

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 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590728

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪肝炎の病態形成における JNK シグナルの機能解析

研究課題名（英文） The role of JNK signaling in the development of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

児玉 裕三（KODAMA YUZO）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80378687

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、肝炎・肝硬変へと至る病態として着目されている。本研究では、NASH の病態形成における JNK の役割について解析を行なった。その結果、NASH 動物モデルにおいて、*JNK1* 遺伝子のノックアウトマウスでは、肝線維化・肝癌の形成が減少している傾向が認められた。骨髄移植を用いたキメラマウスの解析結果、あるいは初代培養細胞を用いた研究結果より、NASH の病態形成には血液細胞に加え非血液細胞における *JNK1* の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is an important pathological condition responsible for liver fibrosis and cancer. In the current study, using NASH mouse model, we analyzed the role of JNK signaling in the development of NASH and subsequent formation of liver fibrosis and cancer. As a result, the development of liver fibrosis and cancer was reduced in *jnk1* knockout mice as compared to wild-type mice. Furthermore, analysis of chimeric mice generated by bone marrow transplantation or *in vitro* experiments using primary culture cells revealed the critical role of JNK1 in non-hematopoietic cells in the development of NASH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：NASH、肝線維化、JNK

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, 以下 NASH) は、明らかな飲酒歴がないにも関わらず、肝組織所見上アルコール性肝障害に類似した脂肪沈着

を特徴とする肝障害である。NASH は肥満、糖尿病、高脂血症などいわゆる生活習慣病を基礎に発症する例が多く、肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現系として

捉えられている。近年、生活様式の欧米化に伴い我が国でも確実に NASH 患者は増加しており、さらに肝硬変・肝細胞癌へと進展し得ることが明らかにされたことから、その病態を解明し対策を図ることは極めて重要な課題となっている。

一般に NASH の発症・進行の機序として、(1) インスリン抵抗性をベースとした肝細胞への脂肪沈着 (1st hit) に、(2) 酸化ストレスや炎症性サイトカインなどによる肝障害要因 (2nd hit) が加わり、肝細胞死・慢性炎症・線維化が誘導されるとする two-hit theory が広く支持されている (Day CP. Gastroenterology 1998)。このようなインスリン抵抗性の獲得や、酸化ストレスなどの刺激に対する応答には c-Jun N-terminal Kinase (以下 JNK) が重要な役割を果たすことが示唆されている (Hirosumi J. Nature 2002)。JNK は様々な細胞外刺激に対して増殖・分化・遊走・免疫反応・細胞死などの細胞反応を制御する mitogen-activated protein (MAP) キナーゼファミリーの一つであり、種々の肝障害での働きに加え、脂肪肝の形成に関与すること (Tuncman G. PNAS 2006) や、NASH 患者の肝臓において活性化していること (Puri P. Gastroenterology 2008) などが報告されている。このように、JNK は NASH の発症・進行における two-hit の双方に関与する重要な regulator であり、NASH においても糖尿病などの他のメタボリックシンドロームと同様に (Kaneto H. Nat Med. 2004) 有力な治療ターゲットになり得るものと考えられる。しかしながら、NASH の病態形成、とりわけ肝脂肪化に伴う肝細胞死の誘導や星細胞の活性化、さらには臨床上最も重要となる肝硬変・肝細胞癌への進展における JNK の役割については未だ不明

な点が多い。

2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, 以下 NASH) はメタボリックシンドロームを基盤とした肝障害であり、近年その患者数の増加と共に、肝硬変あるいは肝細胞癌への進展が大きな問題となっている。本研究では、メタボリックシンドロームの形成のみならず、様々な肝障害や炎症誘導への関与が報告されている分子、c-Jun N-terminal Kinase (以下 JNK) に着目し、(1) 遺伝子改変マウスを用いて NASH の病態形成における JNK の役割を明らかにすること、(2) NASH 治療ターゲットとしての JNK の可能性を探索すること、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) NASH/肝線維化モデルにおける野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスの解析

コリン欠乏アミノ酸食 (CDA diet) 20 週投与による NASH/肝線維化モデルを用い、野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウス、さらには骨髄移植によるこれらのキメラマウスの解析を行う。

(2) 初代培養細胞を用いた JNK1 および JNK2 の *in vitro* 機能解析

肝脂肪化による肝細胞障害、あるいは肝星細胞活性化における JNK の役割を *in vitro* において解析するために、野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスから分離した初代培養肝細胞、肝星細胞、あるいは Kupffer 細胞を用いた解析を行う。

(3) NASH/肝細胞癌モデルにおける野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスの解析

NASH からの肝細胞癌発癌への JNK の関

与を明らかにするために、CDAA diet/80週投与による NASH/肝細胞癌モデルを用い、野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスの解析を行う。

