

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590758

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝炎における小胞体ストレスの役割

研究課題名（英文）The role of endoplasmic reticulum (ER) stress in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

佐藤 賢 (SATO KEN)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：40396619

研究成果の概要（和文）：

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）における小胞体ストレスの役割は十分に解明されていない。小胞体ストレス関連分子である CHOP のノックアウト（KO）マウスを用いて、NASH 動物モデルを作製するための MCD diet を投与して野生型（WT）マウスとの比較を行った。KO マウスでは、WT マウスと比較して MCD diet 投与 1 週間での肝脂肪沈着・アポトーシス・好中球浸潤の減少を認めたが一過性であり、両マウス間における PPAR γ の発現亢進ピークの時間的なずれと病態との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The role of endoplasmic reticulum (ER) stress in nonalcoholic steatohepatitis has not been fully elucidated. Because CHOP is one of the ER stress-related molecules, we compared CHOP knock out (KO) mice and wild type (WT) mice in steatohepatitis mice model using a methionine-choline (MCD) deficient diet. Steatosis and neutrophil infiltration, and apoptosis in liver tissue were significantly attenuated in KO mice compared with WT mice at 1 week after the administration of MCD diet. But these significant differences were transient. The time to peak level of the expression of PPAR γ was different between KO mice and WT mice. This may be one of the causes of the difference of pathophysiologic change between KO mice and WT mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基礎医学・病態分子生物学

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：発現制御・ストレス・シグナル伝達・遺伝子・病理学

1. 研究開始当初の背景

小胞体には、多種多様な分子シャペロンやフォールディング酵素が存在し、これら小胞体

シャペロンの作用により新生蛋白質は効率よく折り畳まれている。しかし高次構造形成に失敗した異常な蛋白質は、小胞体内から細

胞質へ送りだされ、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解されるが、この折り畳みと分解のバランスに変化が生じ、結果として小胞体内に高次構造異常蛋白質が蓄積する状況を小胞体ストレスという。一方糖尿病における小胞体ストレスの研究から小胞体ストレスシグナルがインスリンシグナルを調節してインスリン抵抗性と関連する可能性が示唆されている。一方で非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、肝細胞への中性脂肪沈着 (脂肪肝) が起こり (1st hit)、さらに 2nd hit といわれる肝細胞障害要因 (酸化ストレスやアディポサイトカインなど) によって形成される病態であり、病因としてインスリン抵抗性が重要であり、糖尿病と合併することも多い疾患である。CHOP は、growth arrest や DNA damage により誘導される遺伝子で 29kDa の C/EBP-homologous protein をコードし、パートナーである C/EBP β に結合し、ある種の遺伝子や C/EBP ダイマーを制御する (Ron and Habener. *Genes Dev* 1992;6:439-453)。また CHOP は C/EBP ファミリーに属する転写因子で小胞体ストレスにより強く誘導され、これは PERK の活性化や引き続いておこる ATF4 の活性化に基づくものである (Fawcett et al. *Biochem J* 1999;339:135-141, Harding et al. *Mol Cell* 2000;6:1099-1108, Luo et al. *J Biol Chem* 2003;278:37375-37385)。CHOP ノックアウトマウスは小胞体ストレスでのアポトーシスに耐性を示す (Zinszner H et al. *Genes Dev* 1998; 12:982-995。) ことから、CHOP がアポトーシスを誘導する分子を制御するに加え、小胞体ストレスでの翻訳抑制の解除や小胞体でのレドックス制御によりストレス適応には役立つが、過剰な CHOP の誘導は翻訳抑制の早期解除によるストレスの増大や活性酸素産生の増大をもたらすことが解明されてきた (McCullough KD et al.

Mol Cell Biol 2001; 21:1249-1259)。

一方 NASH における動物モデルとして食餌性に MCD diet (メチオニン・コリン欠乏食) をマウスに一定期間投与することによって NASH に類似した肝組織障害を作製することができることが知られ、我々の核内レセプター CAR の解析実験 (Yamazaki Y, Sato K, Takagi H, et al. *Gut*. 2007;56:565-574.) でも使用した。そこで我々は Preliminary experiment として野生型マウスにおいて正常食や、MCD diet のコントロール食である高脂肪食及び MCD diet を 4 週間負荷すると、正常食や高脂肪食に比べて MCD diet において CHOP の mRNA が有意に増加する知見を得た (unpublished data)。従って NASH では小胞体ストレスが誘導されていることが推察され、CHOP ノックアウトマウスを用いて NASH が改善することを示すことができれば NASH における小胞体ストレスの関与を明らかにすることができる。また最近この研究に類似した研究が *Hepatology* に発表された。その報告では、CHOP が結合するパートナーである C/EBP β のノックアウトマウスを使い、MCD diet を投与することにより、コントロールマウスと比較し、炎症や小胞体ストレス及び脂質蓄積が減弱することが示された (Rahman SM et al. *Hepatology* 2007;45:1108-1117。) この報告は、NASH における小胞体ストレスの関与を示唆するものであり、本研究の理論的根拠を裏打ちするものである。しかしながら Rahman SM らの実験では、小胞体ストレスと脂質代謝や炎症のシグナルの関連を検討しているが、酸化ストレスに関しては、CYP2E1 や NF κ B に関して Immunoblot で検討しているものの、肝臓における、DNA 酸化障害のマーカーである (8-OH-dG; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) や酸化ストレスの指標である isoprostane, 組織での過

酸化脂質代謝反応のマーカーである 4 HNE (4-hydroxy-2-nonenal) での検討などがされていない。また NASH の重要な所見である肝線維化に関しては、全く検討されていない。従って網羅的な検討とはいえない。

2. 研究の目的

本研究では、CHOP ノックアウトマウスを用いて網羅的に、小胞体ストレス・酸化ストレス・脂質代謝・肝線維化に関して検討することにより、NASH の病態における小胞体ストレスの関与及び他の代謝系とのクロストークを明らかにすることができる可能性がある。さらに小胞体ストレスを緩和する薬剤が NASH に対する治療薬の候補にもなりうる点で、当該学問分野及び新しい学問分野のニューフロンティアとなりうる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

1. CHOP ノックアウトマウスとそのコントロールマウス (野生型マウス) の繁殖の確立

親泊先生からご供与いただいた CHOP ノックアウトマウスとそのコントロールマウスを繁殖させ、マウスの尾から RNA を抽出し、野生型とノックアウトマウスのプライマーを用いて RT-PCR にてホモカヘテロカ phenotype を確認し、確実に CHOP ノックアウトマウスの繁殖を行う。

2. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデル作製

非アルコール性脂肪肝炎を生じさせるために確立された食餌性 NASH モデルである MCD diet を野生型マウスと CHOP ノックアウトマウスに同時に投与して経時的に観察を行う。MCD diet に対するコントロール食はメチオニンとコリンの欠乏のない高脂肪食のため、正常食も用意して 3 種類の食事に対する 2 群のマウスで 6 群の比較を行う予定である。ま

た一般にノックアウトマウスは fragile のため、まず、MCD diet を投与して死亡や有害事象など安全性や長期投与が可能かどうかの評価を preliminary に行う必要がある。またその際、MCD diet には、MP バイオ社作製のものと、船橋農場作製のもので diet の組成が多少異なるため、両者を試してどちらが実験に最適かを検討する。尚今までの MCD diet を用いた実験の経験から、動物実験施設での温度設定などの環境条件や MCD diet の新鮮度などが実験結果に影響を及ぼす場合があるため、これらの条件を一定にすべく最大限の注意を払う。また一般に MCD diet を消費すると、同週齢の野生型に比べ体重増加が少なくなるため、diet が正しく割り付けられたかどうかの目安になる。従って動物実験施設には毎日通い、マウスの状態や重量・餌の消費状態などを観察し、適切な環境調整を行う。

