

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11581

研究課題名(和文) 低酸素脳症および中毒性肝障害の組織・細胞応答メカニズムの解析

研究課題名(英文) Cellular and tissue response to hypoxic brain and toxic liver injuries

研究代表者

伊関 憲 (Iseki, Ken)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70332921

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)：癌抑制蛋白p53とTGFβのシグナル経路が、情報伝達制御蛋白ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)によってどのように制御されるかを解析した。X線照射実験において、ゼータ型DGK-KOマウスでは、野生型と比較し脾臓においてp53の著しいタンパク発現誘導が観察され、生存率が有意に低いことが明らかとなった。また四塩化炭素投与による中毒性肝障害モデル実験において、アルファ型DGK-KOマウスでは肝星細胞活性化の指標であるα-SMA陽性細胞が増加し、smad2を介するTGFβのシグナルが活性化することが判明した。以上より、DGKファミリーは種々の病態と密接に関連する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交通外傷や心血管障害等による脳障害ならびに中毒性肝障害は、救急診療において日常遭遇する重要症例である。本研究では、これらの病態における組織・細胞レベルの応答メカニズム解明に向けた基礎科学的アプローチを行うものである。物理的な損傷や低酸素障害には、p53が関与する。また中毒性肝障害は、線維化を介した肝硬変の原因となるが、TGFβ経路が重要な役割を果たす。本研究は、申請者らのグループが長年取り組んできた細胞内情報伝達制御因子ジアシルグリセロールキナーゼが、これらの病態制御に関与することを明らかにしたものであり、障害の軽減と回復の促進を目指した臨床応用の一助となる。

研究成果の概要(英文)：We examined how tumor suppressor p53 and TGFβ signaling pathways are regulated by signal transduction-regulating enzyme diacylglycerol kinase (DGK). In the experiment of whole body ionizing radiation, DGKzeta-KO mice showed robust induction of p53 protein in the spleen and vulnerability at the animal level compared with the wild-type (WT), suggesting a regulatory role of DGKzeta on the p53 pathway. On the other hand, in the experiment of carbon tetrachloride-induced liver injury, DGKalpha-KO mice exhibited an increase in alpha-smooth muscle actin-positive hepatic stellate cells and smad2 phosphorylation level, suggesting enhanced TGFβ signaling. Collectively, results implicate that DGK family is intimately involved in various pathophysiology of organs.

研究分野：救急医学

キーワード：肝障害 肝星細胞 線維化 四塩化炭素 PKC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

交通事故等による外傷性脳損傷、および心血管系の閉塞や破綻に起因する脳虚血・脳梗塞・脳出血は、救急医学において生命維持に関わる代表的な病態である。これらの病態に共通する現象は、「血液還流障害による脳の低酸素ストレス負荷」と総括できるように思われる。脳は、情報伝達の基本単位となるニューロンおよびその栄養、環境をサポートするグリア細胞から構成される。この脳のエネルギー要求性は非常に高く、体重比約 2%でありながらエネルギー消費量は全体の 10%に達する。この状況を反映して脳は、短時間の血流途絶によるエネルギー供給の停止により容易に不可逆性変化をたどることが特徴である。

一方、薬物の多くは肝臓で代謝・解毒され、胆道あるいは腎臓から排泄される。救急の現場で見られる中毒性肝障害の多くは、肝臓の代謝能力を上回る量の薬物に起因するものであり、大部分が容量依存性の障害をもたらす。原因物質としては、四塩化炭素や黄リン、亜ヒ酸などが挙げられるが、近年、日本に多く出回っているサプリメントやハーブ、やせ薬などの自然食品が原因となる場合が増えている。薬物摂取による肝障害に関しては、厚生労働省からマニュアルが出されており、原因物質から症状、検査所見、病理組織像、対処法等が詳述されている。しかしながら、中毒性肝障害の組織・細胞応答メカニズムについては、臨床現場での解析は困難であり、動物実験による解析が必要と考えられる。

