

令和元年5月15日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15955

研究課題名(和文) NASHにおける鉄酸化ストレスの誘導機序の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of induction mechanism of iron oxidative stress in NASH and application to treatment

研究代表者

田中 信悟 (TANAKA, Shingo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60561024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：In vitro実験として小腸上皮細胞の形態・機能を有するmonolayersを形成するため、Caco-2/TC7細胞を多孔質フィルター上で培養し、DMT1 mRNA発現量やIRP活性などを測定することができた。In vivo実験として、脂肪肝炎モデルマウスを作製した。Surwit dietで飼育し、鉄過剰群では鉄分450mg/kg dietを添加した。体重測定は適宜行い、通常飼料群との比較では明らかな体重増加を認めた。肝組織を採取し固定標本作製の後、肝障害、線維化、鉄沈着、8-OHdG抗体を用いた酸化ストレスの程度および発癌について解析することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHおよびこれを背景とする肝細胞癌患者が増加している。しかし成人の2-4割が罹患している脂肪肝患者からNASH患者を簡潔に鑑別する方法がなく、標準的治療法も確立していない。申請者らはこれまでに肝鉄過剰沈着がIron regulatory protein 1 (IRP1)活性の亢進を介した消化管の鉄トランスポーター発現増加により惹起されることを明らかにした。本研究で得られた結果は、肝鉄過剰沈着を伴うNASHにおける鉄代謝異常機序の解明および新たなバイオマーカー探索について一助となるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Caco-2/TC7 cells were cultured on a porous filter in order to form monolayers having the morphology and function of small intestinal epithelial cells as in vitro experiments. It was possible to measure DMT1 mRNA expression level and IRP activity. In vivo experiment, a steatohepatitis model mouse was prepared. It was reared in Surwit diet, iron content was added 450 mg/kg diet in iron excess group. After liver tissue was collected and fixed specimens were prepared, liver injury, fibrosis, iron deposition, degree of oxidative stress using 8-OHdG antibody, and carcinogenesis could be analyzed.

研究分野：消化器病学，肝臓病学，NASH，酸化ストレス

キーワード：NASH 鉄過剰 酸化ストレス IRP 1

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は C 型慢性肝炎と同様に肝硬変へと進行し、さらには肝細胞癌 (HCC) の発生母地となることが明らかとなっている。NASH の成因としては従来、肝細胞への脂肪沈着が生じる段階と炎症、線維化が進展する段階とに分けられた two-hit theory で説明されてきたが、近年は多因子が同時並行で病態形成に関与する multiple-parallel hit hypothesis が提唱されている (Hepatology, 2010)。NASH における肝細胞障害の機序としては、酸化ストレス増加、脂肪毒性やエンドトキシンの関与などが推測されているが、その機序の詳細は未だ不明である。そのため NASH の治療法は確立しておらず、また肝発癌の危険因子も明らかではない。近い将来に C 型慢性肝炎の撲滅が期待される一方で、NASH 患者ならびに NASH を背景とした HCC 患者が増加しており、肝線維化の進行阻止や発癌予防法の樹立が急務である。

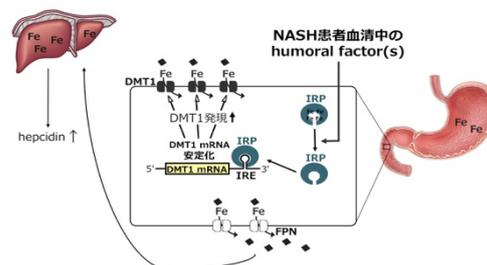
肝細胞障害の機序の 1 つとされる酸化ストレスの要因として NASH 患者の肝における鉄蓄積が挙げられている (Gastroenterology, 1998)。申請者らはこれまでに C 型慢性肝炎患者では肝でのヘプシジンの発現低下と十二指腸鉄吸収関連分子の発現増加による鉄吸収の亢進によって肝内鉄過剰沈着が生じ、細胞内の過剰遊離鉄が活性酸素種 (ROS) の産生を亢進させ、肝細胞傷害を惹起することや、肝内に 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) が増加することにより G:C→A:T 型の遺伝子変異を誘発し HCC の原因となることを見出し、除鉄療法により肝炎と肝線維化を改善させ、8-OHdG 量を正常化できること (Cancer Res, 2001)、さらに長期間の除鉄療法により HCC の発生率が有意に低下することを明らかにした (J Gastroenterology, 2007)。

