

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790721

研究課題名(和文) 肝組織修復機転におけるSOD1によるNADPHオキシダーゼの制御機序の解明

研究課題名(英文) Regulation of reactive oxidative species (ROS) production in tissue-repairing process in the liver

研究代表者

青山 友則 (Aoyama, Tomonori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10622673

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)：NADPHオキシダーゼ(NOX)の活性異常に伴う過剰なReactive Oxygen Species (ROS)産生は組織修復機転障害を起こす。スーパーオキシドディスムターゼ1(SOD1)はRac1を介してNOXの制御に関与する。本研究ではSOD1とNOXによるROS産生制御と肝組織修復機転の関連を調べた。SOD1変異マウスでは四塩化炭素慢性投与後の肝線維化、ROS産生が増悪した。SOD1の変異は肝星細胞のNOX、Rac1の活性、ROSおよびコラーゲンの産生を増強した。一方、SOD1の変異は肝再生に影響しなかった。肝星細胞でSOD1がNOXを制御しROS産生に重要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Hepatic stellate cells (HSCs) and Kupffer cells (KCs) have important roles in tissue-repairing process in the liver. Impaired this process caused by excessive reactive oxygen species (ROS) induces liver fibrosis and regeneration failure. NADPH oxidase (NOX) generates ROS. The NOX components form an active complex, including Rac1. Superoxide dismutase 1 (SOD1) interacts with the NOX-Rac1 complex. To clarify the interaction of SOD1-NOX-Rac1 in HSCs and KCs, we investigated liver fibrosis and regeneration using SOD1 mutant mice. Enhanced liver fibrosis and ROS production were found in SOD1 mutant mice treated by chronic carbon tetrachloride injections. In HSCs, SOD1 mutation induced excessive Rac1 activity, thereby causing enhanced NOX activation, ROS and collagen generation. Liver regeneration was not changed in SOD1 mutant mice. In conclusion, SOD1 regulates Rac1 and NOX activity in HSCs. SOD1-NOX-Rac1 interaction has a pivotal role in ROS generation of HSCs.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝組織修復機転 肝星細胞 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1)慢性的な肝障害は、コラーゲンの産生異常と肝再生不全に代表される肝の組織修復機転障害を引き起こし、肝線維化に進展する。進行した肝線維症に対する治療方法は未だ確立されておらず、その治療方法としては肝移植のみであることが現状である。したがって、肝線維化の阻止および線維化の改善をターゲットとした治療方法の確立が肝臓医にとって急務である。

(2)Reactive Oxidative Species(ROS)のバランス変化に伴う酸化ストレスは、コラーゲン産生の重要な細胞である肝星細胞の機能異常を惹起し、肝線維化進展を引き起こす。また、肝再生の初期段階として肝在住マクロファージである Kupffer 細胞の適切な活性化が必要であるが、ROS 産生はマクロファージの活性にも関与する。

(3)一方、NADPH オキシダーゼ (NOX) は細胞膜に存在し、酸素をスーパーオキシドに変換するが、NOX の活性異常に伴う過剰な ROS 産生は肝線維化や肝再生不全をはじめとした組織修復機転障害を誘導する。NOX ファミリーは NOX1 から NOX5 および Duox1、Duox2 から構成されるが、近年肝星細胞においては NOX1、Kupffer 細胞では NOX2 の活性がそれぞれの適切な ROS 産生制御に重要であることが報告された (Paik et al, Hepatology, 2010)。また NOX4 については TGF- β シグナルの下流に位置し、コラーゲン産生に重要であることが報告されている。しかし、それら NOX そのものの制御機序については不明である。

(4)他方、スーパーオキシドディスムターゼ 1(SOD1)はスーパーオキシドを過酸化水素に変換するが、その変異は家族性筋萎縮性側索硬化症 (家族性 ALS) の原因として知られている。SOD1 は GTP 結合タンパク質である Rac1 と複合体を形成し、NOX を活性化させるが、脳内のグリア細胞において SOD1 の変異は Rac1 との複合体形成異常を介し、NOX の活性異常を誘導し過剰な ROS 産生を引き起こすことが明らかになった (Harras MM et al, J Clin Invest 2008)。

(5)以上のことより、SOD1 が NOX の制御に極めて重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

SOD1 および NOX は臓器を問わず生体内の各々の細胞に存在することから、肝組織修復機転に重要な肝星細胞や Kupffer 細胞の ROS 産生制御においてもグリア細胞と同様な機序で SOD1 が NOX を制御していることが想定された。以上より本研究では SOD1 と NOX による ROS 産生の制御と肝組織修復機転 (肝線維化および肝再生) との関連を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)野生型マウスに対して四塩化炭素慢性投与による肝線維化モデルを作成し、線維肝よ

り肝細胞・Kupffer 細胞および肝星細胞を単離した。同様に正常肝からもそれぞれの細胞を単離し SOD1 の発現変化をリアルタイム PCR および蛍光免疫染色にて比較検討した。

(2)変異 SOD1 マウスおよび野生型マウスに四塩化炭素の慢性投与 (週 2 回、合計 12 回) を行い肝線維化モデルを作成した。肝線維化を Sirius red 染色にて評価した。肝組織中の肝星細胞活性化の評価のため、肝組織中の α -SMA 発現を免疫染色および western blot にて評価した。また、線維化関連因子をリアルタイム PCR にて測定した。一方、それぞれのマウスに NOX1 および NOX4 阻害剤 (NOX1/NOX4 阻害剤) を投与し線維化抑制効果について検討した。

(3)肝組織中の Kupffer 細胞数および活性化を F4/80 免疫染色および肝組織中 CD68mRNA 発現にて検討した。

(4)肝組織中脂質過酸化 (ROS 産生の指標) を、4HNE 免疫染色および 2-チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) を測定し検討した。

(5)肝星細胞における NOX1 と NOX4 の関連を調べるため、NOX1 欠損マウスおよび野生型マウスより肝星細胞をコラゲナーゼ灌流法にて単離し、アンジオテンシン II (NOX を活性化させる作用を有する) で刺激し NOX4 の発現をリアルタイム PCR にて測定した。

(6)変異 SOD1 マウスおよび野生型マウスより肝星細胞を同様に単離し、アンジオテンシン II にて刺激し、NOX1、NOX4 および線維化関連因子の発現をリアルタイム PCR にて測定した。また、アンジオテンシン II 刺激後の ROS 産生を DCFDA により測定した。さらに変異 SOD1 肝星細胞および野生型肝星細胞における Rac1 の活性の EILSA 法により検討した。

(7)変異 SOD1 肝星細胞および野生型肝星細胞の活性化そのものを評価するため、Collagen-GFP promoter driven トランスジェニックマウス (Col-GFP マウス) を変異 SOD1 マウスと掛け合わせ、変異 SOD1 Col-GFP マウスを作製した。野生型 Col-GFP マウスおよび変異 SOD1 Col-GFP マウスより肝星細胞を単離し、collagen の発現を GFP 陽性細胞数にて評価した。

(8)NOX4 が TGF- β の下流に位置することから、SOD1 の変異と TGF- β シグナルとの関連についてリコンビナント TGF- β (rTGF) を用いて検討した。

(9)肝再生の検討のため、変異 SOD1 マウスおよび野生型マウスに対して肝再生の検討方法として確立されている 70%肝切除を行い、その後の肝再生について BrdU および PCNA による免疫染色にて検討した。

4. 研究成果

(1)線維肝における SOD1 の各細胞の発現は、正常肝と比べ、肝星細胞で有意に増強したが、それ以外の細胞では変化がなかった。

SOD1 は肝線維化進展において特に肝星細胞で重要な役割を担うことが考えられた。

(2)四塩化炭素慢性投与による肝線維化は変異 SOD1 マウスで野生型マウスと比べ肝線維化の増悪を認めた。一方、NOX1/NOX4 阻害剤の投与によりそれぞれのマウスで肝線維化は改善し、線維化の程度は変異 SOD1 マウスと野生型マウスで同程度であった。また、肝星細胞活性化の指標である α -SMA の発現も同様な傾向であった。

SOD1 が変異することにより肝線維化は増悪するが、NOX1/NOX4 の阻害により NOX1/NOX4 阻害剤を投与された野生型マウスと同程度の肝線維化まで減弱したことは SOD1 の変異により主に NOX1 および NOX4 の活性異常が引き起こされていることを示唆した。(Fig.1)

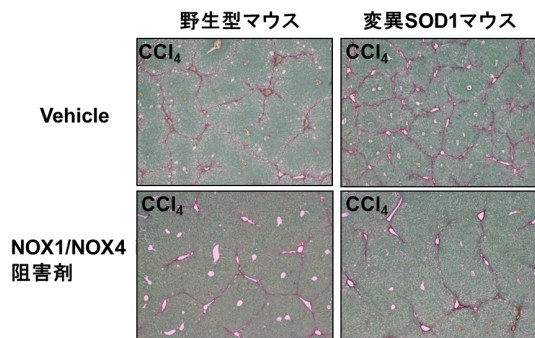


Fig.1 四塩化炭素慢性投与後の肝線維化

(3)四塩化炭素を慢性投与された変異 SOD1 マウスでは同様な野生型マウスと比べ、F4/80 および CD68 の発現が増強したが、NOX1/NOX4 阻害剤の投与により、NOX1/NOX4 阻害剤を投与された野生型マウスと同等なレベルまで F4/80 および CD68 の発現が減弱した。

(4)(2)および(3)と同様に肝内の脂質過酸化についても変異 SOD1 マウスでは野生型マウスと比べ増悪していたものの、NOX1/NOX4 阻害剤により NOX1/NOX4 阻害剤を投与された野生型マウスと同等なレベルまで脂質過酸化が減弱した。

SOD1 の変異により肝内の ROS 産生が増強し、肝線維化、炎症の増悪が惹起された。しかし、これらの減少は NOX1/NOX4 の阻害により省略された。

(5)アンギオテンシン II 刺激による NOX4 の発現は野生型肝星細胞と比べ、NOX1 欠損肝星細胞で減弱した。

肝星細胞において NOX4 の発現には NOX1 が必要であることが示唆された。

(6) 変異 SOD1 肝星細胞では野生型肝星細胞と比べアンギオテンシン II 刺激による NOX1、NOX4 の発現増強を認めた。(Fig.2)

変異 SOD1 肝星細胞では野生型肝星細胞と比べ ROS 産生が増強した。(Fig.3)

変異 SOD1 肝星細胞では野生型肝星細胞と比べ collagen 1(I)mRNA の発現増強を認めた。(Fig.4)

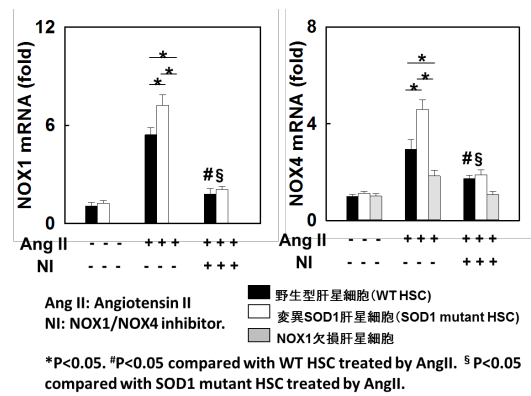


Fig.2 肝星細胞における NOX1 および NOX4 の発現

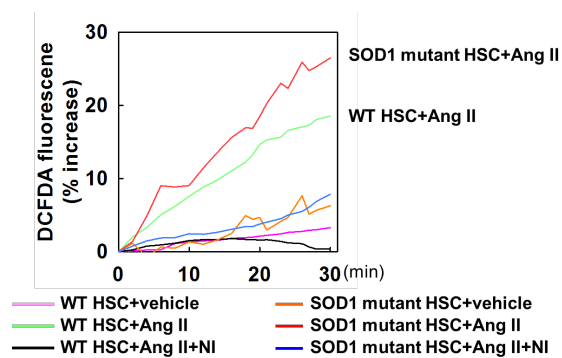


Fig.3 肝星細胞におけるアンギオテンシン II 刺激後の ROS 産生

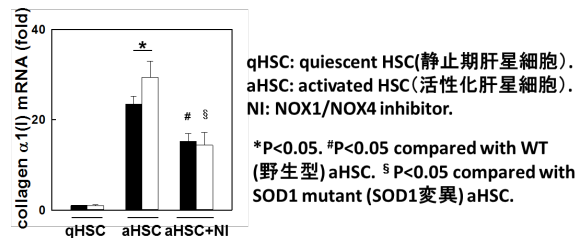


Fig.4 肝星細胞における collagen 1(I) mRNA の発現

変異 SOD1 肝星細胞では野生型肝星細胞と比べ Rac1 の活性化を認めた。

~ の差異は NOX1/NOX4 阻害剤の添加により認められなくなった。一方、NOX1/NOX4 阻害剤添加による Rac1 の活性変化は認めなかった。

SOD1 の変異により Rac1 の活性 NOX1 の活性 NOX4 の活性を経て ROS 産生が増強し肝星細胞の過剰活性が誘導されることが明らかとなった。一方、NOX1/NOX4 阻害剤は Rac1 の活性を介さず変異 SOD1 肝星細胞の活性化を抑制した。

(7)変異 SOD1 Col-GFP マウスおよび野生型 Col-GFP マウスより単離した肝星細胞における GFP 陽性細胞数は、野生型 Col-GFP 肝星細胞と比べて、変異 SOD Col-GFP 肝星細胞で増加を認めた。一方、NOX1/NOX4 阻害剤の添加により変異 SOD1 肝星細胞 GFP 陽性細胞数は、

NOX1/NOX4 阻害剤を添加した野生型肝星細胞の GFP 陽性細胞数と同等なレベルまで減少した。(Fig.5)

