトキシン流入量の増大
- (3) 肝クッパー細胞の異物貪食能の低下と炎症反応の亢進

すなわち、NASH 発症には腸管-脂肪組織-肝臓の臓器間クロストークが発症の鍵となっていることが予想される。本研究は以上の新知見にさらに踏み込んで、その背景にあるシステムの異常を組織、細胞、分子レベルで解明することで、現在根本的な治療法のない NASH に対し創薬の標的とすべき臓器やシステムに関する革新的な知見をもたらすことができると考え立案した。

2. 研究の目的

本研究は、新規 NASH モデル「p62 および Nrf2 遺伝子二重欠損 (DKO) マウス」における NASH 発症機序について、多臓器連関に着目し、発症の責任となる組織、細胞を同定すること、さらにそこにおける異常の原因を分子レベルで解明することが目的である。

3. 研究の方法

(1)次世代シーケンサーを用いて DKO マウスの腸内細菌叢を野生型と比較した。

(2)DKO マウスの便に含まれる炎症性代謝産物プロファイルを、フラクション分画した便抽出物について、Raw-blue 細胞を用いた NF-κB レポーターアッセイにより解析した。

(3)個体レベルでの Nrf2 の NASH 発症への影響を解析するために、組織特異的な Nrf2 発現マウスを作製した。このマウスは、Cre 依存的に翻訳および転写終始シグナルを含む人工ノックイン遺伝子が除去されることにより、全身で Nrf2 を欠損するが特定の組織でのみ Nrf2 の遺伝子発現が回復することを狙ったものであり、本研究では、骨髄系細胞における Cre ドライバーマウスである Lyz2-Cre マウスを用いて、骨髄細胞特異的な Nrf2 発現マウスを作製した。このマウスに NASH 誘導食餌として知られるメチオニン・コリン欠乏食 (MCDD) を投与し、NASH 病態を野生型および全身 Nrf2 欠損マウスと比較した。

4. 研究成果

(1) DKO マウスでは野生型および Nrf2 単独欠損と比較してグラム陰性菌の割合が増加しており、この現象は p62 欠損マウスでも見られたため過食に起因した腸内細菌叢の変容が起きていることが示唆された。また、菌叢の特徴として、グラム陰性菌であるプレボテラ属、バクテロイデス属の全菌叢に対する比率が DKO マウスでのみ上昇していた(図1)。

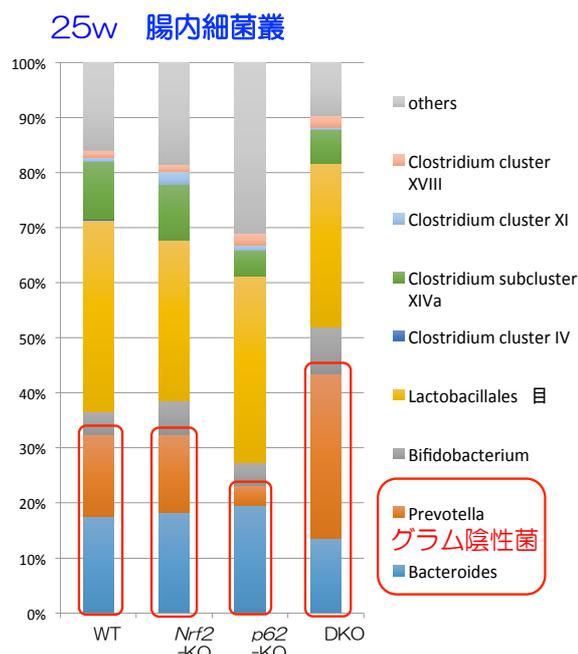


図1 25週齢における腸内細菌叢

(2)水溶性画分では、野生型、DKO 間における炎症反応に差は認められなかったが、脂溶性画分において DKO で有意に炎症反応性物質を含む画分が複数見つかった。さらに、総炎症反応惹起活性についても、約 2 倍 DKO マウスの脂溶性画分で高かった。

(3)クッパー細胞を含む骨髄系細胞のみで Nrf2 を発現するマウスを得ることに成功した。MCDD 誘導性 NASH 発症に対し、マクロファージにおける Nrf2 が強く関係していることが血液生化学検査値、肝病理学的解析により示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshida T, Terabe T, Nagai H, Uchida F, Hasegawa S, Nagao T, Miyabe S, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Warabi E, Goshio M, Yanagawa T, Bukawa H. | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 Association between p62 expression and clinicopathological characteristics in oral leukoplakia. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clin Exp Dent Res. | 6. 最初と最後の頁 389-397 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/cre2.193. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamada M, Iwata M, Warabi E, Oishi H, Lira VA, Okutsu M. | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 p62/SQSTM1 and Nrf2 are essential for exercise-mediated enhancement of antioxidant protein expression in oxidative muscle. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 FASEB J. | 6. 最初と最後の頁 8022-8032 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1096/fj.201900133R. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Ishii T, Warabi E. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Mechanism of Rapid Nuclear Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Activation via Membrane-Associated Estrogen Receptors: Roles of NADPH Oxidase 1, Neutral Sphingomyelinase 2 and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3390/antiox8030069. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Akiyama K, Warabi E, Okada K, Yanagawa T, Ishii T, Kose K, Tokushige K, Ishige K, Mizokami Y, Yamagata K, Onizawa K, Ariizumi SI, Yamamoto M, Shoda J | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously results in the development of nonalcoholic steatohepatitis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Exp Anim. | 6. 最初と最後の頁 201-218 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.17-0112. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Ishii T, Warabi E, Mann GE. | 4. 巻 119 |
| 2. 論文標題 Circadian control of p75 neurotrophin receptor leads to alternate activation of Nrf2 and c-Rel to reset energy metabolism in astrocytes via brain-derived neurotrophic factor. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Free Radic Biol Med. | 6. 最初と最後の頁 34-44 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.026. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsumoto T, Kaifuchi N, Mizuhara Y, Warabi E, Watanabe J. | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Use of a Caco-2 permeability assay to evaluate the effects of several Kampo medicines on the drug transporter P-glycoprotein. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 J Nat Med. | 6. 最初と最後の頁 897-904 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1222-x. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Sumitomo A, Yukitake H, Hirai K, Horike K, Ueta K, Chung Y, Warabi E, Yanagawa T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Narumiya S, Hirano T, Niwa M, Sibille E, Hikida T, Sakurai T, Ishizuka K, Sawa A, Tomoda T. | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 ULK2 controls cortical excitatory-inhibitory balance via autophagic regulation of p62 and GABAA receptor trafficking in pyramidal neurons. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Hum Mol Genet. | 6. 最初と最後の頁 3165-3176 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy219. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ishii T, Warabi E, Mann GE. | 4. 巻 133 |
| 2. 論文標題 Circadian control of BDNF-mediated Nrf2 activation in astrocytes protects dopaminergic neurons from ferroptosis. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Free Radic Biol Med. | 6. 最初と最後の頁 169-178 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.002. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|------------------|
| 1. 著者名 Ishii T, Warabi E. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Mechanism of Rapid Nuclear Factor-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Activation via Membrane-Associated Estrogen Receptors: Roles of NADPH Oxidase 1, Neutral Sphingomyelinase 2 and Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Antioxidants | 6. 最初と最後の頁 69 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox8030069. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 E. Warabi, K. Akiyama, K. Okada, T. Yanagawa, S. Takahashi, T. Ishii and J. Shoda. |
| 2. 発表標題 Sqstm1/p62 and Nrf2 double knockout mice spontaneously develop nonalcoholic steatohepatitis. |
| 3. 学会等名 Physiology 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 E. Warabi, A. Hakamata, J. Uwayama, T. Yanagawa and T. Ishii. |
| 2. 発表標題 17β-Estradiol protects sequestosome 1 deficient mice from hyperphagia and obesity. |
| 3. 学会等名 Physiology 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kanako Nishi, Eiji Warabi, Satoru Takahashi. |
| 2. 発表標題 Role of p62 in leptomycin B cytotoxicity. |
| 3. 学会等名 Tsukuba Conference 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ishii T, Warabi E, Mann GE |
| 2. 発表標題 DNF-p75NTR signaling axis regulates circadian activation of Nrf2 in astrocytes |
| 3. 学会等名 24th Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 秋山健太郎、藤 栄治、 正田純一 |
| 2. 発表標題 NASH自然発症マウスにおける腸内細菌叢と腸管上皮バリア機能の異常 |
| 3. 学会等名 JDDW2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 長岡亜実、秋山健太郎、藤 栄治、正田純一 |
| 2. 発表標題 p62:Nrf2遺伝子二重欠損 (DKO) マウスは と比較して非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の肝病変は軽度である |
| 3. 学会等名 JDDW2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小峰昇一、 秋山健太郎、藤 栄治、正田純一 |
| 2. 発表標題 継続的運動はDHEA産生増加を介してKupffer細胞 (KC) 貪食能の向上によるLPSに対する生体クリアランス増大と炎症応答の低下を誘導する |
| 3. 学会等名 JDDW2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小峰昇一、呉世昶、藤 栄治、正田純一 |
| 2. 発表標題 スルフォラファンによる転写因子Nrf2の賦活化が運動耐容能に与える影響 |
| 3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小峰昇一、秋山健太郎、藤 栄治、正田純一. |
| 2. 発表標題 継続的な運動負荷がエンドトキシンのクリアランスと炎症応答に与える影響 |
| 3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 長岡亜実、秋山健太郎、藤 栄治、正田純一 |
| 2. 発表標題 p62: Nrf2遺伝子二重欠損(DKO)マウスのNASH病態の性差と女性ホルモンの関わり |
| 3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 秋山健太郎、藤 栄治、正田純一. |
| 2. 発表標題 p62: Nrf2遺伝子二重欠損マウスの非アルコール性脂肪性肝炎発症における腸管由来のエンドトキシンの関与 |
| 3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|