2. 研究の目的

外傷や心血管障害等による脳障害ならびに中毒性肝障害は、救急診療において日常遭遇する重要症例である。本研究では、これらの病態における組織・細胞レベルの応答メカニズム解明に向けた基礎科学的アプローチを行うものである。

物理的な損傷や低酸素障害には、p53 が関与する。また中毒性肝障害は、線維化を介した肝硬変の原因となるが、TGF β 経路が重要な役割を果たす。本研究は、申請者らのグループが長年取り組んできた細胞内情報伝達制御因子ジアシルグリセロールキナーゼによるこれらの病態の制御メカニズムを追求するものであり、障害の軽減と回復の促進を目指した臨床応用の一助となる。

3. 研究の方法

癌抑制蛋白 p53 と TGF β のシグナル経路が、情報伝達制御蛋白ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) ファミリーによってどのように制御されるかを解析するために、1) 全身性 X 線照射による p53 誘導実験、2) 四塩化炭素投与による中毒性肝障害モデル実験を施行した。野生型マウスと DGK ノックアウト (KO) マウスを用いて、組織染色、ウエスタンブロット等のデータを比較検討し、各 DGK アイソザイムによる p53 や TGF β の制御機構を解析した。

4. 研究成果

1) 全身性 X 線照射による p53 誘導実験：

癌抑制蛋白 p53 は、様々なストレス環境に対する細胞応答を制御するが、細胞内シグナル伝達経路により厳密にコントロールされている。これまでの細胞レベルの研究により、ゼータ型 DGK (DGK ζ) は p53 のタンパク発現および転写活性の制御に関与するデータが得られている。すなわち、野生型 DGK ζ の過剰発現により p53 タンパク発現は抑制されるが、DGK ζ をノックダウンした細胞では、p53 タンパク発現が増加し、ストレス刺激に脆弱性を示す。

今回の研究では、このような細胞レベルの知見を、個体レベルで解析した。野生型マウスおよび DGK ζ -KO マウスに 5Gy の X 線を全身照射し、様々な臓器の解析を行った。その結果、照射 6 時間後、野生型に比べ DGK ζ -KO マウスの脾臓のウエスタンブロット解析により、p53 タンパク発現が顕著に増加することが判明した。この時、cleaved PARP 発現も増加しており、アポトーシスも亢進することが明らかになった。細胞レベルの観察でも、DGK ζ -KO マウスの脾臓において、p53 および cleaved PARP 陽性を示す細胞の増加が認められた。

続いて、カプラン・マイヤー法を用いて、個体レベルの致死率を解析すると、5Gy の照射により、野生型マウスは 9-10 日後に死亡するのに対して、DGK ζ -KO マウスは 8 日後にほぼ全例が死亡することが明らかとなった。以上の結果より、DGK ζ -KO マウスでは、DNA 損傷ストレス後の p53 タンパクの発現が亢進し、個体レベルでのストレス脆弱性をもたらすことが示唆された。

2) 四塩化炭素投与による中毒性肝障害モデル実験：

これまでの研究により、肝臓では DGK アイソザイムのうちアルファ型 DGK (DGK α)、イブシロン型 DGK (DGK ϵ)、ゼータ型 DGK (DGK ζ) のタンパク発現が報告されているが、これら分子の肝障害への関与は未知のままである。これら DGK-KO マウスを用いて、四塩化炭素 (CCl₄) による肝障害モデルを作製し、DGK の機能的役割を精査した。

