

## 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 5月 1日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21300275

研究課題名（和文）機能性食品の転写因子賦活化による生活習慣肝疾患の進展と発癌に対する新しい予防

研究課題名（英文）Novel prevention of development of life style-related liver diseases and liver carcinogenesis through an activation of transcription factor induced by functional foods.

研究代表者 宇都宮 洋才（Hirotohi Utsunomiya）

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60264876

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスに対して生体防御機構を発動する転写因子 Nrf2 に着目し、メチオニンコリン欠乏（MCD）食誘発性 NASH モデルにおいて、Nrf2 が肝病変の発症と進展を防御することを検討した。Nrf2 は MCD 誘発性 NASH の発症と進展に対して、解毒と酸化ストレス消去系分子の発現誘導を介して、抑止的役割を果たしていると推測された。Nrf2 は NASH 治療における重要な分子標的の一つであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Nrf2 is a transcription factor that exerts an in vivo defense mechanism against oxidative stress. Therefore, we studied whether Nrf2 inhibits onset and progression of NASH in the animal model of NASH induced by a methionine- and choline-deficient (MCD) diet. Nrf2 has an inhibitory effect against the onset and progression of MCD-induced NASH through the induction of detoxifying and antioxidative stress gene molecules. It is suggested that Nrf2 is an important target for the treatment of NASH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,380,000	28,470,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：健康応用科学

キーワード：生活習慣病，脂肪性肝炎，肝発癌，機能性食品，転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では肥満者の約3割は非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD）と称される脂肪肝を伴う慢性肝障害に罹患している。NAFLDの一部は非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis: NASH）に移行する。NASHは進行性であり、脂肪肝から肝硬変、さらには肝癌にまで進行する致死的疾患群である。本邦においてもメタボリック症候群の増加に伴い NASH 予防の重要性が認識されている。

NASH の発症は、NAFLD（first hit に相当）に NASH を発症させる因子あるいは障害（second hit として酸化ストレス、脂肪過酸化、エンドトキシン等）が生体に加わることにより引き起こされる。

一方、転写因子 Nrf2 の役割は、同遺伝子欠損マウスの解析より、生体への侵害刺激に対して生体が発動する抗酸化ストレス防御機構を制御する司令塔的因子である。脂質代謝に関連して、Nrf2 は高脂肪食による肝脂肪蓄積を抑止する作用も見出されている。最近、

連携研究者の山本らは、Nrf2 は自然免疫系の活性化を調節する因子でもあり、レドックス状態に関する恒常性の維持ならびに活性化された炎症性サイトカイン産生経路の抑制を司る因子であることを明らかにした。

近年では予防医学という言葉が注目され、日常の食生活を改善することより種々のストレスより生体を保護し、疾病を回避する考え方である。米国の国立がん研究所の研究成果により、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンには、肝臓の解毒作用を高める働きがあることが判明した。スルフォラファンは生体の酸化ストレス応答能を強化する点より、肥満関連肝疾患の予防医学に有用な機能性食品と位置図けることが出来る。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)野生マウス、Nrf2 遺伝子欠失マウス、Keap1 遺伝子欠失マウスに MCD 食を投与する。NASH の重要な肝組織学的変化について、それらの出現時期と程度の観点より比較し、Nrf2 が NASH の発生と進展に対する抑制因子であるかを明らかにする。(2)上記の NASH モデルにおいて、感受性を示すと予想される Nrf2 遺伝子欠失マウスと、一方、抵抗性を示すと予想される Keap1 遺伝子欠失マウスの肝標本について、Nrf2 が誘導する抗酸化防御系の発動と自然免疫系の活性化の抑止に関する分子機構について明らかにする。(3) NASH の予防と治療の立場より、野生と Nrf2 遺伝子欠失マウスに対し、Nrf2 賦活化を誘導するスルフォラファンを経口投与し、Nrf2 介在性に NASH の発生と進展が抑止されるかを判定する。(4)スルフォラファンの抑止効果が認められた場合には、抗酸化防御系の発動と自然免疫系の活性化に対する修飾の観点よりそれらの分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### MCD 食誘発性 NASH の発症と進展に対する転写因子 Nrf2 の抑止作用

8 週齢雄性的野性型、Nrf2 遺伝子欠失型、Keap1 遺伝子欠失型 (Nrf2 過剰発現型) に対して、MCD 食を 3 週間、6 週間、13 週間の経口投与を行い、マウス NASH 病態モデルを作製する。対照は通常食投与とする。投与後にジエチルエーテル麻酔下にて犠牲死させ血液および肝臓標本を採取し実験に供した。得られた生体試料に関して、(a) 病理組織標本の解析、(b) 脂肪代謝、炎症および線維化に関する各因子発現レベルの解析、(c) 血液標本の解析、(d) 自然免疫系活性化に関する解析、(e) 酸化ストレス障害に関する項目の解析を行った。

### スルフォラファンによる Nrf2 賦活化と NASH の発症と進展の抑止

MCD 食を投与した野生と Nrf2 遺伝子欠失マウスに対して、Nrf2 賦活化を誘導するスルフォラファンを 13 週間経口摂取させ、両マウスの肝標本の比較により、Nrf2 介在性に NASH 発生・進展の抑止効果が実現可能であるどうかについて (a) 病理組織標本の解析、(b) 脂肪代謝、炎症および線維化に関する各因子発現レベルの解析、(c) 血液標本の解析、(d) 自然免疫系活性化に関する解析、(e) 酸化ストレス障害に関する項目の解析を行った。NASH の予防と治療の立場より、スルフォラファンによる Nrf2 を賦活化の分子機構を解明し、スルフォラファンが NASH の発生と進展に対して抑止効果を発揮するかを判定した。

## 4. 研究成果

### MCD 食誘発性 NASH の発症と進展に対する転写因子 Nrf2 の抑止作用

野生型と比較して、Keap1 遺伝子欠失型では 6 および 13 週間投与のいずれにおいても、脂肪性肝炎の病理学的な変化 (脂肪化、炎症細胞浸潤、線維化) は殆ど認められなかった。一方、Nrf2 遺伝子欠失型では野生型と比較してより重症の脂肪性肝炎像を呈していた。酸化ストレスレベルを反映する 4-HNE 染色および鉄染色に関しても、Keap1 遺伝子欠失型ではごく軽微な染色性が確認された。Nrf2 の肝発現レベルは、野生型では MCD 食投与 6 週で通常食投与の約 3 倍に増加し、Nrf2 遺伝子欠失型では顕著に染色性の増加が確認された。さらに Keap1 遺伝子欠失型では MCD 食と通常食の投与に関わらず、6 および 13 週で約 5 倍と顕著に増加していた。MCD 食投与により、Nrf2 が制御する解毒代謝酵素や酸化ストレス応答蛋白の発現レベルは、野生型では通常食に比較して有意に増加し、Keap1 遺伝子欠失型ではその基礎発現が著明に増加していた。一方、Nrf2 遺伝子欠失型ではこれらの発現誘導はごく軽微か認められなかった。これらのことより、Keap1 遺伝子欠失型では Nrf2 の過剰発現により酸化ストレス応答能が顕著に増加し、MCD 誘発脂肪性肝炎の発症を抑制しているものと考えられた。一方、Nrf2 遺伝子欠失型では Nrf2 欠失による抗酸化ストレス応答の低下により重症の脂肪性肝炎に至ると考えられた。これらのことより、Nrf2 は、MCD 誘発脂肪性肝炎の発症に対して、解毒と酸化ストレス消去系分子の発現誘導を介して、抑止的役割を果たしていると推測され、また、Nrf2 は NASH 治療における重要な分子標的の一つであると考えられた。今後、薬剤の Nrf2 賦活化により MCD 誘発脂肪性肝炎の発症が抑止できるかが興味深い。

### スルフォラファンによる Nrf2 賦活化と NASH の発症と進展の抑止

野生型の MCD 食および SFN 投与群では MCD 単独投与群と比較して、肝病理所見において脂肪性肝炎における炎症および線維化が有意に抑制されていた。酸化ストレスレベルを反映する 4-HNE 染色および鉄染色に関しても、SFN の投与により改善が認められた。このことより、SFN は Nrf2 の活性化を介して酸化ストレスの増加を抑制し、その結果、肝病変の増悪を防御したものと考えられた。Nrf2 は MCD 誘発脂肪性肝炎に対して、酸化ストレス消去系分子の発現誘導を介して、肝病変の発症と進展に抑止的役割を果たすと推測された。SFN による Nrf2 活性化は NASH に対する新しい治療手段として有用であると考えられた。