(4) 選択的 JNK1 inhibitor および選択的 JNK2 inhibitor の開発

NASH 治療薬としての JNK 阻害薬の可能性を探るために、初代培養細胞を用いた *in vitro* の系、あるいは CDAA diet を用いた *in vivo* モデルにおいて JNK 阻害薬の効果を検討する。

4. 研究成果

(1) NASH/肝線維化モデルにおける野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスの解析。

コリン欠乏アミノ酸食(CDAA diet)を用い、野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスに NASH/肝線維化を誘導した。肝臓における脂肪化の程度について、Oil Red O 染色、肝組織中トリグリセライド含有量などにて評価を行ったところ、これらのマウスの中に明らかな差が認められなかった。一方、肝線維化の程度について、Sirius Red 染色、線維化関連遺伝子の発現などにより検討を行ったところ、野生型、*JNK2*^{-/-}マウスと比較して *JNK1*^{-/-}マウスでは肝線維化の程度が低かった。

次に、肝細胞や肝星細胞など非血液系細胞の JNK isoform の機能を評価するために、骨髄移植によるキメラマウスの作成を行った。レシピエントが野生型、*JNK1*^{-/-}、あるいは *JNK2*^{-/-}マウスで、免疫担当細胞はいずれも野生型であるキメラマウスを作成し、これらを CDAA diet による NASH/肝線維化モデルにおいて比較することにより、NASH の病態形成における非血液細胞の JNK isoform の役割について検討を行った。その結果、キメラマウス間において、インスリン抵抗性、肝

脂肪化に差は見られなかったが、レシピエントが *JNK1*^{-/-}マウスにおいて、炎症および肝線維化の程度が低下していた。

(2) 初代培養細胞を用いた JNK1 および JNK2 の *in vitro* 機能解析

野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスより初代培養肝細胞を分離し、遊離脂肪酸の添加により *in vitro* において肝細胞の脂肪化を誘導した。これらの肝細胞間での脂肪化の程度、脂肪化による肝細胞死の程度について比較検討を行ったところ、明らかな差は認められなかった。

以上(1)の結果より、NASHによる肝線維化には JNK1 が重要な役割を果たしていることが *in vivo* の検討により示唆された。さらに(1)(2)の結果より、野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}肝細胞の脂肪化に対する感受性・脂肪化による細胞死の程度は *in vitro*、*in vivo* において同程度だが、レシピエントが *JNK1*^{-/-}マウスにおいて、炎症および肝線維化の程度が低下していたことより、肝線維化には肝細胞以外の細胞腫における JNK1 の炎症への関与が中心となっている可能性が示唆された。

(3) NASH/肝細胞癌モデルにおける野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスの解析

CDAA diet/80週間による NASH/肝細胞癌モデルにおいて、野生型、*JNK1*^{-/-}、および *JNK2*^{-/-}マウスの解析を行った。それぞれのマウスにおいて、肝腫瘍の数、サイズについて解析を行ったところ、*JNK1*^{-/-}マウスにおいて腫瘍の数、サイズともに減少している傾向がみられた。

(4) 選択的 JNK1 inhibitor および選択的

JNK2 inhibitor の開発

pan-JNK inhibitor の NASH の進展抑制効果について NASH/肝線維化モデルを用いた in vivo における検討を行った。これまでのところ有意な効果は得られていない。

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 6 件)

1. Iwaisako K, Haimerl M, Paik YH, Taura K, Kodama Y, Sirlin C, Yu E, Yu RT, Downes M, Evans RM, Brenner DA, Schnabl B. Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:E1369-76. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1202464109
2. Brenner DA, Seki E, Taura K, Kisseleva T, Deminici S, Iwaisako K, Inokuchi S, Schnabl B, Oesterreicher CH, Paik YH, Miura K, Kodama Y. Non-alcoholic steatohepatitis-induced fibrosis: Toll-like receptors, reactive oxygen species and Jun N-terminal kinase. Hepatol Res. 2011;41:683-6. 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2011.00814.x
3. Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M. Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. FASEB J. 2011;25:1133-44. 査読有 DOI: 10.1096/fj.10-168351
4. De Minicis S, Seki E, Paik YH, Oesterreicher CH, Kodama Y, Kluwe J, Torozzi L, Miyai K, Benedetti A, Schwabe RF, Brenner DA. Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis. Hepatology. 2010;52:1420-30. 査読有 DOI: 10.1002/hep.23804
5. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM,

Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. Gastroenterology. 2010;139:323-34. 査読有 DOI:10.1053/j.gastro.2010.03.052

6. Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, Oesterreicher CH, Kodama Y, Miyai K, Akira S, Brenner DA, Seki E. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:844-9. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.0909781107

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 裕三 (KODAMA YUZO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 80378687

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし