

平成21年 6 月 9 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590747  
 研究課題名（和文） 肝線維化過程における肝星細胞の NAD(P)H Oxidase の役割の解明  
 研究課題名（英文） A clarification of the role of NAD(P)H oxidase of hepatic stellate cell in hepatic fibrosis  
 研究代表者  
 富樫 整（TOGASHI HITOSHI）  
 山形大学・保健管理センター・教授  
 研究者番号：60192209

## 研究成果の概要：

NAD(P)H oxidase 由来の ROS の制御が慢性肝疾患の新たな治療法になりうるか研究した。培養肝星細胞において、PDGF-BB は、NAD(P)H oxidase 由来の ROS を介し細胞増殖をもたらした。ROS は肝星細胞の p38 MAPK のリン酸化を促進し、細胞増殖を引き起こした。in vivo の実験でも、DMN によるマウス肝障害や線維化の進展が、ROS 除去剤により抑制された。NAD(P)H oxidase の制御は、肝線維化の抑制につながり、大変重要であると考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7202

キーワード：肝線維化、NAD(P)H oxidase、肝星細胞、ROS、シグナル伝達、PDGF-BB、TGF-β1

## 1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患における肝線維化の進展は、門脈圧亢進症の原因となり、肝細胞癌発生にも密接に関係する。インターフェロン無効例の C 型肝炎患者や非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）患者に対する肝線維化抑制の確立は、慢性肝疾患患者の生命予後の向上に寄与し、急務である。

肝線維化過程において、肝星細胞（hepatic stellate cell）が、中心的な役割を演じている。肝障害時、肝星細胞は quiescent cell から筋線維芽細胞に形質転換

し、細胞の増殖、運動能亢進、細胞外基質の産生亢進が起こり、肝線維化を惹起する。慢性肝疾患において、reactive oxygen species (ROS) の産生過剰や抗酸化機構の低下が起こり、レドックス制御機構が破綻する。レドックス制御機構の破綻は、酸化ストレスや過酸化物質過剰産生をもたらし、肝星細胞の活性化や増殖、肝星細胞からの細胞外マトリックス産生を促し、肝線維化を促進する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) PDGF や TGF-β1 の共通した細胞内シグナル伝達物質である ROS

を産生する NAD(P)H oxidase 活性化機序を明らかにし、(2) NAD(P)H oxidase により産生された ROS が、どのような細胞内シグナル伝達経路を介し、肝星細胞の活性化・増殖を来たすか明らかにし、(3) ROS により活性化されるレドックス感受性のある転写因子 (NF- $\kappa$ B, AP-1, Krox20, KLF6/Zf9, Nrf2) についても、肝線維化との関わりにおいて明らかにすることである。更に、(4) *in vitro* にて確認された「肝星細胞の NAD(P)H oxidase 活性化は肝星細胞の増殖を促進する」という現象が、*in vivo* においても普遍性がある事を明らかにすることである。肝星細胞の活性化・増殖、細胞外マトリックス産生の分子制御機構を解明する事は、インターフェロン無効例の C 型肝炎患者や NASH 患者を始めとする慢性肝疾患治療の開発に直結すると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* の実験：

ヒト肝星細胞由来株 (LI-90) とマウス初代培養肝星細胞を用い、PDGF-BB や TGF- $\beta$ 1 が細胞増殖をもたらすか調べた。

PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1 が NAD(P)H oxidase を活性化し、ROS を産生させるのか、CCD カメラを用いた化学発光法にて調べた。

NAD(P)H oxidase 由来の ROS が肝星細胞の増殖に関与しているか、ROS 消去剤、NAD(P)H oxidase 阻害剤を用い調べた。

ROS がどのような細胞内シグナル伝達を経て肝星細胞増殖を引き起こすか調べた。

(2) マウスを用いた *in vivo* の実験：

Dimethylnitrosamine (DMN) を少量、長期に渡りマウスに投与し、慢性肝障害モデルを作成した。NAD(P)H oxidase 阻害剤の diphenylene iodonium (DPI)、ROS 消去剤の Mn-TBAP、脳梗塞の治療薬であるラジカル消去剤のエダラボンと同時に投与し、これら薬剤が慢性肝障害進展抑制に働くか調べた。

### 4. 研究成果

(1) PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1 は培養肝星細胞を増殖させた

私どもは、PDGF-BB が LI-90、初代培養肝星細胞の増殖をもたらすか 24 時間目に WST-1 アッセイにより調べた。PDGF-BB は、量依存性に肝星細胞の増殖を引き起こした。24 時間目において、PDGF-BB は、10 ng/ml、20 ng/ml の濃度でコントロールに比べ有意 ( $p < 0.001$ ) に細胞数を増加させた。また、TGF- $\beta$ 1 も、10ng/ml の濃度で培養すると、24 時間目において有意な細胞数の増加をもたらした。

