

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07203

研究課題名(和文) 肝細胞内ヘム代謝障害の非アルコール性脂肪性肝炎進展への関与

研究課題名(英文) Involvement of heme metabolic disorders in hepatocytes in the development of nonalcoholic steatohepatitis.

研究代表者

中埜 貴文 (NAKANO, Takafumi)

帝京平成大学・薬学部・講師

研究者番号：40720793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)において、鉄代謝異常がその病態の進行に関連していることが示唆されているが、その機序については明らかになっていない。本研究では、NASHの発症、病態進展と鉄代謝異常を結びつける要因として、肝細胞内での鉄利用経路の一つであるヘム生合成経路に着目し、ヘム生合成および代謝とNASHとの関連性について検討した。その結果、NASH動物モデルの作製法の一つであるメチオニン・コリン欠乏条件下では、肝細胞内ヘム生合成経路が障害されることが示唆された。また、ヘム分解酵素であるHO-1の誘導剤がNASHの起因薬剤の一つであるTamoxifenの細胞毒性を低減することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHはメタボリックシンドロームの肝での表現型として増加傾向を示し、肝疾患領域における重要性が増している。一方で発症・進展の機序は依然不明であり、その治療法も確立されていない。本研究は細胞内のヘム生合成経路とのリンクというNASHの病態の新たな側面を提示し、NASHの予防、治療応用への理論基盤の発展に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that abnormal iron metabolism is associated with the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), but the mechanism of this association remains unclear. In this study, we focused on the heme biosynthesis pathway, one of the iron utilization pathways in hepatocytes, as a factor linking the onset and progression of NASH and abnormal iron metabolism, and examined the relationship between heme biosynthesis pathway and NASH. The results suggest that the heme biosynthesis pathway in hepatocytes is impaired under methionine and choline deficiency conditions, which is one of the methods used to create animal models of NASH. We also found that an inducer of HO-1, a heme degrading enzyme, reduced the cytotoxicity of tamoxifen, one of the causative agents of NASH.

研究分野：医療薬学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 NASH HO-1 ヘム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) では体内に鉄の蓄積を認め、鉄代謝異常がその病態の進行に関連していることが示唆されている。細胞内で過剰となった鉄は活性酸素の産生を亢進させ、それに随伴する酸化ストレスが病態進展に関与すると考えられるが、その機序についての知見は殆ど無い。肝細胞には、酸化ストレスに対する防御システムが高度に発達している。その一つであるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は、基質であるヘムを分解することで抗酸化、抗炎症作用を持つビリベルジンや一酸化炭素を産生し、これらの分解産物の作用を介して細胞保護的に機能し、肝障害を抑制する。すなわち、HO-1 の細胞保護機能は、ヘムの生合成と分解という代謝回転により効率よく発揮されることから、細胞内のヘム代謝の異常は、細胞の防御システムの破綻に直結する。我々はこれまでに、C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白質がミトコンドリアへの鉄の取り込み能力を亢進し、酸化ストレスを増強することで肝毒性を悪化させることを報告した。さらに、HCV コア蛋白質がヘム生合成を障害することで、細胞内のヘム含量を低下させ HO-1 の誘導能が減弱されること、それに伴い酸化ストレスへの感受性が増大する可能性を提示した。NASH と C 型肝炎の病態には、肝脂肪化、インスリン抵抗性、酸化ストレス過剰産生、ミトコンドリア機能障害などの幾つかの共通の現象が認められる。鉄蓄積も両者に共通して観察される現象であり、ともに肝内に蓄積した鉄が酸化ストレスを増強させ病態進展に深く関わっていることが示唆されている。さらに近年になり HO-1 の転写効率の低下に係る遺伝子多型が、NASH 発症のリスクファクターとなることが報告された。これらのことから、申請者らが見出した C 型肝炎時のヘム代謝障害についての知見は、NASH についても共通する現象である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、NASH の発症、病態進展と鉄代謝異常を結びつける要因として、肝細胞内での鉄利用経路の一つであるヘム生合成経路に着目し、NASH モデルにおけるヘム生合成・代謝障害とその肝障害性との関連について実験的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) メチオニン・コリン欠乏のヘム生合成経路に対する影響の検討：

メチオニン・コリン欠乏食摂取によって発症する脂肪性肝炎は、代表的な NASH 動物モデルの一つである。メチオニン・コリンの欠乏状態においては、細胞内のホスファチジルコリン量が低下し、VLDL の分泌が抑制されることで中性脂肪が細胞内に蓄積される。そこで、マウス肝由来 AML12 細胞を無血清培地で 24 時間培養後、メチオニン・コリン不含 (MCD) 培地中で培養し、NASH モデル細胞を作製した。当該細胞にヘムの前駆体である 0.2, 0.5 mM 5-aminolevulinic acid (ALA) を 24-72 時間曝露し、細胞内及び細胞外培地中のポルフィリン及びヘムを抽出し解析した。また RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりヘム生合成関連遺伝子の発現を解析した。

