

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20590759

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝炎の病態における核内レセプターPXRとCARのクロストーク

研究課題名（英文）The role and crosstalk between nuclear receptors PXR and CAR on the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis.

研究代表者

柿崎 暁 (KAKIZAKI SATORU)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：80344935

研究成果の概要（和文）：

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病態における核内レセプターPXR・CARの役割とクロストークを検討した。メチオニン・コリン欠乏食によるNASHモデルで、CARはROS（活性酸素）産生を亢進させ、肝障害・肝線維化を増悪させた。PXR KOマウスでは、WTマウスと有意な差はみられなかった。NASHモデルでの発癌実験で、CARは細胞増殖を亢進させることにより発癌に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The roles and crosstalk between nuclear receptors PXR and CAR on the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) were evaluated in this study. CAR accelerated the production of reactive oxygen species (ROS) and worsened the liver injury and fibrosis in the NASH model using methionine- and choline-deficient diet. There were no differences in NASH between PXR knockout and wild-type mice. CAR play a role in the hepatocarcinogenesis of the murine NASH model via the upregulation of cell proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：病態生理学

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：非アルコール性脂肪性肝炎、核内レセプター、CAR、PXR、Cytochrome P450

1. 研究開始当初の背景

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) を代表に、NASHの病態には、核内レセプターが深く関与している。CARは、肝臓に発現し、本来、薬物代謝酵素 (Cytochrome P-450 (CYP)、UDP-glucuronosyltransferase

(UGT)、Multidrug resistance relation protein (MRP) などの発現調節を行う核内レセプターであるが、糖代謝、脂質代謝にも深く関与していることが明らかになってきた。我々は、CARの肝疾患における重要性をいち早く見出し、その病態と意義を解明して

きた。一方、PXR (pregnane X receptor)は、CARと同様にRXR (retinoid X receptor)とヘテロダイマーを形成し、CYP3Aなどの薬物代謝酵素や脂質代謝に深く関与する核内受容体である。多くの遺伝子プロモーター領域で、CARと結合部位を共有しており、CARとPXRは他の核内受容体を含め互いに密接に関連している。我々は、NASHの病態へのCARの関与を示唆する結果を見出した。本研究では、NASHにおけるPXR・CARの関与とCARとPXRのクロストークの詳細なメカニズムの解明をする。

2. 研究の目的

非アルコール性脂肪性肝炎 (Non alcoholic steatohepatitis, NASH)の病態における核内レセプターPXR・CARの意義、並びにレセプター間のクロストークの詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

下記に示すノックアウト (KO) マウスを用いた実験系、in vitroでCAR発現細胞を用いた実験系、臨床検体を用いた実験系と、基礎 (in vivo及びin vitro)及び臨床の両面からNASHの病態を解明する。

1. PXR及びCARノックアウトマウスを用いた解析

(1) C3H/HeN系からC57BL/6N系へのマウスのバッククロス及びPXR、CAR double KOマウスの作成

マウスは系統間で、NASHの疾患感受性に差があり、我々はC57BL/6NとC3H/HeN間での違いを検討し報告した (*J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:276-82)。疾患感受性の強いC57BL/6Nに、PXR及びCAR KOマウスの系統を替える。さらに、C57BL/6N系でPXR、CAR double KOマウスを作成する。

(2) 各KOマウスのMCD食によるNASHモデルでの比較検討

実験的NASHモデルの作成に用いられているメチオニン・コリン欠乏食 (MCD食)を用い、C3H/HeN系のCAR KOマウス、PXR KOマウス、PXR、CAR double KOマウスでのNASHモデルを解析する。

- 肝障害・線維化・線維化マーカー (TIMP、MMP、collagen1 α 1)のmRNAの変化、長期飼育での肝臓組織中の過酸化脂質濃度の変化について検討する。
- MCD食長期飼育での肝線維化・発癌へのCAR及びPXRの関与を検討する。さらに、CAR及びPXRを抑制することによるNASHの治療法の開発やその応用を検討する。

2. ケトン体 (ヒドロキシ酪酸) 及び NASH 起因性薬剤の CAR 及び薬物代謝酵素への影響 ケトン体 (ヒドロキシ酪酸) 及び薬剤誘発性

NASHの原因として挙げられている薬剤のCAR、PXR及び薬物代謝酵素群 (CYP2B、CYP3A、UGT1A、MRP2、OATP4)の転写制御に及ぼす影響を、マウス及びCAR発現培養細胞を用いて検討する。

3. NASH 臨床症例からの検討

群馬大学医学部付属病院肝臓代謝内科及びその関連施設で、登録されているNASH臨床症例の血液DNA及び肝臓組織の採取を用いて、CAR、PXR及び薬物代謝酵素群とNASHとの関連を検討する。

- NASH肝臓組織の免疫組織学的検討を行う。臨床例においてCAR、PXRの動態を免疫組織学的に検討する。
- 末梢血白血球より採取したDNAを用い、NASH症例においてCAR及びPXRのSNPの有無を検討する。
- 乳癌の治療薬であるTamoxifenは、ミトコンドリアの β 酸化を抑制しNASHを起こすとされている。乳癌症例を対象とし、NASHの発現頻度及び発症者と非発症者の差異を臨床病理学的に検討する。