(研究成果の詳細は Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2012, In press. DOI 10.1007/s00535-012-0552-9 に掲載中である)

#### 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 20 件)

1. Yamanashi Y, Takada T, Shoda J, Suzuki H.: Novel function of Niemann-Pick C1-Like 1 as a negative regulator of Niemann-Pick C2 protein. *Hepatology* 2012, In press 査読有
2. Okada K, Warabi E, Sugimoto H, Horie M, Tokushige K, Ueda T, Harada N, Taguchi K, Hashimoto E, Itoh K, Ishii T, Utsunomiya H, Yamamoto M, Shoda J: Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol* 2012, In press. 査読有
3. Kishida M, Ishige, K., Horibe, T., Tada, N., Koibuchi, N., Shoda J, Kita, K., Kawakami, K.: Orexin 2 receptor as a potential target for the immunotoxin and antibody-drug conjugate cancer therapy. *Oncology Letters* 3 : 525-529, 2012. 査読有
4. Nakayama, H., Sugahara, S., Fukuda, K., Abei, M., Shoda, J., Tokita, M., Sakurai, H., Tsuboi, K., Matsuzaki, Y., Tokue, K.: Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma located adjacent to the alimentary tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80:992-995, 2011. 査読有
5. Sugiyama, H., Onuki, K., Ishige, K., Baba, N., Ueda, T., Matsuda, S., Takeuchi, K., Onodera, M., Nakanuma, Y., Yamato, M., Yamamoto, M., Hyodo, I., Shoda, J.: Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *J Gastroenterol* 46:779-789, 2011. 査読有
6. Yamanashi, Y., Takada, T., Yoshikado, T., Shoda, J., Suzuki, H.: NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology* 140:1664-1674, 2011. 査読有
7. 宇都宮洋才、稲田健一：梅肉エキスとがん予防。 *Functional food* 14 : 368-373, 2011 査読有
8. Sugahara, S., Oshiro, Y., Nakayama, H., Fukuda, K., Mizumoto, M., Abei, M., Shoda, J., Matsuzaki, Y., Tohno, E., Tokita, M., Tsuboi, K., Tokue, K.: Proton beam therapy for large hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 76:460-466, 2010. 査読有
9. Sugimoto, H., Okada, K., Shoda, J., Warabi, E., Ishige, K., Ueda, T., Taguchi, K., Yanagawa, T., Nakahara, A., Hyodo, I., Ishii, T., Yamamoto, M.: Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol* 298:G283-G294, 2010. 査読有
10. 長谷川直之, 安倍井誠人, 佐々木亮孝, 朴秀吉, 森脇俊和, 南優子, 福田邦明, 平井祥子, 正田純一, 大河内信弘, 兵頭一之介. S-1 化学療法が奏効し根治手術が可能となった Stage IVb 進行胆嚢癌の 1 例. *胆道学会誌* 24:723-728, 2010. 査読有
11. Matsuda, A., Kuno, A., Kawamoto, K., Matsuzaki, H., Irimura, T., Ikehara, Y., Zen, Y., Nakanuma, Y., Yamamoto, M., Ohkohchi, N., Shoda, J., Hirabayashi, J., Narimatsu, H.: WFA-positive sialylated MUC1 is a high-sensitivity biliary marker for intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* 52:174-182, 2010. 査読有
12. Okada, K., Yanagawa, T., Warabi, E.,