(2) ROS 消去剤は、PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1 による

肝星細胞の増殖を抑制し、ROS は増殖を促進した

PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1 による肝星細胞の増殖に ROS が関与するか調べた。細胞内透過性の良好な ROS 消去剤 Mn-TBAP を用いた。Mn-TBAP は、量依存性に PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1 による肝星細胞の増殖を抑制した。特に 100 nM の Mn-TBAP 前処理により肝星細胞増殖は有意 ( $p < 0.001$ ) に抑制された。

ROS の一種である  $H_2O_2$  は、肝星細胞に酸化ストレスを惹起する。私どもは、酸化ストレスが肝星細胞増殖に与える影響を調べた。100nM の  $H_2O_2$  は、コントロール群にくらべ有意 ( $p < 0.001$ ) に肝星細胞の増殖を引き起こした。

(3) 肝星細胞に non-phagocytic NAD(P)H oxidase のサブユニットが発現されていた

NAD(P)H oxidase は、細胞膜に結合する p22phox と gp91phox、細胞質に存在する p67phox と p47phox の 4 つのサブユニットにより構成される。私どもは、LI-90、初代培養肝星細胞に 4 つのサブユニットが存在するか調べた。RT-PCR では、4 つのサブユニットが mRNA レベルで発現されていた。また、ウェスタンブロッティング解析と細胞組織免疫所見から 4 つのサブユニットが蛋白レベルで発現されていることが明らかになった。

(4) PDGF-BB 刺激による ROS は、NAD(P)H oxidase 由来であった

ROS の出現を検出するため、PDGF-BB と Lucigenin を添加し、化学発光の変化を経時的に調べた。PDGF-BB 添加後速やかに化学発光の出現を認め、数分後ピークになり、次第に減弱した。ROS 消去剤の Mn-TBAP は、PDGF-BB 添加後の化学発光を抑制した。Lucigenin と PDGF-BB を添加し、LI-90 内に ROS が産生されるか、化学発光の出現により調べた。NAD(P)H oxidase 阻害剤の DPI は、PDGF-BB による化学発光の検出を抑制した。一方、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤の KCN は、化学発光を減少させなかった。allopurinol や Indomethacin も、PDGF-BB による化学発光に影響を与えなかった。LI-90 の代わりに初代培養肝星細胞を用いても同じ結果であった。また、肝星細胞を刺激するサイトカインとして TGF- $\beta$ 1 を用いた場合も同様の結果であった。

(5) NAD(P)H oxidase は PDGF-BB による肝星細胞の増殖に不可欠であった

NAD(P)H oxidase が、PDGF-BB、TGF- $\beta$ 1

による肝星細胞増殖に関与しているか調べた。NAD(P)H oxidase 阻害剤 (DPI) 25  $\mu$ M は、PDGF-BB による肝星細胞の増殖を有意 ( $p < 0.001$ ) に抑制した。同様に別の NAD(P)H oxidase 阻害剤である apocynin (100  $\mu$ M) も PDGF-BB による肝星細胞増殖を抑制した。NAD(P)H oxidase 以外の ROS 産生源として、xanthine oxidase や cyclooxygenase の可能性を検討した。Xanthine oxidase の阻害剤 allopurinol や cyclooxygenase 阻害剤の indomethacin は PDGF-BB 増殖を抑制しなかった。TGF- $\beta$ 1 を用いた実験でも同様の結果が得られた。

(6) NAD(P)H oxidase 由来の ROS は、p38MAPK をリン酸化する

NAD(P)H oxidase 活性化による ROS 産生と ERK や p38MAPK を始めとする MAP kinase family はどの様に関わっているか調べた。PDGF-BB は、ERK と p38MAPK のチロシンリン酸化をもたらした。NAD(P)H oxidase 阻害剤の DPI は、ERK によるチロシンリン酸化に影響を与えず、p38MAPK のチロシンリン酸化を抑制した。また、ROS 消去剤の Mn-TBAP (100 nM) も p38MAPK のチロシンリン酸化を抑制した。DPI は、PDGF-BB による p38MAPK リン酸化を抑制したが、過酸化水素による酸化ストレスは、PDGF-BB による p38MAPK リン酸化を元に戻した。

(7) ROS 消去剤、NAD(P)H oxidase 阻害剤は、DMN による慢性肝障害進展を抑制する

DMN を腹腔内に 6 週間投与すると、肝細胞障害と肝線維化が起こった (DMN 群)。また、肝星細胞の活性化状態の目安である  $\alpha$ -SMA は、DMN 投与により肝組織内での発現が亢進した。これは、DMN により肝細胞障害が起こり、同時に肝星細胞が活性化され細胞外マトリックスが産生され、肝線維化が惹起されたと考えられる。