そして申請者らは NASH についても半数の患者の肝組織に鉄が過剰沈着しており、NASH を背景とする HCC 患者の非癌部肝組織での 8-OHdG 量が非 HCC 患者の肝組織での発現量と比べ有意に増加していること、さらに単純性脂肪肝の肝 8-OHdG 量に比べ NASH 肝のそれが有意に増加していることを明らかにした (J Gastroenterol, 2013)。さらには NASH 肝における鉄沈着が Iron regulatory protein 1 (IRP1) の活性増強に由来した十二指腸鉄トランスポーター Divalent metal ion transporter 1 (DMT1) の発現亢進による鉄吸収亢進が原因であること、また preliminary ながら除鉄療法が NASH 進行阻止に有効である患者群が存在することも明らかにした (Hepatology, 2015)。

この結果から、患者血清中に IRP1 活性を増強させる何らかの humoral factor(s) が存在することが予測されるものの、その同定はなされていない。また、鉄代謝を標準とした有効な治療法は現在まで標準化されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では肝鉄過剰沈着を伴う NASH における IRP1 活性化誘発因子の解明を含めた鉄代謝異常の詳細な機序を明らかとし、それらを焦点とした新たなバイオマーカーと治療方法の開発を目的とする。



## 3. 研究の方法

### (1) 血清の採取

NASH の定義は以下の条件 [①ALT 正常上限の 1.5 倍以上が 3 ヶ月以上持続 ②画像検査で脂肪肝を認める ③肝組織像が Matteoni 分類 type3 または 4 ④エタノール摂取量が 1 日 30g 未満 ⑤他の肝疾患を認めない] を全て満たす症例とする。本研究の内容に対して十分なインフォームド consent 行い、同意が得られた単純性脂肪肝・NASH・肝硬変・NASH 肝細胞癌患者および対照として肝疾患と鉄代謝異常を有さず、ヘリコバクター・ピロリ感染のない慢性胃炎患者より生化学試験採血管 5 ml x 5 本の血液を採取する。血清の一部 (採血管 2 本) は RNA later (Ambion) に入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保存する。

### (2) 経口鉄吸収試験 (oral iron absorption test; OIAT)

12 時間絶食後、午前 9 時の採血から血清鉄を測定する。その後 100mg のクエン酸第一鉄ナトリウム内服の 15, 30, 60, 120 分後にそれぞれ採血をして、血清鉄ならびに % トランフェリン飽和度 (Tf sat.) を測定する。コントロール群の OIAT 値よりカットオフを決定し、NASH 患者を鉄吸収亢進群と鉄吸収非亢進群に群別する。

### (3) 液体クロマトグラフ質量分析計を用いたメタボローム解析

1) サンプル前処理 1.5ml エッペンドルフチューブに血清  $10\mu\text{l}$  と  $50\mu\text{g/ml}$  の 2-isopropylmalic acid (内部標準) を  $10\mu\text{l}$  添加する。続いて、メタノール 0.5ml を添加して混合する。次に、蒸留水 0.25ml を添加して混合する。さらに、クロロホルム 0.5 ml を添加して混合する。続いて 1200 rpm で混合しながら  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間インキュベートする。溶液を 15000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  で 5 分間遠心分離し、その上清  $200\mu\text{l}$  を新しい 1.5ml エッペンドルフチューブに回収し、スピードバック遠心濃縮装置により濃縮する。その後、凍結乾燥機により溶液を乾固させ

る。乾固物を 5%アセトニトリル溶液 75  $\mu$ l に再溶解させ 0.22  $\mu$ m フィルタースピカラムよりフィルター処理し、回収された溶液 15  $\mu$ l を LCMS-IT-TOF による測定に使用する。

2) データ処理 データ処理ソフト IonXtractView を用いて LCMS-IT-TOF の測定により得られたマスキロマトグラムのデータピッキングを行い、ピーク強度と m/z の情報を数値化する。内部標準である 2-isopropylmalic acid (m/z ; 175.01) のピーク強度を基に各サンプル間のデータを標準化する。

