

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590992

研究課題名(和文)肝細胞アポトーシスに対するNrf2を介したカルノシン酸の制御分子機構の解明

研究課題名(英文)Clarifying the molecular mechanism of the Nrf-2 activator carnosic acid in the regulation of the hepatocyte apoptosis

研究代表者

王挺(WANG, TING)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：70416171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カルノシン酸(CA)は、野生型マウスにおいてNrf2の抗酸化ストレスシステムの活性化を誘導しないことが明らかになった。一方、CAは正常肝細胞においてH2O2による細胞内総活性酸素ROSの上昇、LDHの細胞外漏出の上昇、さらに細胞死に対して著明な改善作用を持つことが明らかになった。このメカニズムは、Nrf2非依存であり、SIRT1を介して、ERK1/2の活性化の制御によるものである。さらに、CAは、肝癌細胞において細胞のアポトーシスを誘導する。CAの抗癌作用は、細胞種によって効果が異なる。SIRT1および下流のNrf2の活性化は、CAの作用機構に重要である。

研究成果の概要(英文)：Carnosic acid (CA) did not induce the activity of Nrf2 anti-oxidative system in vivo. CA at concentrations as low as 1 μM significantly protected against H2O2-induced cytotoxicity and apoptosis of hepatocytes. H2O2 induced phosphorylation of extracellular-signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) in primary hepatocytes. U0126 inhibited the decrease in cell viability induced by H2O2. Co-treatment with CA inhibited ERK1/2 activation induced by H2O2. CA at 1 μM increased protein levels of SIRT1. Pretreatment with EX527 or transfection of SiRNA of SIRT1 weakened the protective effects of CA against H2O2-induced cell death. Our data indicate that CA protects against oxidative stress-induced cytotoxicity via SIRT1 by regulating subsequent downstream factors such as ERK1/2. On the other hand, CA decreased cell viability of human hepatoma Huh 7 and HepG2 cell line in a cell-dependent way. SIRT1/Nrf2 signaling is involved in its function.

研究分野：肝臓学

キーワード：カルノシン酸 シグナル アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) これまで疾病とその克服は、それぞれの疾病に特異的な障害機序の解明とその治療法の開発という形で進められてきた。しかし、多くのサイトカインの発見やアポトーシス機構の解明を機に、多種の細胞に共通する細胞障害機構(アポトーシスシグナル、酸化ストレス、小胞体ストレス、ミトコンドリアストレスなど)が明らかにされ、それとともに障害に対する耐性機構(抗アポトーシス蛋白、抗酸化物質やその誘導機構、オートファジー、蛋白品質管理機構など)も解明されつつある。従って、このような耐性機構の促進は多様な障害あるいは異なる臓器の障害に共通する治療法の実現に繋がると考えられる。例えば、阻血(再灌流)障害に対する preconditioning 治療は、脳梗塞、心筋梗塞の治療のみならず、肝移植におけるグラフトの保護など様々な臓器障害に共通して応用可能となっている。

(2) 肝疾患においては、インスリン抵抗性に伴う脂肪肝、C型肝炎に伴う脂肪肝や肝線維化進展、発癌、急性肝障害における広汎性肝細胞死、肝切除や広汎性肝細胞死後の再生障害などに共通して、酸化ストレスや JNK、IKK の活性化が想定され、実験室レベルでその制御機構の開発が進んでいる。

(3) 細胞ストレス適応反応の中心的物質として注目される Nrf2 は、antioxidant responsive element (ARE)に直接結合する転写因子で、酸化ストレスのみならず小胞体ストレスや折りたたみ力などの細胞ストレスに対しても応答し、これらに対する耐性獲得の中心的物質とされる。Nrf2 はほとんどの細胞に発現しており、種々のストレスに反応して、vitagenes family と呼ばれる耐性獲得に関与する遺伝子群(Hsp70, HO-1, thioredoxin など)の転写を促進することが判明している。

