

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08302

研究課題名（和文）転写共役活性化因子PDIP1による普遍的酸化ストレス調節能の検証と標的分子探索

研究課題名（英文）Verification of universal oxidative stress regulation ability by transcriptional coactivator PDIP1 and search for target molecules

研究代表者

佐藤 賢（Ken, Sato）

群馬大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40396619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルコール性肝炎モデルで、PDIP1ノックアウト（KO）マウスと野生型（WT）マウスとの比較実験を行った。血液生化学検査では、KOマウスはWTマウスと比べて、ALPとTGが有意に低下していたが、ALTやAST及び総ビリルビンなどで差が見られなかった。そのため、アルコール負荷及び非アルコール負荷のWTマウスでの影響の比較を検討したところ、ALPとコレステロールはアルコール負荷マウスの方が有意に低値であった一方、AST、ALT、ビリルビン、TGなどは有意な差を認めず、実験系の確立不十分の可能性が考えられた。病理組織学的検討では、アルコール性肝炎モデルでWTとKOマウスで明らかな差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果に関しては、残念ながらpreliminaryな結果となっており、今回の結果は、実験系の確立には至っていない可能性を示唆しています。研究テーマの真の結果を求めるには、再実験で、実験の条件などの変更等を行っていく必要があり、実験の難しさを痛感しました。学術的意義や社会的意義に関しては再実験の結果論文等で今後明らかにできれば幸いです。

研究成果の概要（英文）：We compared PDIP1 knockout (KO) mice with wild type (WT) mice in an alcoholic hepatitis model. Blood biochemical tests showed that serum ALP and TG levels were significantly lower in KO mice than in WT mice, but there were no differences in serum ALT, AST, total bilirubin levels, and so on between them. Therefore, we compared the effects of alcohol-loaded and alcohol-unloaded WT mice to check the quality of our experiment. Then, we found that serum ALP and cholesterol levels were significantly lower in alcohol-loaded mice, while serum AST, ALT, bilirubin, TG levels, and so on were not significant different between them, which suggests that the experimental system may have been insufficiently established. Histopathological examination revealed no obvious difference between WT and KO mice in the alcoholic hepatitis model.

研究分野：消化器内科学

キーワード：PDIP1 転写共役活性化因子 アルコール性肝炎 ノックアウトマウス 酸化ストレス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは、細胞分化にも関わる核内受容体 PPAR に結合する新規の転写共役活性化因子として PDIP1 (PPAR DBD-interacting protein1) を同定した。転写共役因子は、生体内エネルギー代謝の「スイッチ」や「センサー」として働くことが注目されている。PDIP1 の欠損マウス(KO マウス)では、高脂肪食負荷による脂肪肝形成が著明に抑制され、申請者は、KO マウスが非アルコール性脂肪肝炎や肝線維症や肝発癌の発症に耐性を示すことを見出した。その機構として KO マウスでは酸化ストレスの軽減が示されたが、PDIP1 の酸化ストレス抑制の詳細な分子機構は不明である。一方、アルコール性肝炎は飲酒継続により発症する予後不良の疾患である。禁酒が困難な場合が多く、かつ、禁酒でも病態の進展を止められず、治療法は確立されていない。また病態の一つとして酸化ストレスが重要である。

2. 研究の目的

そこで、今までの研究で検討していない肝疾患モデルで、かつ治療法の喫緊の開発が急務であるアルコール性肝炎のモデルマウスを用い、本研究は主要評価として、PDIP1 の酸化ストレス調節機構の普遍性を検証し、副次的評価として、PDIP1 と酸化ストレスを繋ぐ標的分子を発見し、候補分子の中から、アルコール性肝炎に対する治療候補分子を決定する予定であった。

3. 研究の方法

1. アルコール性肝炎モデルの作成と実験系の確立

各群 10 匹で行い、コントロール食と目的食で KO マウスと野生型 (WT) マウスの 2 群に処置するため、計 4 群での比較対照実験を行った。マウスは 8 週齢の雄の C57B6/J を用いた。アルコール含有液体飼料と、同等のカロリーでアルコールをデキストリンに置換した液体飼料を投与した。アルコール投与に関しては、まず 0% のアルコール濃度から始めて、1% ずつ 1 日で濃度を上げて慣らし、5% の濃度で 4 週間投与して解剖し解析を行った。

2. PDIP1 KO マウスのアルコール性肝炎における表現型とメカニズムの検討

KO と WT マウスで、表現型 (肝酵素、血清・肝脂質、肝組織など) の差を明らかにする。次にメカニズムとして、酸化ストレス評価: reactive oxygen species (ROS) や GSH などの酸化ストレスマーカーを肝組織と血清で mRNA 発現、Western Blot で測定し、次に活性酸素の産生系 (NOX など) 及び消去系のマーカー (superoxide dismutase など) の発現や活性を測定する。

炎症評価: IL-6 や TNF などの炎症性 cytokine による免疫染色、mRNA 発現、Western Blot による蛋白定量、アポトーシス評価: TUNEL 染色、小胞体ストレス評価: PKR-like ER kinase (PERK) 抗体、caspase 抗体などによる免疫染色や Western Blot による蛋白定量などを行う予定であった。

KO マウスで、表現型の改善や酸化ストレス軽減が見られた場合、検証実験として下記の実験 3. KO マウスと酸化ストレス関連のシグナル伝達経路の解析等を予定していた。

4. 研究成果

アルコール性肝炎モデルの作成及び実験系の確立準備はできたものの、KO マウスの繁殖力の低下により実験に必要なマウスの必要な匹数の十分な確保ができず、コロナ禍による研究環境の悪化やマンパワー不足によって実験の停滞を余儀なくされた。その後 KO マウ

スの繁殖を粘り強く進め、実験に必要な KO マウスの匹数と対照群である WT マウスの匹数を揃えて実験を開始することができた。

アルコール性肝炎を惹起する条件で、KO マウスと WT マウスとの比較の本実験を行った。血液生化学検査では、アルコール性肝炎モデルでは、KO マウスは WT マウスと比べて、ALP と TG がそれぞれ $P = 0.045$ と $P = 0.030$ で有意に低下していた。



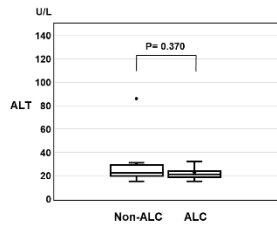
しかし、ALT や AST 及び総ビリルビン値などで差が見られず (ALT の結果を参考までに添付) 血糖は、KO マウスの方が WT マウスより $P = 0.019$ で有意に高いという結果が得られた。



しかし、ALT や AST で差が見られていないことから、アルコール負荷及び非アルコール負荷の WT マウスでの影響の比較を検討したところ、ALP とコレステロールはそれぞれ $P = 0.021$ 及び $P < 0.001$ でアルコール負荷マウスの方が有意に低値であった。



一方、AST や ALT、ビリルビン、TG などは有意な差を認められなかった (ALT の結果を参考までに添付)。

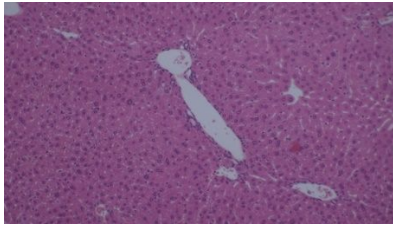


したがって、本実験では、アルコール性肝炎モデルとして有効な実験系の確立が失敗した可能性がある。

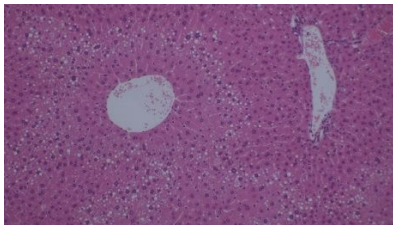
また、本実験でのマウスの病理組織学的な検討を行ったが、アルコール性肝炎モデルの WT と KO マウスでは、各群内における組織の脂肪沈着の程度などに個体差が著明であり、両群間で明らかな差を認められなかった。以下代表的な組織標本を提示する。

①アルコール性肝炎モデルの WT マウス

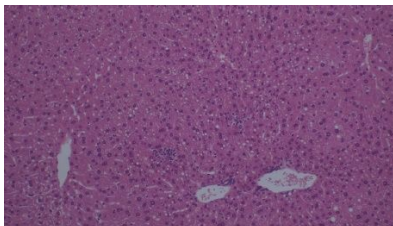
個体番号 1 脂肪沈着の程度は極めて少ない。



個体番号 2 小脂肪滴の浸潤が中等度に認められる。

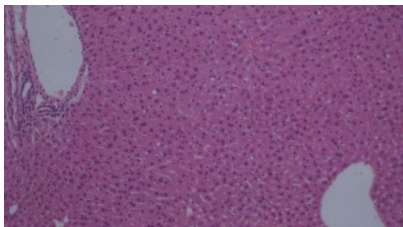


個体番号 3 小 中脂肪滴の浸潤が軽度認める。小壊死巣も認められる。

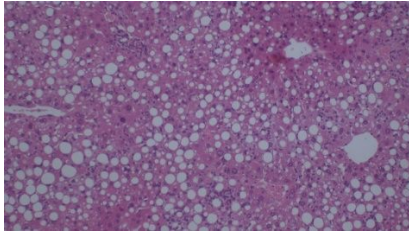


②アルコール性肝炎モデルの KO マウス

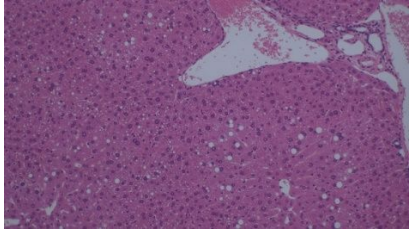
個体番号 1 脂肪沈着の程度は極めて少ない。



個体番号 2 中 大脂肪滴の浸潤が著明で、核の大小不同や小壊死巣も認める。



個体番号 3 中脂肪滴の浸潤は軽度である。

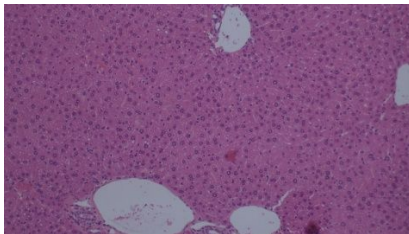


以上のように個体間の脂肪沈着等の差が大きく、アルコール性肝炎モデルにおける WT と KO マウスの明らかな差を見出すことは困難であった。

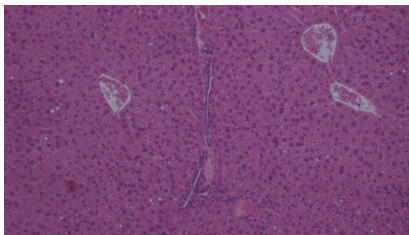
次に、WT マウスにおいてアルコール負荷の影響が非アルコール負荷と比べて明らかであるか病理組織でも検証した。

③非アルコール負荷の WT マウス (①との比較のため)

個体番号 1 脂肪沈着の程度は極めて少ない。



個体番号 2 極小 小脂肪滴の沈着を軽度認める。



WT マウスのアルコール負荷①と非アルコール負荷③の比較では、①のマウスの中には脂肪沈着や炎症など目立つものもあるが、グループとして評価した場合には、群内の個体差のばらつきが大きく、①と③が明らかな差があるとは判定しにくいと思われた。

したがってこの実験では、表現型に明らかな差を見出すことができず、実験精度などなんらかの技術的問題が発生している可能性が示唆された。したがって、次のメカニズム解析に進むことが現時点ではできない状況である。アルコール肝炎モデルの再確立から再度行い、血液生化学的検査でアルコール負荷及び非アルコール負荷の WT マウスで確実に差が出た条件で再度本実験を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山崎 勇一 (Yuichi Yamazaki) (00582404)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	堀口 昇男 (Norio Horiguchi) (10550022)	群馬大学・大学院医学系研究科・講師 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関