3) 主成分分析 多変量解析ソフト Pirouette を用いて、標準化したデータの主成分分析を実施し、Score の結果により NASH の有無や鉄代謝異常などを分類・判別できるか否かを検討する。分類・判別が可能となれば、各主成分に対する Loading のデータを基に MSn 解析、データベース解析、ライブラリー解析を用いて、実際に変動が見られた水溶性代謝産物を同定する。

#### (4) RNA マイクロアレイ解析

血清より extracellular circulationg RNA を抽出し、low Input Quick Amp Labering Kit (Agilent technologies) を用いて cDNA の合成、cRNA のラベルと増幅を行い、RNeasy mini spin columns (QIAGEN) でラベル化 cRNA を精製する。SurePrint G3 Human GE マイクロアレイキットにより遺伝子発現量を測定し、解析ソフト (GeneSpring) を用いたデータマイニングにより各群での遺伝子発現変化を比較解析する。

#### (5) エクソソーム解析

血清に ExoQuick-TC (Exosome Precipitation Solution, System Bioscience) を添加し、overnight 後、2,000 x g 20 分間、10,000 x g 20 分間の遠心後に得られた上清を、超遠心機で 100,000 x g 2 時間遠心し、得られたペレットをエクソソーム分画として採取する。精製したエクソソームにおける蛋白質を、MALDI/MS/MS を用いて iTRAQ 法で網羅的に比較解析する。

#### (6) 抗体アレイ解析

上記メタボローム解析およびエクソソーム解析にて絞り込まれた humoral factor 候補について、抗体アレイ (Proteome Profiler™, R&D Systems) を用いて定量を行う。アレイメンブレン上の補足抗体に血清 200  $\mu$ l を添加し、オーバーナイトでインキュベートする。翌日、検出抗体カクテルを加えて 60 分間インキュベートし、さらに SA-HRP と化学発行試薬を添加し 30 分間インキュベートの後に、化学発光イメージャーにてスポットを検出する。スポットの画像解析については画像解析ソフト Image J を用いて Pixel Density として算出し各群で比較する。

(7) NASH 患者血清を用いて培養した Caco-2/TC7 cell monolayers における DMT1 発現と IRP 活性の測定

前年度の検討により候補とされた humoral factor (s) が実際に IRP1 活性化の原因となるか否かを検討する。小腸上皮細胞の形態・機能を有する monolayers を形成するため、Caco-2/TC7 細胞は 10%FBS を含む DMEM を用いて多孔質フィルター上で 21 日間培養する。humoral factor (s) を添加し 2 日間培養して、Total RNA を抽出し Taqman PCR で DMT1 mRNA 発現量を測定する。また cytosolic protein を抽出し、十二指腸 DMT1 の IRE 配列の 3' 末端を [<sup>32</sup>P]-UTP 標識したプローブを用いて Electro mobility shift assay (EMSA) によって IRP 活性を測定する。

#### (8) Humoral factor (s) 阻害薬の作製と検証

構造生物学に基づいた医薬分子設計 (J Biol Chem, 2002) により IRP1 活性化を惹起する humoral factor (s) の阻害薬を設計する。X 線結晶構造解析及び NMR 解析により得られた三次元構造を初期構造とし、分子動力学計算により動的な構造や予測結合部位の鍵穴情報を分析する。次いで三次元データベース探索や high-throughput screening 等で活性化化合物を見つけ、特異的阻害薬を合成する。(7) の Caco-2/TC7 cell monolyaers の下層へ 10%NASH 患者血清あるいは NASH 血清+阻害薬を添加し、DMT1 mRNA 発現量と IRP 活性を測定する。最も阻害活性の高いものを純化し精製する。

#### (9) Humoral factor (s) 阻害薬の *in vivo* での検証

C57BL/6J 野生型マウスを用いる。脂肪肝炎モデル作製のため全群を高カロリー食である Surwit diet (リサーチダイエット社) で飼育し、鉄過剰群では鉄分 450mg/kg diet を添加する。6 週齢より組織採取までの期間中投与を継続する。投与開始より 3, 6, 9, 12 ヶ月後のマウス各 40 匹 (鉄正常群 10 匹, 鉄過剰群 10 匹, 鉄正常+humoral factor (s) 投与群 10 匹, 鉄過剰+humoral factor (s) 投与群 10 匹) より肝組織を採取し、経時的な肝障害や線維化および鉄沈着と発癌程度を解析する。

#### 4. 研究成果

現在までに単純性脂肪肝 22 例, NASH (肝硬変・肝細胞癌含む) 27 例, コントロール 20 例の検体を採取済みである. 今後さらに症例を蓄積し, メタボローム解析, マイクロアレイ解析, 抗体アレイ解析等を行う予定である.