2. 研究の目的

本研究では、ストレス応答中心物質である Nrf2 が抗ストレス蛋白の発現促進により、細胞のアポトーシスを制御するという仮説を検証するとともに、Nrf2 活性化物質であるカルノシン酸(CA)を疾病の予防・治療に応用することを最終的な目的とする。当該研究期間内では、肝細胞の薬物、脂肪蓄積、酸化ストレス、炎症性サイトカインによる障害に対する耐性獲得機構の解明と制御法の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) CA により Nrf2 を活性化させるかどうかを確認するため、野生マウス BALB/c を CA 腹腔内投与群と対照群を分け、実験した。実験開始から 6 時間、8 時間と 24 時間に解剖を行い、血液及び肝臓組織を採取した。血中および組織中 SOD および GSH の変化をキットで測定し、Nrf2 の活性化を Western blot で評価した。

(2) CA による酸化ストレス誘導性細胞毒性及びアポトーシスへの影響について、初代培養肝細胞および正常肝細胞株 AML-12 細胞に、0.1 から 10 μ M までの CA を投与し、生細胞数および Caspase 3 の活性化を測定した。次に、 H_2O_2 による細胞毒性モデルを作成し、CA の影響を細胞内総活性酸素 ROS、LDH の細胞外漏出および生細胞数により評価した。また、 H_2O_2 及び CA の添加による細胞内 SIRT1 総蛋白質レベルおよび Nrf2、AMPK、SIRT1、MAPK (p38MAPK、JNK、ERK1/2) のリン酸化蛋白質レベルの変動を Western blot 及び Bio-plex アッセイで検討した。CA の分子機構において ERK1/2 及び SIRT1 の作用を確認するため、ERK1/2 上流である MEK の阻害剤(U0126)及び SIRT1 の阻害剤である EX527 を使用した。また、SIRT1 の siRNA を導入し、実験の結果を確認した。

(3) 肝癌細胞のアポトーシスに対する CA の

影響について、肝癌細胞株 HepG2 及び HuH7 細胞を 4 時間 FCS(-)培地で処理後、各細胞に 0.1 から 10 μM までの濃度の CA を添加した。24 時間後生細胞数を測定し、生細胞と死細胞を染色した。また、SIRT1 の全細胞蛋白質レベル、PTEN、Nrf2 および AMPK のリン酸化蛋白質レベルを Western blotting で検出した。さらに、Nrf2 の核内移行は蛍光免疫染色で検討した。Nrf2 の上流因子についての検討は、SIRT1 の阻害剤を使用した。

3. 研究成果

(1) CA の腹腔内投与では、肝臓における Nrf2 全細胞タンパク質レベルが上昇傾向を示したが、核内 Nrf2 タンパク質レベルは、コントロールに比べ、有意差が認められなかった。また、肝組織における SOD 及び GSH の上昇は認められなかった。

(2) AML-12 細胞および初代培養肝細胞において CA 10 μM の濃度では、細胞の生存数が著明に減少し、Caspase-3 の活性化が認められた。一方、CA 1 μM までの濃度では、両細胞とも細胞生存への影響は認められなかった。Nrf2 および AMPK のリン酸化は、CA 1 μM で検出されず、10 μM ので著明に増加した。これに対し、SIRT1 のリン酸化は CA 1 μM で誘導された。

(3) H_2O_2 添加 30 分後に、細胞内 ROS レベルが上昇し、4 時間後には細胞外 LDH レベルが上昇し、48 時間後に生細胞数が減少した。 H_2O_2 のストレス誘導および細胞死促進する作用は、濃度依存性に増強した。これに対して、U0126 投与では、総 ROS の産生、LDH の細胞外漏出、また、細胞死が抑制された。さらに、 H_2O_2 は、JNK および p38MAPK のリン酸化を促進しなかったが、ERK1/2 のリン酸化を促進した。