- Yamastu, K., Uwayama, J., Takeda, K., Utsunomiya, H., Yoshida, H., Shoda, J., Ishii, T.: Acarbose, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, prevents obesity and hepatic steatosis in SQSTM1/A170/p62-deficient mice. *Hepatology Res* 39:490-500, 2009. 査読有
13. Ito, H., Kuno, A., Sawaki, H., Sogabe, M., Ozaki, H., Tanaka, Y., Mizogami, M., Shoda, J., Angata, T., Sato, T., Hirabayashi, J., Ikehara, Y., Narimatsu, H.: Strategy for glycoproteomics: identification of glyco-alteration using multiple glycan profiling tools. *J Proteome Res* 8:1358-67, 2009. 査読有
14. Nakayama, H., Sugahara, S., Tokita, M., Fukuda, K., Mizumoto, M., Abei, M., Shoda, J., Sakurai, H., Tsuboi, K., Tokuyue, K.: Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma: the University of Tsukuba Experience. *Cancer* 115:5499-5506, 2009. 査読有
15. 安倍井誠人, 福田邦明, 正田純一, 兵頭一之介: 重症肝炎における劇症化予知式に基づいた早期抗ウイルス・免疫療法の有効性の検証. 特集: 急性肝不全における内科治療と肝移植の進歩. *日本腹部救急医学会雑誌* 29:597-600, 2009. 査読有
16. Sugahara, S., Nakayama, H., Fukuda, K., Mizumoto, M., Tokita, M., Abei, M., Shoda, J., Matsuzaki, Y., Thono, E., Tsuboi, K., Tokuyue, K.: Proton beam therapy for hepatocellular carcinoma associated with portal vein tumor thrombosis. *Strahlenther Onkol* 185:782-788, 2009. 査読有
17. Utsunomiya H., Ichinose M, Tsujimoto K., Katsuyama Y, Yamasaki H, Koyama AH, Ejima D, Arakawa T. Co-operative thermal inactivation of herpes simplex virus and influenza virus by arginine and NaCl. *Int J Pharm.* 21:366:99-102.2009 査読有
18. Okada, K., Shoda, J., Taguchi, K., Maher, J.M., Ishizaki, K., Inoue, Y., Ohtsuki, M., Goto, N., Sugimoto, H., Utsunomiya, H., Oda, K., Warabi, E., Ishii, T., Yamamoto, M.: Nrf2 counteracts cholestatic liver injury via stimulation of hepatic defense systems. *Biochem Biophys Res Commun* 389:431-436, 2009. 査読有
19. Watanabe, S., Yokoyama, Y., Oda, K., Kokuryo, T., Shoda, J., Okada, K., Utsunomiya, H., Nagino, M.: Choleretic effect of Inchikoto on the cholestatic livers of patients with biliary obstruction due to biliary tract carcinoma: A randomized controlled study. *Hepatology Res* 39:247-255, 2009 査読有
20. Fukumitsu, N., Sugahara, S., Nakayama, H., Fukuda, K., Mizumoto, M., Abei, M., Shoda, J., Thono, E., Tsuboi, K., Tokuyue, K.: A prospective study of hypofractionated proton beam therapy for patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 74:831-836, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

- 岡田浩介, 正田純一, 山本雅浩: インチンコウ湯は転写因子 Nrf2 を活性化し, 生体の抗酸化ストレス応答機構を賦活化する 第 97 回日本消化器病学会総会(東京), 4 月, 2011.
- 正田純一, 川本 徹, 中沼安二, 山本雅一, 大河内信弘, 松田厚志, 久野 敦, 池原 譲, 平林 淳, 成松 久: 糖鎖プロファイリング解析による肝内胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発 第 47 回日本肝臓学会(東京), 6 月, 2011.
- 岡田浩介, 杉本浩一, 正田純一, 堀江正樹, 藤 栄治, 後藤直宏, 石井哲郎, 山本雅之: 動脈硬化+高脂肪食誘発肝炎における転写因子 Nrf2 の役割 第 47 回日本肝臓学会総会(東京) 6 月, 2011.
- 岡田浩介, 正田純一, 徳重克年: Sulforaphen (SFN) による転写因子 Nrf2 賦活化はメチオニンコリン欠乏食(MCD)誘発脂肪性肝炎の炎症と線維化を抑止する 第 15 回日本肝臓学会大会(福岡), 10 月, 2011.
- 岡田浩介, 藤 栄治, 正田純一: 転写因子 Nrf2 は動脈硬化+高脂肪食誘発脂肪性肝炎の脂肪酸代謝修飾による肝脂肪蓄積を抑止し, 肝病変の発症と進展を防御する 第 15 回日本肝臓学会大会(福岡), 10 月, 2011.
- 松田厚志, 久野敦, 松崎英樹, 川本徹,