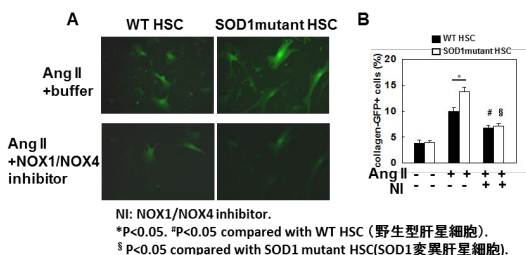


Fig.5 肝星細胞における Collagen-GFP 陽性細胞の変化

以上より肝星細胞において SOD1 が NOX1 および NOX4 を制御し ROS 産生を調節していることが分かった。また SOD1 の変異があったとしても NOX1 および NOX4 を阻害することにより SOD1 の変異によって認められた変化が減弱することが明らかとなった (Fig.6)

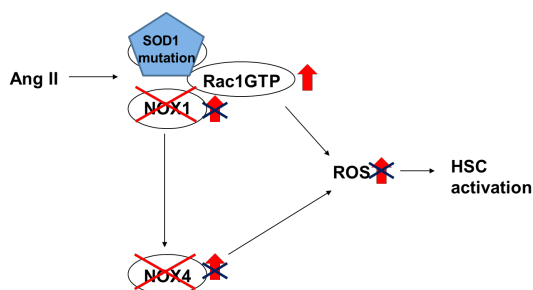


Fig.6 肝星細胞における SOD1-NOX1-NOX4 の相互関係

解説：SOD1 は NOX1、Rac1 と複合体を形成するが、この SOD1 に変異が起きると、NOX1 と Rac1 あるいは NOX4 を介して ROS の過剰産生が誘導され肝星細胞の活性化が増強することが考えられた。一方で、SOD1 の変異があったとしても NOX1/NOX4 を阻害することによってこれらの増強は減弱された。

(7)NOX1 欠損肝星細胞において rTGF 刺激における NOX4 の発現は野生型肝星細胞と同等であった。(5)の結果と総合すると、SOD1 の変異による NOX4 の活性化機序は、アンギオテンシン II 刺激下では NOX1 を介するが、rTGF 刺激下では NOX1 非依存性に活性化することが考えられた。

(8)70%肝切除後の肝再生は変異 SOD1 マウスおよび野生型マウスで明らかな差を認めなかった。SOD1 の変異は肝再生には影響しないことが示唆された。肝切除後の肝再生においては Kupffer 細胞の適切な活性化が重要であるが、SOD1 の変異は肝切除後における Kupffer 細胞の活性化に影響しないことが推察された。

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 3 件)

(1)Paik YH, Kim J, Aoyama T, De Minicis S, Batailler R, Brenner DA. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. *Antioxid Redox Signal*. 2014 10;20(17):2854-72. 査読あり doi: 10.1089/ars.2013.5619.

(2)青山友則、渡辺純夫、デービット ブレナー. 肝星細胞における SOD1 と NADPH オキシダーゼ (NOX) の相互関係と ROS 産生. *アルコールと医学生物学* vol 32.p56-59.2013 年. 査読なし

(3) Aoyama T, Paik YH, Watanabe S, Laleu B, Gaggini F, Fioraso-Cartier L, Molango S, Heitz F, Merlot C, Szyndralewicz C, Page P, Brenner DA. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent. *Hepatology*. 2012;56(6):2316-27. 査読あり doi: 10.1002/hep.25938.

〔学会発表〕(計 4 件)

(1)青山友則、SOD1 変異による肝星細胞活性化増強と TGF- β シグナルとの関連、第 17 回日本肝臓学会大会、2013 年 10 月 9 日、新高輪プリンスホテル (東京都・品川区)

(2)青山友則、NADPH オキシダーゼ (NOX) 1 による NOX4 の誘導と肝星細胞活性化、第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 6 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

(3)青山友則、肝星細胞における NADPH オキシダーゼ (NOX) による ROS 産生とそのメカニズム、第 39 回日本肝臓学会東部会、2012 年 12 月 7 日、新高輪プリンスホテル(東京都・品川区)

(4)青山友則、SOD1 による NADPH オキシダーゼ (NOX) の制御と肝星細胞活性化：NOX1/NOX4 阻害剤による肝線維化進展抑制の検討、第 48 回日本肝臓学会総会、2012 年 6 月 8 日、ホテル日航金沢 (石川県・金沢市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

青山友則 (AOYAMA, Tomonori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：1 0 6 2 2 6 7 3

(2)連携研究者

デービット ブレナー (Brenner, David)

カリフォルニア大学サンディエゴ校・医学部・教授