

平成23年5月31日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20390215
 研究課題名(和文)
 蛋白質架橋酵素トランスグルタミナーゼを標的とした肝疾患の治療予防に関する基礎研究
 研究課題名(英文)
 Studies on a role of a crosslinking enzyme, transglutaminase in pathogenesis of liver diseases
 研究代表者
 小嶋 聡一 (KOJIMA SOICHI)
 独立行政法人理化学研究所・分子リガンド生物研究チーム・チームリーダー
 研究者番号： 10202061

研究成果の概要(和文)：

アルコール肝炎(ASH)モデル・非アルコール肝炎(NASH)の動物モデル、患者検体について、生化学的解析、組織免疫学的解析、網羅的遺伝子発現解析を行ない、肝障害時には、蛋白質架橋酵素トランスグルタミナーゼがCドメインを介して核に移行し、肝細胞の生存に必須の遺伝子発現を制御する転写因子Sp1を架橋・不活性化する結果、c-Metの発現が減少し、カスパーゼ非依存の肝細胞死、並びに線維化が誘導されることを発見し、核移行阻害剤の探索を開始した。

研究成果の概要(英文)：

We demonstrated that upon injury, a protein crosslinking enzyme, transglutaminase translocates into the nucleus via its C-domain, crosslinks and inactivates Sp1 transcription factor, which results in the downregulation of the expression levels in c-Met, leading to caspase-independent hepatic cell death as well as fibrosis of the liver in both animal models and patients. We started screening of a unique compound that specifically inhibits nuclear translocation of transglutaminase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：消化器病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：Sp1,c-Met,アポトーシス、アルコール脂肪性肝炎、トランスグルタミナーゼ、架橋反応、小胞体ストレス、非アルコール脂肪性肝炎

1. 研究開始当初の背景

肝臓で比較的大量に発現するが、その機能があまり良く判っていなかったタンパク質架橋酵素のトランスグルタミナーゼは、タンパク質の Gln と Lys 残基間に架橋結合を形成する酵素ファミリーで、生体構造の安定化に寄与する一方、細胞の増殖・分化、アポトーシスへの関与が示唆されてきたが、そのメカニズムは不明であった (Nat Rev Mol Cell Biol 4:140, 2003; FEBS Lett 579:3297, 2005)。トランスグルタミナーゼは C 末端に GTPase 活性を有し、通常の細胞内 Ca²⁺濃度 (~10 nM) 下では GTPase としてアドレナリン性シグナル伝達に働くが、何かの刺激で細胞内 Ca²⁺濃度が 600-700 nM に上昇すると立体構造が変化し架橋結合活性を発揮する (Nat Rev Mol Cell Biol 4:140, 2003)。

肝疾患に対しては、1) 細胞外マトリックス蛋白質架橋重合化による線維化の重篤化 (Am J Pathol 272:G281, 1997) 2) 細胞表面上における TGF- β 活性化反応の支持 (J Cell Biol 121:439, 1993)、3) 肝細胞の増殖・細胞死への関与 (J Biol Chem 275:22213, 2000) などが示唆されてきたが、明確な証明は乏しく、さらに、3) については、逆の現象がハンガリーのグループから報告され (Hepatology 42:578, 2005)、混沌としていた。

小嶋は、トランスグルタミナーゼが増殖因子のミッドカインの架橋 2 量体形成 (JBC 272:9410, 1997) や LTBP を介した潜在型 TGF- β 分子の細胞膜表面への固定を介する TGF- β 活性化反応の促進 (JCB 121:439, 1993) に関与することを見いだし、その転写活性化に転写因子 Sp1 が関わること (Mol Endocrinol 15:1677, 2001) を見いだす過程で、トランスグルタミナーゼが核に移行すると、逆に Sp1 の架橋不活性化を引き起こすことで、抗癌剤処理した癌細胞にカスパーゼ非依存のアポトーシスを引き起こすことを見いだした (化学工業 54:908, 2003; Int J Oncol 24:797, 2004)。さらに、劇症肝炎動物モデルにおける肝細胞のアポトーシスにトランスグルタミナーゼが深く関わることを見いだしたが、その詳細な機構とヒト疾患における意義は不明であった。

2. 研究の目的

今までの研究成果に基づきトランスグルタミナーゼを介する肝細胞死と肝線維化促進の分子機構を解明し、患者で実証して、その制御機構を見出す。

- (1) アルコール脂肪性肝炎 (ASH) モデル、非アルコール脂肪性肝炎 (NASH) モデルにおけるトランスグルタミナーゼ依存肝細胞死経路の証明(平成20年度)
- (2) 肝障害によるトランスグルタミナーゼ発現上昇・核局在誘導機構の解明(平成20-21年度)
- (3) 影響を受ける転写因子・遺伝子についての網羅的解析と他の修飾反応との競合の解析(平成21-22年度)
- (4) トランスグルタミナーゼが肝星細胞を活性化する分子機構の解明(平成20-21年度)
- (5) 肝疾患患者検体における(1)-(4)の結果の確認(平成20-22年度)
- (6) 同経路の制御方法の開発(平成21-22年度)

3. 研究の方法

ラット並びにマウス初代肝細胞やヒト肝細胞株培養系及び動物モデル系において、肝障害によるトランスグルタミナーゼの発現上昇・核移行の分子機構、標的遺伝子や標的転写因子、他の修飾反応との競合反応、肝星細胞活性化機構を、トランスグルタミナーゼプロモーターリポーター遺伝子、組換え融合蛋白質などのツールを用いた分子細胞生物学的解析方法、Gene チップを用いた網羅的解析方法により解析した。トランスグルタミナーゼ依存肝細胞死経路並びに上記解析結果のアルコール肝疾患モデル、NASH モデル、ヒトにおける検証は、架橋 Sp1 抗体などのツールを用いた、肝組織の免疫組織学的解析、肝組織抽出液の生化学的解析、KO マウスを用いた遺伝学的解析により行う。同経路の制御機構の解析は、分子機構の解析結果に基づき、ケミカルスクリーニングを行い、有望な制御候補化合物を得たら、その作用機構を分子細胞生物学的方法により解明する。

4. 研究成果

(1) ASHモデル、NASHモデルにおけるトランスグルタミナーゼ依存肝細胞死経路の証明

マウス ASH モデル、並びに患者検体を用いた解析から、過度のアルコール摂取時にトランスグルタミナーゼが核に移行し、肝細胞の生存に必須の遺伝子発現を制御する転写因子 Sp1 を架橋・不活性化の結果、カスパーゼ非依存の肝細胞死が誘導されることを発見した (Gastroenterology 136:1783, & cover page, 2009) (図 1)。アルコール肝障害によるトランスグルタミナーゼの発現上昇は、アセトアルデヒドを介しており、酸化ストレス、小胞体ストレス、NF- κ B 活性化が関与している。

アルコール肝炎での報告に続き、NASH マウスモデル(コリン欠乏過脂肪食モデル)・患者でも、トランスグルタミナーゼの核局在、転写因子 Sp1 架橋不活性化が起こることを確認、核トランスグルタミナーゼ産生促進に至る分子機構を検討した。遊離脂肪酸→小胞体ストレス、NF- κ B 活性化→TG2 転写活性化、核局在が起こることがわかった。この一連の変化は PERK 経路を介しているのに対して、アルコール(アセトアルデヒド)による変化は、レチノイドシグナルを介していることを見出した(J Cell Physiol in press, 2011)。

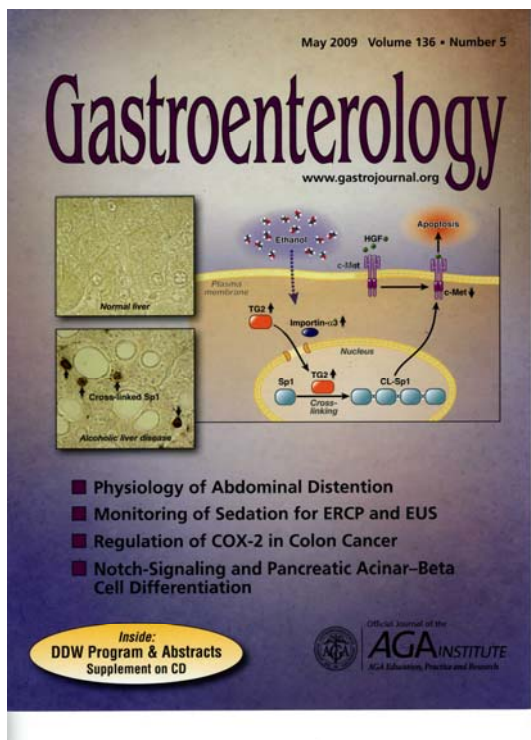


図 1 トランスグルタミナーゼを介する肝障害時の新規肝細胞死経路

(2) 肝障害によるトランスグルタミナーゼ発現上昇・核局在誘導機構の解明

トランスグルタミナーゼを構成する 4 つのドメインの GFP 融合タンパク質を作製し、in vitro 核移行測定を行った結果、3 つ目の β バレルドメイン 1 (C ドメイン) に核内移行シグナルが存在し、ATP 並びにインポーチン β 依存的な核内移行を担っていることがわかった。現在この核輸送に関わるインポーチン β ファミリー分子の同定を試みている。

核と細胞質のトランスグルタミナーゼの分子量を調べたところ、細胞質では 92 kD であるのに対して、核では 78 kD であることが分かった。この差は D ドメインの分子量に相当する。D ドメインには、GTPase 活性部位が存在し、核外移行シグナルが存在していることを見出した。また、トランスグルタミナーゼが核に局在しているときに、レプトマイシン B の標的である exportin1 の発現量低下を観察した。これらの結果から、これまで、TG2 は、細胞障害刺激によって細胞質から核へ移行が高まり核に局在すると予想していたが、実はそうではなく、トランスグルタミナーゼは、通常一部が C ドメインを介して核内移行、D ドメインを介して核外移行、すなわち細胞質-核間をシャトリングしており、細胞障害刺激を受けると、核外移行シグナルを有する D ドメインが切り取られるために、A-C ドメインからなる 78 kD の GTPase 活性を持たない架橋酵素型トランスグルタミナーゼが核に残る、すなわち局在し、Sp1 を架橋することで proapoptotic に働くことが示唆された(論文投稿準備中)。

(3) 影響を受ける転写因子・遺伝子についての網羅的解析と他の修飾反応との競合の解析

Sp1 のほかに KLF ファミリーに属する転写因子が影響を受けるのに対して、AP-1 は影響を受けないこと、網羅的解析結果から、肝障害経路、細胞死経路に関わる遺伝子が影響を受け、TLR 経路も影響を受けることが示唆された(Gastroenterology 136:1783, 2009)。eIF5A のハイプシン化には影響がなかった。

(4) トランスグルタミナーゼが肝星細胞を活性化する分子機構の解明

架橋 Sp1 生成による c-Met 発現低下が肝線維化と関係していることを示唆する結果を得た。ASH 患者肝切片の線維化領域の免疫染色解析により実質領域のみならず、線維化領域においても核トランスグルタミナーゼや架橋 Sp1 の生成を確認し (Digestive Diseases 28:715, 2010)、Giebeler らの c-Met 発現低下による TGF- β 発現亢進の報告 (Gastroenterology 137:297, 2009) と一緒に考え、“肝障害→核 TG2→Sp1 架橋不活性化→c-Met 発現減少→TGF- β 発現亢進→肝星細胞活性化→肝線維化”という新しい肝線維化の分子機序を提案した (Cell Biol Int 34:325, 2010)。このとき、線維化領域ではトランスグルタミナーゼ 2 の発現が見られないこと、トランスグルタミナーゼ 2KO マウ