- 鹿内俊秀、中沼安二、山本雅一、大河内信弘、池原謙、正田純一、平林淳、成松久。胆管がん診断へ向けた新たなコンビネーション診断系の確立。第31回日本分子腫瘍マーカー研究会、10月、2011。
7. 川本 徹、山本雅一、正田純一：胆嚢発癌とその癌進展に果たすアラキドン酸代謝活性化の役割：Cyclooxygenase-2 (COX-2)、プロスタグランジンE合成酵素(PGES)、プロスタグランジンE受容体(EP)の発現に着目して 第14回日本肝臓学会大会(横浜)、10月、2010。
  8. 杉本浩一、岡田浩介、正田純一、藤 栄治、石井哲郎、山本雅之：動脈硬化+高脂肪食誘発脂肪性肝炎における転写因子Nrf2の役割 第14回肝臓学会大会(横浜)、10月、2010。
  9. 正田純一、平林 淳、成松 久：糖鎖プロファイリング解析による肝内胆管癌の新規糖蛋白質マーカーの開発 第96回日本消化器病学会総会(新潟)、4月、2010
  10. Okada K, Sugimoto H, Shoda J, Warabi E, Ishige K, Ueda T, Taguchi K, Yanagawa T, Nakahara A, Hyodo I, Ishii T, Yamamoto M: Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. The 2nd International Forum (Niigata, Japan), April, 2010.
  11. Okada K, Sugimoto H, Warabi E, Gotoh N, Takahashi H, Utsunomiya H, Ishii T, Yamamoto M, Shoda J: Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice fed atherogenic plus high-fat diet. The 8th JSH Single Topic Conference, November, 2010 (PRESIDENTIAL AWARD).
  12. 岡田浩介、正田純一、山本雅浩：インチンコウ湯は肝 Mrp2/MRP2 の発現増加と毛細胆管膜への集積により胆汁酸非依存性の胆汁分泌を誘発する 第95回消化器病学会総会(札幌)、4月、2009。
  13. 杉本浩一、岡田浩介、正田純一、藤 栄治、石井哲郎、山本雅之：転写因子Nrf2はコリンメチオニン欠乏食(MCDD)誘発非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を防御する第13回肝臓学会大会(京都)、10月、2009。
- [図書](計7件)

1.

2. Shoda, J, Kawamoto T, Yamamoto, M.: Gallbladder Cancer - Pathogenesis and Molecular Targeting Strategies for Therapeutic Options. In: Gallbladder Cancer, Christopher V Aiello, ed. NOVA Science Publishers, New York, 2012, In press.
3. 正田純一：胆石症・胆道炎・胆道がん胆石症 概念・定義と疫学 最新医学社(大阪), pp.13-25 2011.
4. 正田純一：胆道癌発生の分子機序 Annual Review 消化器 2011 中外医学社(東京) pp.293-299, 2010.
5. 正田純一：胆道感染症 南江堂(東京), pp.366-369, 2010.
6. 正田純一：原発性硬化性胆管炎 内科学書第7版 Vol.4 肝・胆道・膵疾患 中山書店(東京), pp.324-325, 2009.
7. 正田純一：胆道の炎症 内科学書第7版 Vol.4 肝・胆道・膵疾患 中山書店(東京), pp.320-324, 2009.
8. 正田純一：胆石症診療ガイドライン(編集 財団法人 日本消化器病学会) 疫学・病態 南江堂(東京), pp.320-324, 2009.

[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  
宇都宮 洋才 (Hirotooshi Utsunomiya)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：60264876

(2)研究分担者

石井 哲郎 (Tetsuro Ishii)

筑波大学・大学院・教授

研究者番号：20111370

正田 純一 (Junichi Shoda)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90241827

高橋 宏 (Hiroshi Takahashi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70236313

(3)連携研究者

山本 雅之 (Masayuki Yamamoto)

東北大学・医学研究科・教授

研究者番号：50166823