4. 研究成果

1. PXR及びCARノックアウトマウスを用いた解析

(1) C3H/HeN系からC57BL/6N系へのマウスのバッククロス及びPXR、CAR double KOマウスの作成

NASHに疾患感受性の強いC57BL/6N系統のPXR及びCAR KOマウスを作成した。さらに、C57BL/6N系でPXR、CAR double KOマウスを作成した。

(2) 各KOマウスのMCD食によるNASHモデルでの比較検討

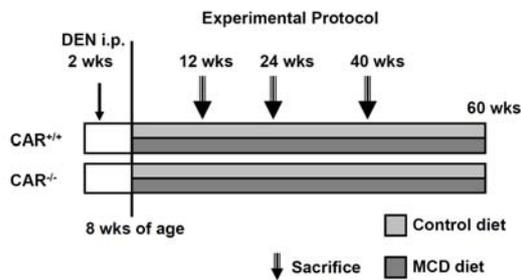
CAR KOマウスで、WTマウスに比べ有意に、血清ALT値及び肝臓組織への炎症細胞浸潤が軽く、肝臓組織中の過酸化脂質の上昇 (4-hydroxynonenal, F2-isoprostane) が軽かった。CARはNASHの増悪因子と考えられた。PXR KOマウスでは、WTマウスと比較してNASHの増悪は認められなかった。そのため、PXR、CAR double KOマウスでの解析は行わなかった。

(3) CAR KOマウスによるNASH発癌実験

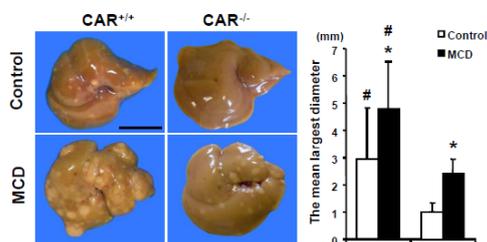
CAR KOマウスでは、長期飼育の結果として、肝臓の線維化がWTマウスで強いことを確認した。NASHも肝臓癌の原因となることから、NASHからの発癌へのCARの関与を検討した。生後2週目にDENでinitiationし、8週目からMCD食を開始し、12、24、40週で解剖し解析した (図1)。腫瘍発生数、最大腫瘍径ともにWTマウスではCAR KOマウスに比べ高く (図2)、生存期間も短かった (図3)。MCD食を投与したWTマウスでは、KOマウスに比べc-Mycの発現が有意に亢進し、腫瘍部では

さらに充進していた (図 4, 5)。CAR は細胞増殖を充進させることにより発癌に関与していることが示唆された。

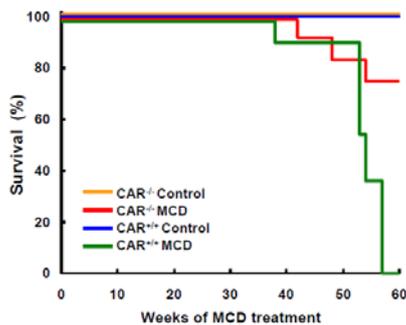
[図 1]



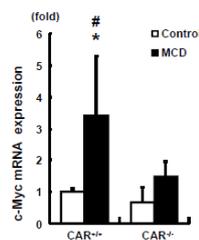
[図 2]



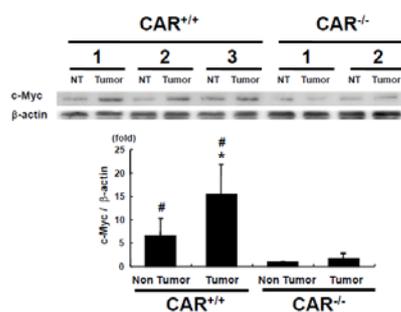
[図 3]



[図 4]



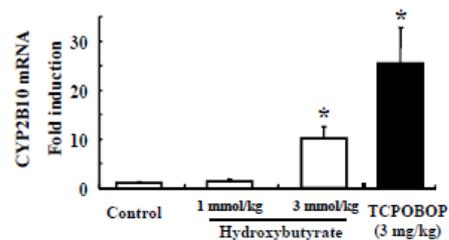
[図 5]



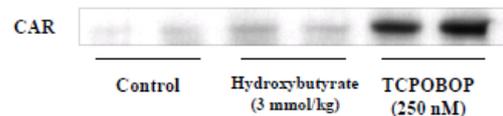
2. ケトン体の CAR への作用

MCD 食投与マウスでは、血中ケトン体(ヒドロキシ酪酸)濃度が上昇していた。ヒドロキシ酪酸の CAR 及び CAR 標的遺伝子の転写制御に及ぼす影響を、マウス及び培養細胞で解析した。ヒドロキシ酪酸は、CAR の転写活性を刺激することを確認した (図 6-8)。今後、さらに検討を進める予定である。

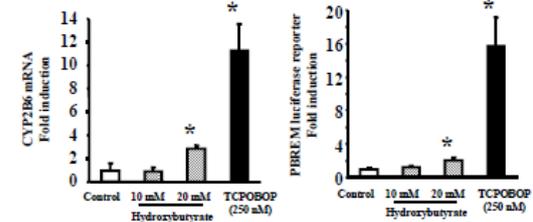
[図 6]



[図 7]



[図 8]



3. NASH 臨床症例からの検討

NASH 肝臓組織の免疫組織学的検討、NASH 症例における CAR 及び PXR の SNP、乳がん患者での薬物性 NASH の発現頻度及び発症者と非発症者の差異に関する検討は、今後継続して解析すべき課題である。

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 13 件)

- ① Takizawa D, Kakizaki S, et al. Constitutive active/androstane receptor promotes hepatocarcinogenesis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Carcinogenesis* 32: 576-83, 2011 査読有
- ② Kakizaki S, et al. Nuclear Receptors CAR and PXR; therapeutic targets for cholestatic liver disease. *Front*

- Biosci* 17: 2988-3003, 2011 査読有
- ③ Kamino H, Yamazaki Y, Saito K, Takizawa D, **Kakizaki S**, et al. Nuclear receptor CAR-regulated expression of the FAM84A gene during the development of mouse liver tumors. *Int J Oncol* 38: 1511-20, 2011 査読有
- ④ Takizawa D, **Kakizaki S**, et al. Histone deacetylase inhibitors induce cytochrome P450 2B by activating nuclear receptor constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:1493-8. 査読有
- ⑤ Tamura Y, Igarashi M, Suda T, Wakai T, Umemura T, Tanaka E, **Kakizaki S**, et al. Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein as a predictor of prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Dig Dis Sci.* 2010;55:2095-101. 査読有
- ⑥ **Kakizaki S**, et al. Xenobiotic-sensing nuclear receptors CAR and PXR as drug targets in cholestatic liver disease. *Curr Drug Targets.* 2009;10:1156-1163. 査読有
- ⑦ Suzuki H, Toyoda M, Horiguchi N, **Kakizaki S**, et al. Hepatocyte growth factor protects against Fas-mediated liver apoptosis in transgenic mice. *Liver Int.* 2009;29:1562-8. 査読有
- ⑧ **Kakizaki S**, et al. New insights on the xenobiotic-sensing nuclear receptors in liver diseases-CAR and PXR-. *Curr Drug Metab.* 2008;9:614-21. 査読有
- ⑨ Yamazaki Y, **Kakizaki S**, et al. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23:276-82 査読有
- ⑩ Sugatani J, Mizushima K, Osabe M, Yamakawa K, **Kakizaki S**, et al. Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression through distal and proximal promoter motifs: implication of defects in the UGT1A1 gene promoter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008;377:597-605. 査読有
- ⑪ Hagiwara S, Otsuka T, Yamazaki Y, Kosone T, Sohara N, Ichikawa T, Saruyama K, **Kakizaki S**, et al. Overexpression of NK2 promotes liver fibrosis in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Liver Int.* 2008;28: 126-31. 査読有
- ⑫ **Kakizaki S**, et al. Non alcoholic fatty liver disease in Japanese patients with severe obesity who received laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass

surgery (LRYGB) in comparison to non-Japanese patients.

J Gastroenterol. 2008;43:86-92. 査読有

- ⑬ Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, **Kakizaki S**, et al. Transforming growth factor-alpha accelerates hepatocyte repopulation after hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 ;23:260-6. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① Yamazaki Y, **Kakizaki S**, et al. Nuclear receptor CAR (NR1I3) is essential for DDC-induced liver injury and oval cell proliferation in mouse liver. The Liver Meeting 2011 (アメリカ肝臓学会) 2011年11月6日アメリカ合衆国・サンフランシスコ・モスコーンウエスト国際会議場
- ② Takizawa D, **Kakizaki S**, et al. Constitutive active/androstane receptor promotes hepatocarcinogenesis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. DDW2011 (アメリカ消化器病週間) 2011年5月10日 アメリカ合衆国・シカゴ・マコーミックプレース国際会議場
- ③ Ohyama T, Yamazaki Y, Sato K, Horiguchi N, Ichikawa T, **Kakizaki S**, et al. Transforming growth factor- α attenuates hepatic fibrosis: possible involvement of matrix metalloproteinase-1. DDW2011 (アメリカ消化器病週間) 2011年5月10日アメリカ合衆国・シカゴ・マコーミックプレース国際会議場
- ④ Yamazaki Y, Moore R, **Kakizaki S**, et al. Nuclear xenobiotic receptor CAR is essential for DDC to proliferate oval cells in mouse liver. 18th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2010年5月17日 中国・北京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿崎 暁 (KAKIZAKI SATORU)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：80344935

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

吉成 浩一 (YOSHINARI KOICHI)
東北大学・薬学研究科 (研究院)・准教授
研究者番号：60343399