

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20590777

研究課題名 (和文) 糖鎖技術を用いた新しい NASH の病態解析

研究課題名 (英文) Analysis of NASH pathophysiology using glycobiological technique

研究代表者

平松 直樹 (HIRAMATSU NAOKI)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30362700

研究成果の概要 (和文)：

C 型、B 型慢性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は肝硬変、肝細胞ガンへと進展しうる疾患である。我々は糖鎖技術を用いて NASH を含む慢性肝炎の病態解析を行ってきた。N-アセチルグルコサミン転移酵素 V (GnT-V) は正常肝臓ではほとんど発現しないが慢性肝炎において発現上昇する糖鎖転移酵素である。GnT-V トランスジェニックマウスを用いて GnT-V が肝炎、肝線維化、肝臓へのコレステロール沈着を抑制することを明らかとした。(213 文字)

研究成果の概要 (英文)：

N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V), catalyzing beta1-6 branching in asparagine-linked oligosaccharides, is known to promote cancer metastasis, and its expression is increased in chronic hepatitis (CH) progression. Using GnT-V transgenic (Tg) mice, we found GnT-V prevented hepatic inflammation and fibrosis in a mouse CH model through modulation of lymphocyte and HSC function. Moreover, we also found GnT-V prevented hepatocyte cholesterol accumulation which led to ameliorate hepatocyte sensitivity to inflammation. These results indicated expression of GnT-V in CH would prevent disease progression as a self-defense reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

慢性肝炎は肝硬変から肝細胞ガンへと進展しうる疾患である。我々は糖鎖に関与する遺伝子改変マウスの解析から糖鎖異常が慢性肝炎進展に寄与していることを見いだしてきた。中でも N-アセチルグルコサミン転移酵

素 V (GnT-V) は、様々な growth factor シグナルを増強することで癌の転移を促進することが知られている。GnT-V は正常の肝臓ではほとんど発現しないが、慢性肝炎や肝再生時に発現が上昇する。しかし、慢性肝炎時に上昇する GnT-V の生理学的意義は未だ解明さ

れていなかった。

2. 研究の目的

糖鎖技術を用いて慢性肝炎の病態を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

GnT-V トランスジェニック (Tg) マウスを用いて高脂肪高コレステロール (HFHC) 食投与マウス慢性肝炎モデルで野生型 (WT) マウスと比較検討を行った。このモデルは非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルとしてマウス実験に用いられるモデルである。HFHC 食のマウスへの投与により肝臓へのコレステロールをはじめとした脂質の沈着と炎症性細胞浸潤、肝線維化を認める。まず肝臓組織、血液データを比較検討した。次にそれぞれのマウスより脾細胞リンパ球を分離し、抗 CD3/28 抗体刺激によるサイトカイン分泌を比較検討することでリンパ球に対する GnT-V の役割を検討した。またマウス肝臓から肝線維化に重要な役割を果たしている肝星細胞をそれぞれのマウスより分離し、in vitro での検討も行った。

また脂肪酸の肝細胞への影響を検討するために飽和脂肪酸であるパルミチンと不飽和脂肪酸であるオレイン酸をマウス肝癌細胞株 Hepa1-6 細胞に投与し、比較検討を行った。