(4) H_2O_2 と CA を混合添加した場合、ROS レ

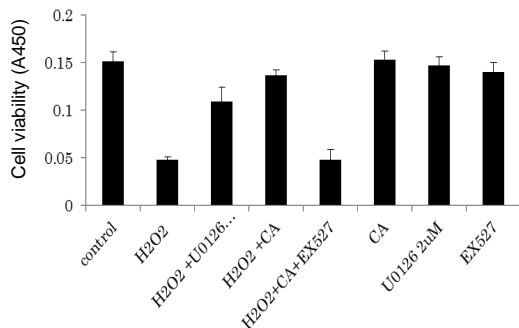
ベルおよび LDH の漏出が著明に抑制され、生細胞数も有意に増加した。また、 H_2O_2 による上昇した ERK1/2 のリン酸化が CA と H_2O_2 の混合添加では抑制された。

(5) H_2O_2 投与では、SIRT1 の総蛋白質レベルは低下した。これに対して CA 単独投与および CA と H_2O_2 混合投与した場合、SIRT1 の蛋白質発現が促進された。さらに、CA は、 H_2O_2 により誘導された細胞死を抑制したが、この作用は、EX527 投与によって抑制された。また、SIRT1 の siRNA が導入された細胞では、SIRT1 の蛋白質発現が完全に阻止され、CA の抗細胞死作用も抑制された。

(6) 一方、HepG2 細胞の生存は 10 μM までの CA による影響を受けなかったが、PTEN の活性化は上昇した。一方、HuH7 細胞の生存に対して CA は僅か 2 μM で著明な抑制作用を示したが、PTEN の活性化は逆に低下した。PTEN の活性化は、CA の抗癌作用に関与しないことが示唆された。また、HuH7 細胞では、CA 添加後 24 時間に Nrf2 の核内移行が観察され、細胞内のリン酸化タンパク質レベルは、SIRT1 の蛋白質レベルとともに上昇した。対照として、HepG2 細胞において CA は、Nrf2 の核内移行を誘導せず、SIRT1 の蛋白質発現への影響もなかった。さらに、CA による Nrf2 の核内移行および細胞内 Nrf2 の活性化タンパク質レベルは SIRT1 阻害剤の添加によって抑制された。CA の肝癌細胞死誘導作用が SIRT1 阻害剤の添加によって阻害された。

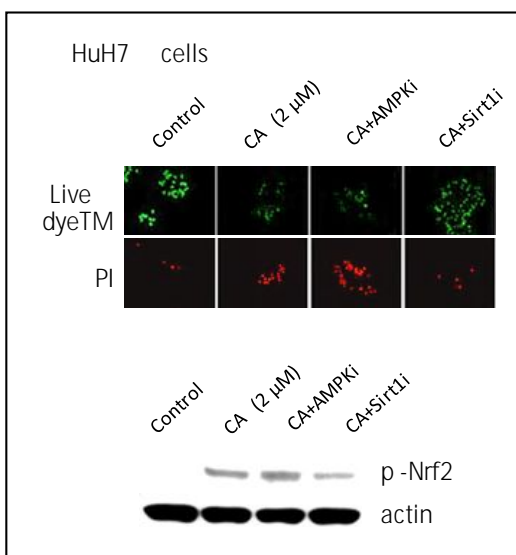
以上の結果から、CA は低濃度で、 H_2O_2 により誘導された酸化ストレスおよび細胞アポトーシスを抑制することが明らかとなった。この作用は、Nrf2 シグナルを介さず、SIRT1 発現の促進によるものであることを明らかにした。また、CA は、 H_2O_2 の酸化ストレス誘導作用に重要な役割を担う ERK1/2 の活性化を

抑制することから、CA は、SIRT1 を介して、ERK1/2 の活性化を制御するによって抗酸化ストレス作用を発揮すると考えられた。(下図)



(Wang T et al., 2013 AASLD, Poster presentation; Wang T et al., Hepatol Res, Revised)