これに対し、ROS 消去剤の Mn-TBAP は、DMN による慢性肝障害の進展を抑制し、 $\alpha$ -SMA の発現亢進を有意に抑制した。また、NAD(P)H oxidase 阻害剤 DPI は、DMN による慢性肝障害の進展を抑制し、 $\alpha$ -SMA の発現亢進を有意に抑制した。さらに、脳梗塞治療薬でラジカル消去作用を持つラジカットも、DMN による慢性肝障害の進展、 $\alpha$ -SMA の発現亢進を抑制した。

研究のまとめと社会的意義

本研究においては、肝星細胞に NAD(P)H oxidase が発現されていることを世界に先駆

けて明らかにした。また、細胞内 ROS を画像化し検出する新技術を開発することが出来た。申請者らの研究結果から、PDGF-BB のみならず TGF- $\beta$ 1 においても、NAD(P)H oxidase を介し、肝星細胞の増加をもたらすことを明らかにした。この研究成果から、アンジオテンシン II などの種々の肝線維化促進因子においても、同様の機序で肝線維化を惹起している可能性も予測され、NAD(P)H oxidase は肝線維化過程における key factor であることが示唆された。

現在、インターフェロンが C 型肝炎に対する標準的治療法になっている。しかしながら、インターフェロン無効例の C 型肝炎患者や NASH 患者に対する標準的治療法は確立されていない。NAD(P)H oxidase 活性化や産生される ROS の制御は、肝線維化抑制につながり、将来的にインターフェロン無効例や NASH 患者に対する新たな治療法にあり得ると考えられ、社会的にも大変意義のある研究と考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① 柄澤哲、冨樫整、他. (16 人中 2 番目、corresponding author) インターフェロン療法が著効した特発性血小板減少性紫斑病を合併した C 型肝炎の 1 例  
日本消化器病学会雑誌、106、405-10、2009 査読有
- ② Togashi H, et al. (2 人中 1 番目) Reply to comments on “What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection below the present limit?”  
J Hepatol. 50、213、2009 査読有
- ③ Togashi H, et al. (15 人中 1 番目) What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit?  
J Hepatol. 49、17-24、2008
- ④ Okumoto K, Togashi H, et al. (12 人中 11 番目) Serum levels of stem cell factor and thrombopoietin are markedly decreased in fulminant hepatic failure patients with a poor prognosis.  
J Gastroenterol Hepatol. 22、1265-70、2007 査読有
- ⑤ Nishise Y, Togashi H, et al. (9 人中 6

番目) Risk of hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus, in patients infected with HCV subtype 1b.

J Infect Dis. 196、1006-9、 2007 査読有

- ⑥ 菅原一彦、富樫整、他。(14人中13番目) インターフェロン・リバビリン併用療法中に化膿性脊椎炎を合併したC型慢性肝炎の2例  
日本消化器病学会雑誌、104 巻、1519-25、2007 査読有

⑦ Suzuki A, Togashi H, et al. (8人中2番目、corresponding author) Characteristics of three cases of hepatocellular carcinoma showing enhanced technetium-99m-diethylenetriaminepentaacetic acid-galactosyl human serum albumin accumulation by single photon emission computed tomography analysis. Hepatol Res. 37、628-36、2007 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 富樫整. 電子スピン共鳴装置を用いた reactive oxygen speciesの検出と画像化—マウス肝障害モデルを用いた病態解明への応用、第37回日本肝臓学会東部会、2008年12月4日(東京)
- ② Togashi H. What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit? 4<sup>th</sup> International Infection Control Conference of Theodor Bilharz Research Institute. November 12, 2008 (Cairo)
- ③ 菅原一彦、富樫整、他. 非B非C型肝細胞癌の臨床像と発癌因子  
第43回日本肝臓学会総会、2007年6月1日(東京)
- ④ 鈴木明彦、富樫整、他. 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)におけるToll様受容体(TLRs)の役割  
第43回日本肝臓学会総会、2007年5月31日(東京)

[図書] (計 1 件)

富樫整、他. 永井出版、総合臨床第57巻増刊 新版 処方計画法、代謝性(遺伝性)肝疾患、1038-9、2008年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記すべき事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫整 (TOGASHI HITOSHI)

山形大学・保健管理センター・教授

研究者番号: 60192209

(2) 研究分担者

菅原一彦 (SUGAHARA KAZUHIKO)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 70333953

(3) 連携研究者

なし