4. 研究成果

GnT-V Tg マウス及び野生型 (WT) マウスに HFHC 食餌を 4 週間負荷したところ WT マウスでは著明なリンパ球浸潤を伴った肝炎像が見られたが GnT-V Tg マウスではほとんど炎症を認めなかった。また肝臓の線維化も GnT-V Tg マウスで有意に軽減していた。続いて GnT-V の肝炎抑制作用の機序を検討するために GnT-V Tg マウスおよび WT マウスから脾細胞を分離し、抗 CD3/28 抗体刺激後のサイトカイン産生能を ELISA で検討した。GnT-V Tg マウス由来の脾細胞は WT マウス由来の脾細胞に比べ、Th2 型サイトカインである IL-10 や IL-13 の産生が亢進し、逆に Th1 型の IFN- γ や IL-6 産生は低下していた。Th2 シフトが GnT-V Tg マウスの肝臓の炎症を抑制したものと考えられた。次に肝線維化の中心的役割を担う肝星細胞 (HSC) を用いて GnT-V の肝線維化に対する役割を検討した。GnT-V Tg マウスおよび WT マウスから肝星細胞を分離 (Tg-HSC, WT-HSC) し比較検討した。驚くべきことに Tg-HSC では TGF- β 受容体発現が増加し、TGF- β シグナルの増強が認められたにもかかわらず collagen I α I の遺伝子発現の抑制がみられた。DNA アレイの結果、Tg-HSC で COX2 発現が著明に増加していることがわかった。COX2 の産生物であるプロスタグラン

ディン E2 はコラーゲン産生抑制作用を有し、その産生が Tg-HSC で著明に増加していた。COX2 の選択的阻害薬であるセレコキシブにより Tg-HSC のコラーゲン発現は増加した。HFHC 食投与マウスでは肝臓コレステロール含量がノーマル食投与マウスに比べ上昇していたが Tg マウスでは WT マウスに比べその含量が有意に低下していた。コレステロール代謝関連遺伝子の解析により Tg マウスではコレステロールのクリアランスが上昇している可能性が示唆された。コレステロールの細胞内過剰蓄積は炎症に対する感受性を高め細胞障害が起りやすくなることが知られている。Tg マウスでは過剰なコレステロール蓄積を抑制することで肝細胞傷害を防御している可能性が考えられた。以上の結果から GnT-V は炎症抑制作用だけでなく、肝星細胞に対する直接作用も有し、肝線維化を抑制したと考えられた (以上の成果は現在論文投稿中)。

マウス肝癌細胞 Hepa1-6 の培養液中に、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸を添加したところ、前者において細胞死の誘導がより強く見られた。このとき、両者の細胞で誘導される遺伝子を、糖鎖遺伝子のアレイで解析したところ、興味あることに約 2,500 掲載されている遺伝子の中で有意に変化したものは MCP-1

(Monocyte Chemotactic Protein-1) のみであった。MCP-1 は単球の走化性因子として同定されたが、その後、単球活性化因子や好塩基球による化学伝達物質の遊離促進、T 細胞走化性活性等が報告されている。現在さらなる解析を行っている。

代表者である平松は、専門領域であるウイルス肝炎の研究で後述のような多くの論文実績をあげている。これは、ひとえに阪大関連病院からの臨床サンプルとデータを供与してもらったおかげである。NASH に関しても、臨床サンプルは着実に収集されてきている。今回の研究で得た GnT-V や MCP-1 の基礎実験データを、これらの臨床サンプルを用いて解析予定である。

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 16 件)

- ① Hiramatsu N (1 番目), Kurosaki M et al. , Pretreatment Prediction of Anemia Progression by Pegylated interferon Alpha-2b Plus Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C Infection: Decision-Tree Analysis. , J Gastroenterol, 2011 in press、査読有り
- ② Oze T, Hiramatsu N (2 番目), et al. ,

- Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.、J Gastroenterol、2011 in press、査読有り
- ③ Oze T, Hiramatsu N (2 番目), et al.、The efficacy of extended treatment with pegylated interferon plus ribavirin in patients with HCV genotype 1 and slow virologic response in Japan.、J Gastroenterol.、2011 in press、査読有り
- ④ Oze T, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy. J Hepatol.、54(4)、604-11、2011、査読有り
- ⑤ Inoue Y, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated by peginterferon and ribavirin therapy.、J Med Virol.、83(3)、419-27、2011、査読有り
- ⑥ Matsumoto H (1 番目), Miyoshi E (2 番目), et al.、Clinical application of a lectin-antibody ELISA to measure fucosylated haptoglobin in sera of patients with pancreatic cancer.、Clin Chem Lab Med.、48(4)、505-12、2010、査読有り
- ⑦ Miyoshi E (1 番目), Shinzaki S, Moriwaki K, Matsumoto H (4 番目)、Identification of fucosylated haptoglobin as a novel tumor marker for pancreatic cancer and its possible application for a clinical diagnostic test.、Methods Enzymol.、478、153-64、2010、査読有り
- ⑧ Hikita H, Hiramatsu N (13 番目), et al.、The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib.、Hepatology、52(4)、1310-21、2010、査読有り
- ⑨ Inoue Y, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses.、J Viral Hepat.、17(5)、336-44、2010、査読有り
- ⑩ Ezaki H, Matsumoto H (6 番目), et al.、Delayed liver regeneration after partial hepatectomy in adiponectin knockout mice.、Biochem Biophys Res Commun.、378(1)、68-72、2009、査読有り
- ⑪ Fukushima J, Matsumoto H (3 番目), et al.、Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization.、Hepatology Res.、39(7)、724-38、2009、査読有り
- ⑫ Kurashige N, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternately and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir.、Antivir Ther.、14(6)、873-7、2009、査読有り
- ⑬ Kurashige N, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance.、J Gastroenterol.、44(8)、864-70、2009、査読有り
- ⑭ Kurokawa M, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis.、Hepatology Res.、39(5)、432-8、2009、査読有り
- ⑮ Hiramatsu N (1 番目), Oze T, et al.、Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin.、J Viral Hepat.、16(8)、586-94、2009、査読有り
- ⑯ Oze T, Hiramatsu N (2 番目), et al.、Peginterferon alfa-2b affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin.、J Viral Hepat.、16(8)、578-85.、2009、査読有り

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 平松直樹、“難治性C型肝炎に対する新薬開発を踏まえたPeg-IFN/Ribavirin併用療法の適応と限界” パネルディスカッション「C型肝炎に対する新たな治療戦略」、JDDW2010 (第 18 回日本消化器関

連学会週間)、2010年10月13日、パシ
フィコ横浜

- ② 平松直樹、“難治性C型肝炎に対する
Peg-IFN/Ribavirin併用療法の個別化治
療による治療効果改善の可能性” シン
ポジウム「C型肝炎における抗ウイル
ス療法の近未来」、第46回日本肝臓学会
総会、2010年5月27日、ホテルメトロ
ポリタン山形
- ③ 森華奈子、三善英知、糖転移酵素N-アセ
チルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)は
肝線維化を抑制する、第46回日本肝臓
学会総会、2010年5月27日、ホテルメ
トロポリタン山形
- ④ 小瀬嗣子、平松直樹、C型慢性肝炎に対
するpeg-IFN+RBV併用無効例に対する方
策 難治性C型肝炎に対するPeg-IFN/RBV
併用療法における非著効例への方策
多施設(OLF)共同研究(会議録)、第13回
日本肝臓学会大会、2009年10月15日、
国立京都国際会館
- ⑤ 平松直樹、C型肝炎に対する治療方針の
コンセンサス、第45回日本肝臓学会総
会、2009年6月5日、神戸国際会議場
- ⑥ 森華奈子、三善英知、糖転移酵素N-アセ
チルグルコサミン転移酵素V(GnT-V)は
肝星細胞におけるコラーゲンIの遺伝子
発現を抑制する、第45回日本肝臓学会
総会、2009年6月5日、神戸国際会議場

[図書] (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 直樹 (HIRAMATSU NAOKI)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：30362700
(H20 研究分担者、H21～研究代表者)

松本 仁 (MATSUMOTO HITOSHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：80467505
(H20 まで研究代表者)

(2) 研究分担者

三善 英知 (MIYOSHI EIJI)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20322183

(3) 連携研究者

なし