*In vitro* 実験として小腸上皮細胞の形態・機能を有する monolayers を形成するため, Caco-2/TC7 細胞を多孔質フィルター上で培養し, DMT1 mRNA 発現量や IRP 活性などを測定した.

*In vivo* 実験として, C57BL/6J 野生型マウスを用いて脂肪肝炎モデルを作製した. 高カロリー食である Surwit diet (リサーチダイエツト社) で飼育し, 鉄過剰群では鉄分 450mg/kg diet を添加した. 6 週齢より組織採取までの間, 前述の飼料を継続投与した. 体重測定は適宜行い, 通常飼料群との比較では明らかな体重増加を認めた. 投与開始より 3, 6, 9, 12 ヶ月後のマウスを安楽死させ, 採血検査にて各種生化学データ (AST, ALT, Fe 等) を得ることができた. 肝組織を採取し固定標本を作製の後, 肝障害, 線維化, 鉄沈着, 8-OHdG 抗体を用いた酸化ストレスの程度および発癌について解析した.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Miyanishi K, Tanaka S, Sakamoto H, Kato J. The role of iron in hepatic inflammation and hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med.* 2019;133: 200-205. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.006. (査読有り)
- ② Sakurada A, Miyanishi K, Tanaka S, Sato M, Sakamoto H, Kawano Y, Takada K, Nakabeppu Y, Kobune M, Kato J. An intronic single nucleotide polymorphism in the MUTYH gene is associated with increased risk for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med.* 2018;129:88-96. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.010. (査読有り)
- ③ Sato M, Miyanishi K, Tanaka S, Sakurada A, Sakamoto H, Kawano Y, Takada K, Kobune M, Kato J. Increased duodenal iron absorption through upregulation of Ferroportin 1 due to the decrement in serum hepcidin in patients with chronic hepatitis C. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2018;2154361. doi:10.1155/2018/2154361. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 坂本 拓基, 宮西 浩嗣, 加藤 淳二. NASHモデルマウスを用いた, DNA傷害修復酵素MUTYHの肝発癌への関与の検討. 第22回日本肝臓学会大会 (JDDW 2018), 2018年
- ② 田中 信悟, 宮西 浩嗣, 坂本 拓基, 佐藤 昌則, 櫻田 晃, 河野 豊, 高田 弘一, 加藤 淳二. 鉄過剰を伴うNASHからの肝発癌における酸化的DNA傷害修復酵素MUTYHの意義. 第21回日本肝臓学会大会 (JDDW 2017), 2017年
- ③ 田中 信悟, 宮西 浩嗣, 坂本 拓基, 佐藤 昌則, 櫻田 晃, 石川 和真, 河野 豊, 村瀬 和幸, 高田 弘一, 加藤 淳二. NAFLDの組織学的診断時における酸化的DNA傷害度と発癌との関係についての検討. 第120回日本消化器病学会北海道支部例会 シンポジウム, 2017年
- ④ 田中 信悟, 宮西 浩嗣, 坂本 拓基, 佐藤 昌則, 櫻田 晃, 池田 裕貴, 石川 和真, 河野 豊, 村瀬 和幸, 高田 弘一, 加藤 淳二. 非アルコール性脂肪性肝疾患の組織学的診断時における肝発癌予測因子についての検討. 第103回日本消化器病学会総会, 2017年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 加藤 淳二

ローマ字氏名: KATO, junji

研究協力者氏名: 宮西 浩嗣

ローマ字氏名: MIYANISHI, koji

研究協力者氏名: 坂本 拓基

ローマ字氏名: SAKAMOTO, hiroki

※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。