(2) HO-1 誘導の Tamoxifen 細胞毒性に対する影響の検討：

ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に薬剤性 NASH の起因薬剤である Tamoxifen とともに HO-1 誘導剤 (10 μ M hemin)、HO-1 ヘム分解活性阻害剤 (10 μ M Zinc-Protoporphyrin)、ヘム前駆体 (0.2, 0.5 mM ALA)、STAT3 阻害剤 (10 μ M stattic) を 24-48 時間曝露し、WST 法にて Tamoxifen の細胞毒性への影響を検討した。また曝露 24 時間後の細胞よりセルライゼートを調製し、ウェスタンブロッティングにより HO-1 のタンパク質発現を解析した。

4. 研究成果

(1) メチオニン・コリン欠乏がヘム生合成経路に与える影響：

マウス由来肝 AML12 細胞を無血清培地で 24 時間培養後、メチオニン・コリン不含 (MCD) 培地中で培養した結果、24 時間培養以降に細胞内トリグリセリドの蓄積が観察された。本細胞にヘムの前駆体である ALA を曝露後、生成されるヘム中間体であるポルフィリン量、および細胞内ヘム含量を測定したところ、MCD 培養条件下ではポルフィリン類の生成量、および細胞内ヘム含量が減少していることが明らかとなった。一方で、ヘム生合成関連酵素群の遺伝子発現への影響をリアルタイム PCR により検討したところ、MCD 培養条件下で大きく変動しているものは見られなかった。このことから、本細胞モデルにおけるヘム生合成障害は、生合成に関与する酵素群の遺伝子発現変動を介したものではないことが示唆された。また、AML12 細胞に 0.3 mM の遊離脂肪酸 (oleic acid : palmitic acid = 2:1) を負荷した場合においては、ヘム生合成経路に同様の現象は観察されず、MCD 培地にメチオニンを補充することで、低下したヘム・ポルフィリンの生合成量が回復した。これらのことから、メチオニン・コリン欠乏下ではヘムやその中間体であるポルフィリンの生合成が障害されること、一方でこの影響は、脂質蓄積よりもむしろメチオニンの枯渇による可能性が示唆された。

(2) HO-1 誘導の Tamoxifen 細胞毒性に対する影響：

NASH の起因薬剤として知られている Tamoxifen に着目して検討を行ったところ、Tamoxifen を曝露した HepG2 細胞において、ヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の基質である Hemin を共処理することで細胞毒性が抑制されることが明らかとなった。この効果は、Tamoxifen の毒性に対し特異的であり、薬剤性肝障害を惹起することが報告されている Benzbromarone、Amiodarone、Acetaminophen 等の薬物では同様の効果はみられなかった。また、HO-1 のヘム分解活性阻害剤である Zinc-Protoporphyrin で処理した場合でも同様の毒性抑制効果が観察され、Hemin と Zinc-Protoporphyrin を共存させた場合に最も強く抑制効果が観察された。さらに、この毒性抑制効果の程度は HO-1 のタンパク発現量と相関していることが明らかとなった。一方で、ヘムの前駆体である ALA で共処理した場合には毒性の低減効果が観察されなかった。また、ALA 処理後に生成されるヘム中間体のポルフィリン量を測定したところ、Tamoxifen の存在下ではポルフィリンの細胞外への漏出量が顕著に増加しており、さらに HO-1 のタンパク質発現を誘導しないことが明らかになった。これらのことは、Tamoxifen の存在下ではヘム前駆体である ALA からヘムへの生合成が完遂していないことを示唆している。続いて、hemin による Tamoxifen の細胞毒性への保護効果のメカニズムについて検討したところ、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 阻害剤で処理することで hemin による保護効果が低減することが明らかになった。これらのことから、HO-1 が従来考えられているヘムの分解産物を介した作用とは異なる機序で Tamoxifen の細胞毒性に対して保護的に機能していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中埜 貴文, 澤井 貴則, 菅原 康矢, 水間 俊
2. 発表標題 タモキシフェンの細胞障害性に対するヘムオキシゲナーゼ-1のヘム分解非依存的な防御効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中埜 貴文, 斎藤 碧, 水間 俊
2. 発表標題 メチオニン・コリン欠乏により惹起される肝細胞内ヘム・ポルフィリン生合成障害
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中埜 貴文, 佐和田 優弥, 宮本 裕史, 水間 俊, 堀江 利治
2. 発表標題 脂質蓄積モデル細胞におけるヘム生合成変動に関する検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 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	水間 俊 (MIZUMA Takashi) (80229715)	帝京平成大学・薬学部・教授 (32511)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------