3. マウス血清での評価

投与開始後 2, 4, 8, 24 週において CHOP ノックアウトマウスとコントロールマウスを同時に屠殺し、同時に採血して、肝逸脱酵素 (ALT, AST, ALP, γ -GTP など) 脂質 (LDL-cholesterol, triglyceride、インスリン抵抗性 (血糖、インスリン)、フェリチンを測定し比較検討する。再現性の確かな実験にするため、最低限各群 N=5 以上の個体数で行う。外れ値が出た場合には、スミルノフの棄却検定で外れ値を生かすべきかどうか検討し各群の適正な評価値を得る。

4. 肝組織での評価

投与開始後 2, 4, 8, 24 週において CHOP ノックアウトマウスとそのコントロールマウスを同時に屠殺し、肝重量/全身体重比を測定する。肝組織で、CHOP の発現を real-time monitor PCR で確認する。また組織標本とし

て Hematoxylin-Eosin 染色、sirius red 染色 または oil red O 染色の陽性面積計測や α -smooth muscle actin 陽性細胞数のカウントで肝組織の脂肪沈着・炎症・線維化の程度を評価する。各週数での肝組織や血清は凍結保存し、あるいは未染標本として保管し、以上の実験を反復し、各群の血清・肝組織での評価を各群個体数 5 以上で再現性が確立するまで反復する。予想される結果が得られない場合には、1) phenotype のスクリーニングミスはないか。2) 肝組織などの取り違いはないか。3) MCD diet の品質はどうか 4) 摂食状況は十分か 5) 餌の取り違いはないか、などの検証を進める。各週における実験結果によっては、週数を変えて差が明瞭化する週数での上記血清・肝組織の検討を加える。次に非アルコール性脂肪肝炎の程度の差を引き起こすメカニズムを解明するために 1st hit 及び 2nd hit の解析を冷凍保存してある肝臓組織を用いて検討する。即ち、1st hit である肝内中性脂肪を測定し脂肪肝の程度を比較し、肝組織標本での脂肪沈着の程度と正の相関があるかどうか確認し、1st hit での両群の差を検討する。次に 2nd hit である酸化ストレスを評価するために、肝組織を用いて、活性酸素種の産生系の評価として、CYP 2E1、Acox 1、iNOS、p47^{phox}、活性酸素種の消去系の評価として、SOD1 や抗酸化作用を有する HO-1 の real-time monitor PCR または Western blot を行う。炎症性サイトカインである TNF α の real-time monitor PCR、脂質過酸化物の評価として F2-isoprostane を、また組織の免疫染色を行って nitrotyrosine, 8-OHdG, 4HNE を評価する。脂質代謝を検討するために、SREBP-1 の発現を real-time monitor PCR で検討する。線維化の程度を評価するために、上述の免疫染色の他に、肝組織を用いて TGF β 、Collagen 1 α 、TIMP-1、

MMP-13、PAI-1 を real-time monitor PCR で測定し比較する。小胞体ストレスそのものの評価には、Apoptosis 関連蛋白 (BCL-XL、GADD 45 γ など) や小胞体ストレス誘導蛋白 (PERK、eIF2 α など) を用いて Western blot で評価する。更に In situ Apoptosis detection kit を用いて肝組織における Apoptosis を評価する。なおシグナル伝達の解析には、小胞体ストレス応答に反応して活性化する PERK、ATF6、IRE1 経路を中心に、ストレスやサイトカイン刺激で活性化され、アポトーシスにも重要な役割を果たす MAP キナーゼ、レドックス制御に重要な NF κ B や、肝線維化に重要な役割を果たす TGF β と、TGF β とのクロストークが知られ、インスリンや増殖因子で活性化される PI3K シグナルに関して、抗リン酸化抗体を用いた Western blot 等を用いて解析する予定である。

4. 研究成果

1. CHOP ノックアウトマウスとそのコントロールマウス (野生型マウス) の繁殖の確立

親泊先生からご供与いただいた CHOP ノックアウトマウスとそのコントロールマウス (野生型マウス) を繁殖させ、確実な CHOP ノックアウトマウスの繁殖を行い得た。

2. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデル作製

非アルコール性脂肪肝炎を生じさせるために確立された食餌性 NASH モデルである MCD diet (メチオニン・コリン欠乏食) を野生型マウスと CHOP ノックアウトマウスに同時に投与して経時的に観察を行い、1, 2, 4, 9 週目の解剖を行った。

3. 肝組織での評価

CHOP の発現では、MCD diet (メチオニン・コリン欠乏食)において亢進していた。投与開始後 1, 2, 4, 9 週において肝組織の脂肪沈着・炎症・線維化に関しては、1 週において肝組織の脂肪沈着がノックアウトマウスで著明に減弱していたが、2 週以降においては、肝組織の程度は同様で著明な差はあまり見られなかった。

4. 肝組織での免疫染色での検討

肝組織での染色で、TUNEL assayでは、MCD diet投与1週目でノックアウトマウスは、野生型マウスに比べ陽性細胞数の減少を認めたが、2週目では差がなくなっていた。酸化ストレスマーカーである8-OHdGによる免疫染色では、1週目でノックアウトマウスは、野生型マウスに比べ陽性細胞数の減少を認めた。またCaspase 12の免疫染色では、1週目でノックアウトマウスは、野生型マウスに比べ陽性細胞数の減少を認めたが、2週目では差がなくなっていた。Myeloperoxidase (MPO) の免疫染色では、MCD diet投与1週目で、KOマウスに比べ野生型マウスでは陽性細胞の減少を認めたが、2週目では差がなくなっていた。

5. 脂質関連酵素遺伝子の発現の検討

SREBP-1などの脂質関連酵素遺伝子の発現を肝組織中のmRNAに関して検討した。PPAR γ mRNAは、MCD diet投与後1週でmRNAが野生型マウスに比べノックアウトマウスで増加していた。2週目では発現レベルは逆転し、その後発現は低下していた。つまり、PPAR γ mRNAの発現のピークが野生型マウスに比べノックアウトマウスで遅くなり、4週、9週と進むにつれどちらも低下していた。

6. アポトーシス関連蛋白及びmRNA発現の検討

Caspase 3 などの肝組織中の蛋白発現を Western blot で検討した。Caspase 3 の肝組織中の蛋白発現を Western blot で検討し、1 週目の発現は、野生型マウスで強いものの 2 週目では差がなくなっていた。Bax mRNA は MCD diet 投与 1 週目で野生型マウスがノックアウトマウスに比べ発現が増強していたが、2 週目では差がなくなっていた。

結論

以上より CHOP ノックアウトマウスによる MCD diet 1 週後の肝脂肪沈着減少効果及びアポトーシス・好中球浸潤の減少効果は、一過性であり、コントロールマウスと野生型マウスにおける PPAR γ の発現亢進ピークの時間的ずれと病態との関連が示唆された。

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 2 件)

本研究の成果でないが、関連性のある論文として 2 件を記載する。いずれも Corresponding author である。

1. Transforming growth factor- α attenuates hepatic fibrosis: possible involvement of matrix metalloproteinase-1. Ohyama T, Yamazaki Y, Sato K, Horiguchi N, Ichikawa T, Kakizaki S, Takagi H, Mori M. Liver Int. 2011 Apr;31(4):572-84. 査読有。
2. Werner syndrome as a possible cause of non-alcoholic steatohepatitis. Hashizume

H, Sato K, Takagi H, Kanda D, Kashihara T, Kiso S, Mori M. J Clin Pathol. 2009 Nov;62(11):1043-5. 査読有。

[学会発表] (計2件)

1. Transforming growth factor- α attenuates hepatic fibrosis: possible involvement of matrix metalloproteinase-1. DDW 2011年5月10日、McCormick place (Chicago, USA).

2. Werner syndrome as a possible cause of non-alcoholic steatohepatitis. The 9th JSH Single Conference. 2010年11月25日、グランドプリンス高輪 (東京、日本)。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 賢 (SATO KEN)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：40396619