一方、CA は肝癌細胞に対して、アポトーシス誘導作用を有するが、その効果は肝癌細胞の種類によって異なることを明らかにした。すなわち、CA の作用機構に重要な SIRT1 および下流の Nrf2 の活性化の程度が、CA の作用発現に重要であることを示した。(下図)



(Wang T et al., 2013 AASLD, Poster presentation; Wang T et al., manuscript in preparation)

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 8 件)

Wang T, Takikawa Y, Watanabe A, Kakisaka K, Oigawa K, Miyamoto Y, Suzuki K. Proliferation of mouse liver stem/progenitor cells induced by plasma from patients with acute liver failure is modulated by P2Y(2) receptor-mediated JNK activation. *J Gastroenterol.* 2014 Dec;49(12):1557-66. 査読有

Wang T, Kusudo T, Takeuchi T, Yamashita Y, Kontani Y, Okamatsu Y, Saito M, Mori N, Yamashita H. Evodiamine inhibits insulin-stimulated mTOR-S6K activation and IRS1 serine phosphorylation in adipocytes and improves glucose tolerance in obese/diabetic mice. *PLoS One.* 2013 Dec 31;8(12):e83264. doi:10.1371. 査読有

Takikawa Y, Harada M, Wang T, Suzuki K. Usefulness and accuracy of the international normalized ratio and activity percent of prothrombin time in patients with liver disease. *Hepatol Res.* 2014 Jan;44(1):92-101. 査読有

Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev.* 2013 Jan 15;27(2):169-81. 査読有

Wang T, Takikawa Y, Sawara K, Yoshida Y, Suzuki K. Negative regulation of human astrocytes by interferon (IFN) α

in relation to growth inhibition and impaired glucose utilization. *Neurochem Res.* 2012 Sep;37(9):1898-905. 査読有

Wang T, Takikawa Y, Tabuchi T, Satoh T, Kosaka K, Suzuki K. Carnosic acid (CA) prevents lipid accumulation in hepatocytes through the EGFR/MAPK pathway. *J Gastroenterol.* 2012 Jul;47(7):805-13. 査読有

鈴木一幸、小野寺美緒、柿坂啓介、遠藤啓、佐原圭、及川寛太、王挺、遠藤龍人、滝川康裕、血清遊離脂肪酸濃度は肝硬変に置おける血清カルニチン動態を反映する、肝臓、査読有、56 巻 11 号、796-797 (2013).

山下均、王挺、楠堂達也、竹内環、李勇学、エボジアミンは肥満とインスリン抵抗性を改善する、基礎老化研究、査読有、37(1), 21-23 (2013).

〔学会発表〕(計 4 件)

王挺、滝川康裕、肝細胞酸化ストレス誘導に対するカルノシン酸の影響、JDDW、神戸、2014. 抄録発表(肝臓、55、supplement page 2:A621, 2014.)

Takikawa Y, Wang T, Watanabe A, Kakisaka K, Onodera M, Oikawa K. Carnosic acid protects against oxidative stress-induced cytotoxicity in primary hepatocytes, induces tumor cell death, and inhibits TGF β -induced migration and invasion in HepG2 cells. *AASLD*; 2013; Washington DC.

王挺、渡辺亜紗子、葛西和博、滝川康裕、鈴木一幸、IFN/5FU 併用による TGF シグナルへの影響、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013.

王挺、滝川康裕、葛西和博、渡辺亜紗子、鈴木一幸、IFN- γ /5-FU 併用による

TGF の発現量および分泌量変化への影響、JDDW、神戸、2012.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

王挺 (WANG Ting)
岩手医科大学医学部 消化器・肝臓内科
肝臓分野 助教
研究者番号：70416171

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

滝川 康裕 (TAKIKAWA Yasuhiro)
岩手医科大学医学部 消化器・肝臓内科
肝臓分野 教授
研究者番号：50254751