

機関番号：37116

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590798

研究課題名 (和文) 肝細胞マロリー体の形成、分解機構とその細胞生物学的意義

研究課題名 (英文) Mechanisms of Mallory body formation and elimination in hepatocytes

研究代表者

原田 大 (HARADA MASARU)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：00241175

研究成果の概要 (和文)：肝細胞内封入体である Mallory-Denk 体 (MDB) の形成に蛋白分解系の異常が関与していた。また細胞の蛋白分解系にはオートファジーとプロテアソームが存在するが、この両方が MDB の形成に関与していた。MDB の形成には小胞体ストレスや酸化ストレスが関与しており、MDB 形成はそれらに対する反応と考えられた。またオートファジーの調節により MDB 形成を抑制することが可能であり、オートファジーの調節は細胞内封入体の関与する疾患の治療となり得る可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：Formation of Mallory-Denk bodies (MDB) was associated with abnormality of the intracellular protein degradation system. Both proteasome and autophagy were associated with MDB formation. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress were related with MDB formation. MDB formation may be an adaptive response to these stresses. Modulation of autophagy was one of the therapeutic strategies of inclusion body-associated diseases including various liver diseases.

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	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝炎、慢性胆汁うっ滞、ウイルソン病や肝細胞などの肝疾患において細胞内に Mallory-Denk 体 (MDB) と称される封入体が形成される。同様の細胞内封入体はパーキンソン病、アルツハイマー病やハンチントン舞踏

病のような神経変性疾患にも観察される。しかし、これらの構造物の意義、形成機構や分解機構は明らかではない。

2. 研究の目的

MDB 形成の意義、形成機構と分解機構を明らかにし、この構造物の関与する疾患の病態

を理解するとともに新たな治療法の開発に応用する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を使用した研究

培養肝癌細胞にプロテアソーム阻害剤を投与して異常蛋白の分解を阻害した。その状態の細胞の小胞体ストレス、酸化ストレス、オートファジー、アポプトーシスの状態と MDB の形成をウエスタンブロット、蛍光抗体法、GFP-LC3 の遺伝子導入や電子顕微鏡で観察した。オートファジーの状態を 3 メチルアデニン、beclin 1 siRNA、ラパマイシンやトレハロースで調節し、その影響を観察した。

(2) マウスを使用した研究

コントロールマウスとケラチン 8 (K8) トランスジェニックマウスを使用した。MDB の誘導には 3, 5-diethoxycarbonyl-1, 4-dihydrocollidine (DDC) とプロテアソーム阻害剤の bortezomib を使用した。MDB の形成と肝障害の程度は HE 染色、ケラチンとユビキチンの蛍光抗体法、電顕ならびに免疫電顕にて検討した。ユビキチン化蛋白の蓄積やオートファジーの状態はウエスタンブロットにも検討した。またラパマイシンやトレハロースによるオートファジーの調節の影響を検討した。

(3) ヒト肝組織を使用した研究

診断のために行った肝生検組織を使用した。K8/18、ユビキチンならびに p62 の免疫染色により MDB を同定した。MDB と小胞体ストレス、酸化ストレス、オートファジーならびにアポプトーシスの関連を免疫染色にて検討した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を使用した研究

培養肝癌細胞においてプロテアソームの

阻害による細胞障害(ユビキチン化蛋白の蓄積、XBP1 にて解析した小胞体ストレス、HNE により解析した酸ストレス、ケラチン 18 にて解析したアポプトーシス)を引き起こす。オートファジーを亢進させるラパマイシンがこれらの細胞障害を抑制することを明らかとした。また、トレハロースが培養肝癌細胞において beclin1 の発現亢進を介してオートファジーを亢進させることを明らかとし、培養細胞でのプロテアソーム阻害による様々な障害(ユビキチン化蛋白の蓄積、XBP1 にて解析した小胞体ストレス、HNE により解析した酸ストレス、ケラチン 18 にて解析したアポプトーシス)を改善させることを見出した。

(2) マウスを使用した研究

DDC を用いたマウス肝障害モデルにおいて小胞体ストレスと酸化ストレスがその病態に関与していることを明らかとした。プロテアソーム阻害剤モデルと DDC モデルにおけるユビキチン化蛋白の蓄積ならびに MDB の形成がラパマイシンによるオートファジーの亢進にて抑制されることを見出した。

(3) ヒト肝組織を使用した研究

ウイルス性肝炎でも C 型肝炎では MDB が多く見られ、B 型肝炎では少ないこと。また細胞増殖能が B 型肝炎で強いことなど両者に様々な違いがあり病態に差があることが明らかとなった。

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 27 件)

1. ○Harada M, Miyagawa K, Honma Y, Hiura M, Shibata M, Matsushashi T, Abe S, Harada

R, Tabaru A. Excess copper chelating therapy for Wilson disease induces anemia and liver dysfunctions. Intern Med (in press). (査読有り)

2. Yamamoto K, Hiura M, Tabaru A, Honma Y, Narita R, Abe S, Shimajiri S, Okamoto K, Yamaguchi K, ○Harada M. Rapid progression of hepatocellular carcinoma in a patient with autoimmune hepatitis. Intern Med (in press). (査読有り)

3. Honma Y, ○Harada M, Sato M, Katsuki Y, Hiura M, Shibata M, Narita R, Harada R, Abe S, Tabaru A, Tajiri N, Simajiri S. Late diagnosed Wilson disease with hepatic and neurological manifestations. Hepatol Res 2011;41:270-276. (査読有り)

4. Yanagimoto C, ○Harada M, Kumemura H, Abe M, Koga H, Sakata M, Kawaguchi T, Terada K, Hanada S, Taniguchi E, Ninomiya H, Ueno T, Sugiyama T, Sata M. Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann-Pick C1 protein. Hepatol Res (in press). (査読有り)

5. ○Harada M. Autophagy is involved in the elimination of intracellular inclusions, Mallory-Denk bodies, in hepatocytes. Med Mol Morphol 2010;43:13-18. (査読有り)

6. ○原田 大. 肝細胞Mallory-Denk体の細胞生物学的意義. Medical Review 2010;55:268-269. (査読無し)

7. ○Harada M, Hanada S, Toivola DM, Ghori N, Omary MB. Autophagy activation by rapamycin eliminates mouse Mallory-Denk bodies and blocks their proteasome inhibitor-mediated formation. Hepatology 2008;47:2026-2035. (査読有り)

8. ○Harada M, Strnad P, Toivola DM, Omary

MB. Autophagy modulates keratin-containing inclusion formation and apoptosis in cell culture in a context-dependent fashion. Exp Cell Res 2008;314:1753-1764. (査読有り)

9. Strnad P, Tao GZ, Zhou Q, ○Harada M, Toivola DM, Brunt EM, Omary MB. Keratin mutation predisposes to mouse liver fibrosis and unmasks differential effects of the CCl4 and thioacetamide models. Gastroenterology 2008;134:1169-1179. (査読有り)

10. Kumemura H, ○Harada M, Yanagimoto C, Koga H, Kawaguchi T, Hanada S, Taniguchi E, Ueno T, Sata M. Mutation in keratin 18 induces mitochondrial fragmentation in liver-derived epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 2008;367:33-40. (査読有り)

[学会発表] (計 120 件)

1. ○Harada M. Phosphorylation of keratin 8 is important for Mallory Denk-body formation and protection of hepatocytes. Miami Clinical Exchange Program. Liver disease in Japan and USA 2010年3月16日 Miami

2. ○Harada M. Proteasome inhibition induces Mallory-Denk body in susceptible mice and it is prevented by activation of autophagy. The 9th JSH single topic conference NASH 2010 2010年11月19日 東京

3. 花田慎一郎、○原田 大、Snider, N. Brunt E、鳥村拓司、上野隆登、佐田通夫、Omary B. DDC投与マウスモデルにおける Mallory-Denk Body形成と性差. 第42回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2010年9

月 24 日 静岡

4. ○ 原田 大. 肝細胞内封入体 Mallory-Denk 体の細胞生物学的意義と分解機構. 第 42 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会 2010 年 9 月 24 日 静岡

5. 花田 慎一郎、○原田 大, Snider, N., Brunt, E., Hollenberg, P., 佐田 通夫、Omary. B. DDC 投与マウスモデルにおいて性差が Mallory-Denk Body 形成に与える影響について 第 14 回日本肝臓学会大会 2010 年 10 月 14 日 横浜

6. ○原田 大, 佐田 通夫:
封入体関連疾患のオートファジー調節による新しい治療戦略 第 1 回福岡県医学会総会 2009 年 1 月 25 日 福岡

7. ○原田 大. 肝細胞での Mallory-Denk body 形成におけるケラチン 8 ならびにそのリン酸化の役割 第 45 回日本肝臓学会総会 2009 年 6 月 4 日 神戸

8. ○原田 大. Mallory-Denk 体の細胞生物学的意義 第 25 回九州肝臓談話会 2009 年 9 月 5 日 熊本

9. ○原田 大, 本間雄一, 佐藤みゆき, 香月友香. 肝細胞の Mallory-Denk 体形成におけるケラチン 8 リン酸化の意義. 第 17 回浜名湖シンポジウム 2009 年 12 月 22 日 浜松

10. ○Harada M, Sata M. Autophagy is involved in elimination of components of Mallory-Denk bodies in two different types of mouse models. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2008 年 11 月 1 日 San Francisco

11. ○原田 大. Mallory-Denk 体形成におけるプロテアソーム、オートファジーの関与. 第 44 回日本肝臓学会総会 2008 年 6 月 5 日 松山

12. ○原田 大. オートファジーはプロテア

ソームの機能異常による Mallory-Denk 体の形成を抑制する. 第 40 回日本臨床分子形態学会 2008 年 10 月 3 日 福岡

13. ○原田 大, 佐田通夫. プロテアソームの機能障害による Mallory-Denk 体の形成をオートファジーは抑制する. 第 16 回浜名湖シンポジウム 2008 年 12 月 21 日 静岡

[図書] (計 16 件)

1. 原田 大, 本間雄一, 日浦政明. 日本メディカルセンター 肝疾患 Review 2010-2011 2010:236-239.

2. 原田 大, 本間雄一, 佐藤みゆき, 香月友香. アークメディア 分子標的薬 2010:167-168.

3. 原田 大. アークメディア 消化器疾患におけるエピゲノミクスとゲノミクス 2009:171-175.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 大 (HARADA MASARU)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00241175