

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590968

研究課題名(和文) 加齢による肝疾患の病態制御の分子基盤の解明 特にSIRT1の機能解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of liver diseases according to aging

研究代表者

白木 克哉 (SHIRAKI, Katsuya)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90263003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：加齢が、肝疾患の遺伝子発現に密接に関連しており、臨床的に肝疾患の進展と予後および、特に発癌に関連していることが判明した。加齢関連分子が疾患の分子病態に密接に関連していることが予測される。本研究では、正常肝を解析することにより、重要な加齢責任分子を同定し、特に癌化の機序の解明に新しい見地を与え、発癌に関する新しい分子機構の解明に役立つばかりではなく、新たな遺伝子治療の標的の研究にも大きく寄与できていると考えている。

研究成果の概要(英文)：Aging is mostly related with gene expression profile in liver. These gene expression patterns are closely associated with liver pathogenesis. We found lots of genes that are critical in aging and carcinogenesis, which might be gene targets in future for the regulation of diseases.

研究分野：消化器内科学

キーワード：加齢 発癌 遺伝子 SIRT

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢に伴い生体では様々な変化が出現しており、生活習慣病をはじめさまざまな疾患を誘発する。免疫異常、動脈硬化、2型糖尿病、癌などに代表される疾患も加齢と密接に関連しており、多数の研究がなされているがその分子生物学的機序の解明は十分になされていない。

慢性肝疾患においては、例えば、C型肝炎は50歳代以降急速に線維化が進展することが知られているし、C型肝炎に対するインターフェロン治療は加齢に伴いその有効率は低下することが判明している。また、高齢になれば、肝細胞癌の発現率が上昇し高発癌状態であるとされている。また、生体肝移植においても30歳代のグラフトは高齢者のグラフトと比較し明らかに、生着率がよく良好な経過をとることが判明している。また、脂肪性肝炎においても加齢がすすむにしたがって重症度や合併症が増加することが知られている。このような臨床上的エビデンスからも加齢と肝疾患の密接な関連性が示唆されるが、その分子機構はあきらかになっていない。

(2) これまでの研究では、加齢による分子機構では、DNA損傷とその修復機転の障害、フリーラジカルやそれによるミトコンドリア障害、オートファジー低下によるたんぱく質代謝異常や細胞老化などさまざまなメカニズムが提唱されてきている。しかしながら、これらの分子機構の変化を60歳以下の比較的若年者における肝臓においては検討されていない。

2. 研究の目的

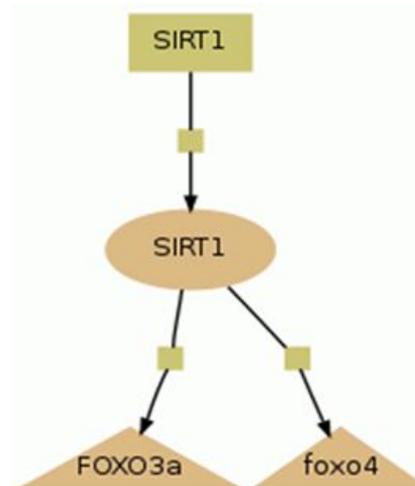
(1) 我々は、臨床現場において生体肝移植患者を数多く診療している。その中で、生体肝移植ドナーの凍結肝臓組織を多数保存している。生体肝移植ドナーの肝臓は各種臨床検査において病気を保持しない人正常の肝臓のサンプルであると考えられる。また、20歳代から50歳代と若年者から中高年者まで分布しており、加齢による肝臓の分子基盤の変化を解析するために極めて適していると考えられる。我々は、このサンプルを用いDNAチップにて遺伝子発現を網羅的に解析して年代毎に発現が異なる分子を解析した。また、これらの分子発現の変化を包括的に解析し、その変化の上流にある分子の1つとしてSIRT1を同定した。そこでこれらの基礎データを基に、さらなる肝臓における加齢の分子機構を解析する。さらに、これらの変化が、どのように肝疾患に対してその病態を修飾するかを検討する。最終的にはこれらの加齢関連の分子を標的にすることにより疾患の制御を可能にすることが目的である。

(2) 上記研究において、我々は、正常肝臓の遺伝子発現をDNACHIPを用いて網羅的に解析し、遺伝子変化が50歳代においてダイナミックに変化していることと其上流となるキー遺伝子にSIRT1が重要な役割をしていることを見いだした。SIRT1はこれらの加齢変

化の中で重要な役割をもつ分子としてサーチエンファミリーの1つである。サーチエンは酵素ファミリーであり、酵母において、遺伝子サイレンシングを調節し、酵母の老化の原因であるゲノム不安定性を抑制するヒストン脱アセチル化酵素として同定された。その機能は、ストレスや老化から保護するように働くことが示されており、糖・脂質代謝、アポトーシス、DNA修復、神経新生、炎症など様々なものが含まれている。これまでの研究において、サーチエンが多くの疾患を導く変性過程とみなされる老化を遅らせることができることも示唆している。栄養の変化やさまざまな環境刺激に応答して、生理的口バストネスを保持し、寿命を促進する働きをもつと考えられる。サーチエン活性を刺激すれば、老化に伴って生じる生理学的変化を抑えることで、寿命の延長をもたらすことができるのではないかと考えられている。サーチエンの中では特にSIRT1が複数の組織において栄養状態の変化に対する代謝応答を制御していることが証明されている。特に肝臓においては糖の新生、脂肪酸酸化、コレステロール制御などがその機能として知られており、またインスリン抵抗性に関与していることが知られている。

しかしながら、加齢に伴う人肝臓におけるサーチエンファミリー発現に関する研究はほとんどされていない。また、慢性肝疾患や脂肪性肝炎、肝細胞癌発癌の病態に関する老化による修飾の機構に関しては十分に解明されていない。

そこで、今回我々は、加齢により変化する分子を解明し、加齢によるシグナル変化を明らかにして、その上流に位置する分子を解明することを本研究の目的とする。さらに、現在までに同定できたSIRT1の肝臓における機能を明らかにし、肝疾患の病態に対する影響や修飾を明らかにし、SIRT1の発現制御による病態制御をすることを目的とする。



SIRT1のシグナル解析

3. 研究の方法

(1)加齢によって変化する分子の同定

最新の DNA アレイおよび DNA メチル化アレイによりまず加齢および発癌に伴う DNA メチル化を網羅的に解析し、データベースなどにてその標的分子を探索する。さらに、最新の DNA アレイ解析により、遺伝子発現差のデータベースを構築して、DNA メチル化により発現に影響を受ける遺伝子群を同定する。その結果を、遺伝子発現解析とあわせてデータベースサーチおよびパスウェイマッピング等の方法を用いて、加齢により変化する分子群、またシグナル経路などを明らかにする。

(2) SIRT の機能解析

正常肝および各種肝疾患におけるサーチインファミリーの発現(mRNA およびタンパク)の解析する。また、肝細胞における SIRT の標的分子の検討する。さらに、SIRT1 の機能解析:肝細胞のサイトカインや酸化ストレスによる細胞死や DNA 修復に対する SIRT の機能を解析する。

(3) 遺伝子改変マウスを用いた SIRT1 の機能解析

作成を予定している肝特異的 SIRT1 ノックアウトマウスを用いて、様々な実験を行う。まず、肝切除後の肝再生能を細胞周期関連遺伝子の解析にて検討する。また、種々の薬剤、具体的には四塩化炭素および DMN などの薬剤を腹腔内に注入し、経時的に肝臓の組織像および線維化などを観察する。また、発癌実験では腫瘍発生個数、組織像を検討する。自然発生の癌の有無に関しても長期間で検討する。これらの実験を通じて SIRT の生体肝での役割および、疾患進展への SIRT の修飾機序の解明が可能になると考える。

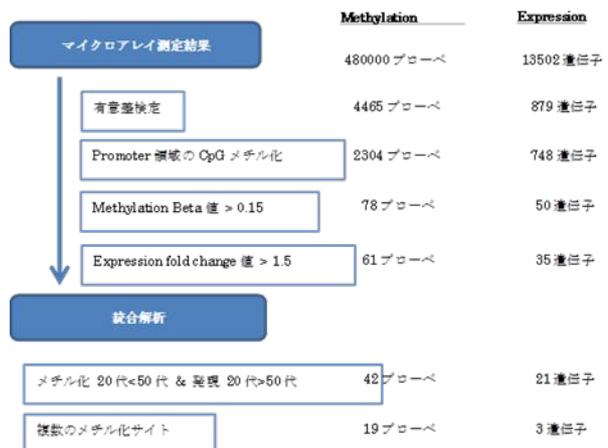
4. 研究成果

(1)加齢によって変化する分子の同定

遺伝子解析 20 台、50 台の遺伝子変化が顕著に確認された。加齢に伴い多くの遺伝子の発現が変化することが判明した。また、この DNA メチル化チップを用いた、網羅的かつ包括的な DNA もメチル化データを DNA チップによる遺伝子発現データとを照合、統合することにより、DNA メチル化が遺伝子発現に及ぼす影響を解析する。この解析により加齢に伴う DNA メチル化の中で特に病態に密接に関与するメチル化サイトを明らかにすることができる。これまでの DNA メチル化アレイを用いた 48 万以上の部位におけるメチレーションの解析の結果、主成分分析にて 20 歳代と 50 歳代にて DNA メチル化のパターンにて、明らかにそれぞれがクラスターを形成しそのメチル化に有意な一定の差があることを見いだした。これは、加齢による DNA メチル化が生じる部位が一定に存在することを意味する。また、これらのメチル化により発現分子発現の変化を包括的に解析し、その変化の上流にある責任分子の 1 つとして CBP/p300 を同定した。また、CBP: /p300 は肝癌におい

てもその活性が増加していることを見いだしている。CBP/p300 は、DNA に直接結合する転写制御因子であり、多くの転写因子と関連している。またそれ独自でヒストンをアセチル化する酵素活性を有しているが、加齢による制御や肝癌との関わりの詳細については十分に解明されていない。

同定された遺伝子数に関する結果



同定された遺伝子一覧

Apoptotic peptidase activating factor 1
 Bone morphogenetic protein receptor type 1A
 Caspase-10 apoptosis-related cysteine peptidase
 Caspase 5 apoptosis-related cysteine peptidase
 Caspase 7; a cysteine-type peptidase
 Caspase 9; a cysteine-type endopeptidase
 Cyclin A1; a cyclin-dependent protein kinase regulator
 Cyclin-dependent kinase 9
 Cathepsin G
 Cullin 1; a component of the SCF ubiquitin protein ligase complex
 Somatic cytochrome c
 Death-associated protein 6
 Fas associated via death domain

(2)Upstream 解析の結果、肝加齢に関与するキー-遺伝子

同定された遺伝子のシグナルを解析することにより、遺伝子の相互関連が明らかになった。一部の解析結果示す。このように各遺伝子が密接にかんねんしていることが判明した。