CCl₄ 単回投与 48 時間の急性肝障害モデルの組織学的解析の結果、DGK α -KO マウスと野生型マウスとの間の組織損傷の程度に明確な差は認められなかったが、ウェスタンブロット解析の結果、DGK α -KO マウスにおいて活性化型肝星細胞マーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA) のタンパク発現が著しく亢進することが明らかとなった。一方、DGK ϵ -KO および DGK ζ -KO マウスでは、このような変化は認められなかった。6 週間の連続 CCl₄ 投与による慢性線維化モデルにおいて、DGK α -KO マウスでは多くの肝細胞が腫大しており、野生型マウスよりも組織損傷が重度であったが、線維化の程度に明らかな差は認められなかった。 α -SMA による免疫組織化学やウェスタンブロット解析の結果、DGK α -KO マウスでは α -SMA 陽性細胞が増加し、タンパク発現が著しく亢進していることが明らかとなった。さらに、DGK α -KO マウスでは PKC δ のリン酸化レベルが亢進しており、PKC δ による肝星細胞の活性化が亢進している可能性が示唆された。以上の結果より、DGK α 欠損状態では肝星細胞活性化が生じやすいことが示唆された。

次に、動物実験において見出された肝星細胞活性化機構を精査するため、マウス胎児線維芽細胞株である NIH3T3 細胞を用いて、TGF β 刺激における DGK の関与を検討した。その結果、DGK 阻害剤 (R59949) 存在下では、TGF β 刺激にตอบสนองした α -SMA の発現がコントロールに比べて亢進することが明らかとなった。したがって、TGF β による NIH3T3 細胞の活性化は、DGK α 酵素活性が減弱することにより促進されることが示唆された。また、DGK 阻害剤投与群では、TGF- β シグナルの主要経路である Smad2 のリン酸化が亢進しており、TGF β が Smad 経路の亢進を介して α -SMA の発現を惹起すると考えられた。さらに、DGK 阻害剤投与群では、Smad2 のリン酸化に先立ち PKC δ のリン酸化の増加も認められた。

さらに、DGK α -KO マウスで見られた PKC δ の活性化が、TGF β の分泌亢進によるものか、あるいは TGF β 受容体のシグナル伝達の増強によるものかを精査するために、モデルマウスの血中 TGF β 量を ELIZA 法で測定した。その結果、四塩化炭素投与後における野生型と DGK α -KO マウスの血中 TGF β に有意な差は認められないことが判明した。以上より、本実験で認められた PKC δ の活性化は DGK α -KO によるシグナル伝達の増強作用によるものであることが示唆された。

これらの結果より、肝星細胞の活性化機構において、DGK α の酵素活性低下は、TGF β の主要分子である Smad 経路と PKC δ を介する非 Smad 経路の両者を亢進させると考えられた。慢性肝疾患は遷延すると肝線維化へと至るが、その根本的な治療法は未だ確立されておらず、不可逆的に肝硬変、さらには肝癌へと進行する 경우가少なくない。本研究の結果は、DGK α が肝星細胞の活性化を抑制的に制御する可能性を示唆するものであり、DG-PKC 経路を標的とした治療的介入により、中毒性肝障害が軽減される可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka T, Iseki K, Tanaka K, Nakano T, Iino M, Goto K	4. 巻 67
2. 論文標題 DGK ablation engenders upregulation of p53 level in the spleen upon whole-body	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Adv Biol Regul.	6. 最初と最後の頁 93-100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2017.09.010	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 Yamaki A, Akiyama R, Murakami C, Takao S, Murakami Y, Mizuno S, Takahashi D, Kado S, Taketomi A, Shirai Y, Goto K, Sakane F	4. 巻 120
2. 論文標題 Diacylglycerol kinase α -selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 10043-10056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.28288.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomoyuki Nakano, Keiko Seino, Ken Iseki, Kaoru Goto
2. 発表標題 Diacylglycerol kinase α negatively regulates the activation of myofibroblasts in mouse liver.
3. 学会等名 American Society of Cell Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 知之、後藤 薫
2. 発表標題 型ジアシルグリセロールキナーゼ欠損は皮下脂肪における褐色化を促進する
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年～2020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
研究 分担 者	後藤 薫 (GOTO KAORU) (30234975)	山形大学・医学部・教授 (11501)	