スでは、胆管結紮線維化モデル及び脂肪性肝炎モデルにおいて、野生型マウスと比べて線維化の程度に有為な差が見られなかったことから、トランスグルタミナーゼ2以外のトランスグルタミナーゼファミリーが架橋 Sp1 生成を伴う線維化形成に働いている可能性が示唆された。

(5) 肝炎患者検体における(1)-(4)の結果の確認

ASH (*Gastroenterology* 136:1783, 2009) ならびに NASH (*J Cell Physiol* in press, 2011) 患者肝臓に加えて、肝癌の2次発がん抑制を目的とした新規抗がん剤候補である非環式レチノイドの投与を受けた患者肝臓中の肝癌幹細胞においても、核トランスグルタミナーゼや架橋 Sp1 の生成を確認し、障害を受けた正常肝細胞に加えて、抗癌剤投与を受け肝細胞癌がアポトーシスを起こす際も、同様のトランスグルタミナーゼ依存アポトーシス機構が働いていることを明らかにした (*Mol Cancer* 10:4, 2011)。

(6) 同経路の制御方法の開発

理化学研究所の天然化合物バンク NPDepo の 6,720 化合物を用いたスクリーニング研究から肝細胞核内トランスグルタミナーゼの核局在を阻害することにより核 TG2 の活性を特異的に抑制する化合物を1つ見つけることができた。現在、構造活性相関研究を続行中である。

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 10 件)

Kuo, T.-F., Tatsukawa, H., Matsuura, T., Nagatsuma, K., Hirose, S., and Kojima, S. (2011) Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J. Cell Physiol.* in press, 2011 査読有

Saiki, R., Park, H., Ishii, I., Yoshida, M., Nishimura, K., Toida, T., Tatsukawa, H., Kojima, S., Ikeguchi, Y., Pegg, A. E., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404(4):1044-1049, 2011 査読有

Tatsukawa, H., Sano, T., Fukaya, Y., Ishibashi, N., Watanabe, M., Okuno, M., Moriawaki, H., and Kojima, S. Dual

induction of caspase 3- and transglutaminase-dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular Cancer* 10(1):4 (11pages), 2011 査読有

Itoh, M., Kawamoto, T., Tatsukawa, T., Kojima, S., Yamanishi, K., and Hitomi, K. In situ detection of active transglutaminases for keratinocyte type (TGase 1) and tissue type (TGase 2) using fluorescence-labeled highly reactive substrate peptides. *J. Histochem. Cytochem.* 59(2):180-187, 2011 査読有

Kojima, S., Kuo, T.-F., Tatsukawa, H., and Hirose, S. Induction of crosslinking and silencing of Sp1 by transglutaminase during liver injury in ASH and NASH via different ER stress pathways. *Digestive Diseases.* 28(6):715-721, 2010 査読無

Mukhopadhyay, B., Liu, J. Osei-Hyiaman, D., Godlewski, G., Mukhopadhyay, P., Wang, L., Jeong, W., Gao, B., Duyster, G., Mackie, K., Kojima, S., and Kunos, G., Transcriptional regulation of cannabinoid receptor-1 expression in the liver by retinoic acid acting via retinoic acid receptor- γ .

J. Biol. Chem. 285(25):19002-19011, 2010 査読有

Tatsukawa, H., and Kojima, S. Recent advances in understanding of roles of transglutaminase in alcoholic steatohepatitis. *Cell Biol. Int.* 34(3):325-334, 2010 査読有

Tatsukawa, H., Fukaya, Y., Frampton, G., Martinez-Fuentes, A., Suzuki, K., Kuo, T.-F., Nagatsuma, K., Shimokado, K., Okuno, M., Wu, J., Iismaa, S., Matsuura, T., Tsukamoto, H., Zern, M. A., Graham, R. M., and Kojima, S. Role of transglutaminase 2 in liver injury via crosslinking and silencing of transcription factor, Sp1. *Gastroenterology* 136(5):1783-1795, & cover page, 2009 査読有

Botella, L. M., Rodriguez-Sanz, F., Komi, Y., Fernandez-L, A., Varela, E., Garrido-Martin, E. M., Narla, G., Friedman, S. L., and Kojima, S. TGF- β regulates expression of KLF6 and its splice variants, and promotes cooperative transactivation of common target genes through a Smad3-Sp1-KLF6 interaction. *Biochem. J.* 419(2):485-495, 2009 査読有

辰川英樹、小嶋聡一、アルコール性肝障害の新規肝細胞死誘導経路の発見、バイオサイエンスとインダストリー 67(8):423-427, 2009 査読無

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① Kojima, S. Induction of crosslinking and silencing of Sp1 by transglutaminase during liver injury in ASH and NASH via different ER stress pathways., *5th Int Meeting on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases (ALPD) and Cirrhosis*, 2010 年 10 月 5 日, Freiburg, Germany
- ② Kojima, S., Induction of transglutaminase 2 during the pathogenesis of both alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic steatohepatitis., *2010 ISBRA World Congress*, 2010 年 9 月 15 日, Paris, France
- ③ Kojima, S., Crosslinking and silencing of Sp1 by transglutaminase during liver injury. *1st Gordon Research Conference on "Transglutaminases in Human Disease Processes"*, 2010 年 7 月 19 日, Davidson, NC, USA
- ④ Kojima S. et al., Induction of protein crosslinking enzyme, transglutaminase, during pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis., *4th Int Sympo on Alcoholic liver and pancreatic Disease and cirrhosis.*, 2009 年 10 月 8-9 日, Hurghada, Egypt.
- ⑤ Tatsukawa, H. et al., A novel hepatic apoptosis pathway in the injured liver via crosslinking and inactivation of transcription factor, Sp1 by tissue transglutaminase., *59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease*, 2008 年 11 月 1 日, San Francisco, USA

〔図書〕（計 2 件）

- ① 小嶋聡二, 辰川英樹, 日本メディカルセンター「肝疾患Review 2010~2011」2010 年、231~235 頁
- ② 長田裕之, 小嶋聡二 他, 株式会社オーム社「入門ケミカルバイオロジー」2008 年、189 頁

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2011/index.html>

理研プレスリリース「タンパク質の架橋反応が細胞死を招き、アルコール性肝障害に—アルコール性障害の肝臓で繰り返される新しい肝細胞死のメカニズムを発見—」2009 年 5 月 1 日

日刊工業新聞 「独創研究集団 理研の最前線 アルコール性肝障害の新しい病態形成機構 肝細胞死経路を発見 疾患の新診断法開発」2009 年 9 月 21 日

理研ニュース 2009 年 7 月号「アルコール性肝障害における肝細胞死の新しい経路を発見」2009 年 7 月 6 日

ヤフージャパンニュース「飲みすぎによる肝障害のメカニズムを解明」2009 年 5 月 12 日

ニッケイネット 「理化学研究所、アルコール性肝障害の新たな分子メカニズムを解明」2009 年 5 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 聡一 (KOJIMA SOICHI)

独立行政法人理化学研究所・分子リガンド生物研究チーム・チームリーダー
10202061

(2) 研究分担者

山口 寛二 (YAMAGUCHI KANJI)

京都府立医科大学・医学部付属病院・研究員
50381950

小瀬 真吾 (KOSE SHINGO)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員
90333278

(3) 連携研究者

松浦 知和 (MATSUURA TOMOKAZU)

東京慈恵会医科大学・医学研究科・講師→准教授
30199749