

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460983

研究課題名(和文) NASHの病態におけるNrf2とミトコンドリア異常の関与メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analyses of involvement mechanism of NRF2 and mitochondrial abnormality in pathophysiology of NASH

研究代表者

川合 弘一 (KAWAI, Hirokazu)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80419291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝モデルマウスでは肝ミトコンドリアDNA(mtDNA)のコピー数は増加傾向だったが、ダイエット食により正常レベルにまで戻った。一方、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスではmtDNAコピー数は減少した。これらのモデルにおけるmtDNAコピー数は、ミトコンドリアの生合成・分解に関連する遺伝子発現量の変化により制御されていると考えられた。NASHではミトコンドリア数の変化を伴った酸化ストレスを介して肝病変が進展していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：An increasing tendency of mitochondrial DNA (mtDNA) copy number was found in the liver of a rodent model of fatty liver, however the number was normalized with diet intervention. In contrast, mtDNA copy number was decreased in the liver of a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). MtDNA copy number in these models appeared to be regulated by altering a balance between expression levels of genes related to biogenesis and degradation of mitochondria. It has been revealed that pathophysiological progression in NASH is closely related to oxidative stress along with alteration of mtDNA copy number.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 脂肪肝 ミトコンドリアDNA 酸化ストレス ダイエット

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態形成には、活性酸素種 (ROS) やフリーラジカルによる酸化ストレスが強く関与すると考えられている。Nrf2 は Nqo1 などの標的遺伝子の活性化を介して抗酸化作用を増強する核内転写因子であり、NASH においても酸化ストレスに対して細胞内環境を保護する役割をはたしていると推定される。また NASH ではミトコンドリア数・機能の異常が存在し、ROS 産生にも強く影響すると考えられているが、Nrf2 は、ミトコンドリア構成蛋白発現量の増加、ミトコンドリア DNA (mtDNA) や蛋白産生を制御する mitochondrial transcription factor A (mtTFA) の発現量を増加する作用ももつ。他にも多くの遺伝子が関わってミトコンドリアが生合成される。一方で近年、オートファジー、マイトファジーというミトコンドリアの品質管理とともに数的コントロールに関わる分解システムが NASH の病態とも関係することがわかってきた。

(2) ミトコンドリアのターンオーバーは非常に速いため、ミトコンドリア自体またはその制御システムのわずかな異常でも短時間でミトコンドリアの極端な増加または減少を招き、定量的評価により異常を検出しやすいと考えられる。mtDNA コピー数の測定は病態進展度や発癌リスクの評価法として合理的と思われるが、NASH における mtDNA コピー数の変化や、その機序はいまだ解明されていない。

### 2. 研究の目的

脂肪肝と NASH のモデルマウスを用いて、病態進展と mtDNA コピー数変化との関連、およびミトコンドリア生合成・分解バランスの観点から mtDNA コピー数を規定するメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 6 週齢の C57/BL6 マウスを用いて、通

常食 (Chow) 群、メチオニン・コリン欠乏食 (MCD) 群、高脂肪食 (HFD) 群、食事介入 (DI) 群の 4 群のモデルマウスを作成し、0 週、2 週、6 週、10 週で検体臓器の採取を行った。(図 1)

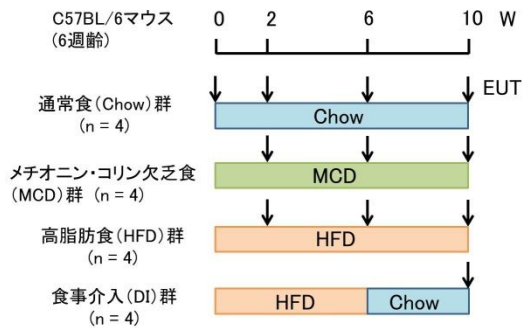


図1 プロトコール

(2) 各群の体重測定、血液検査、肝および大腿筋の組織学的評価、肝内 8-Hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の蛍光免疫染色による肝内酸化ストレスの評価を行った。また、肝・骨格筋 mtDNA コピー数測定は、mtDNA 上に存在する ND1 と核 DNA 上に存在する  $\beta$ -actin をクローニングして標準曲線を作成した後、肝と骨格筋から抽出した DNA を用いて、リアルタイム PCR により各遺伝子コピー数の絶対定量を行い、核ゲノム 1 コピーあたりの mtDNA コピー数を算出した。さらに、肝内 mtDNA コピー数制御関連遺伝子発現量の評価として、定量的 RT-PCR により、生合成系関連遺伝子である PGC1、Tfam、NRF1、NRF2、Keap1、分解系関連遺伝子である LC3B、Parkin、Pink1 の発現量を測定し、ウェスタンブロットでは PGC1、LC3B の発現量を測定した。統計学的検定では  $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

### 4. 研究成果

(1) 体重は Chow 群に比べ、MCD 群で有意に低下、HFD 群では有意に増加したが DI 群では Chow 群に近いレベルまで低下した (図 2)。

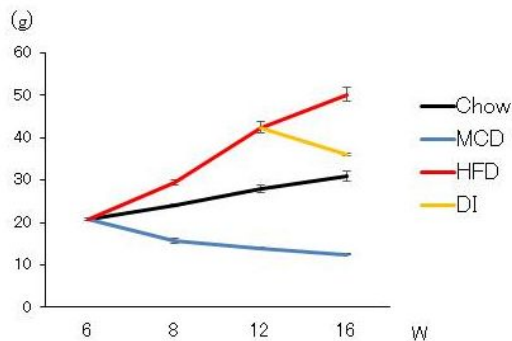


図2 体重変化

ALTはChow群に比べ、MCD群では有意に上昇、HFD群も増加傾向となったがDI群では改善していた。血糖は、Chow群に比べMCD群は有意に低下、HFD群は増加傾向だった。

(2) 肝組織像では、MCD群で脂肪沈着、炎症細胞浸潤、肝線維化を認めた。HFD群でも脂肪沈着と軽度肝線維化を認めたが、DI群でいずれも改善していた。骨格筋線維断面積は、MCD群で有意に減少していた(図3)。

(3) 肝臓における8-OHdG蛍光免疫染色では、Chow群に比べ、MCD群では有意に強く染色された。HFD群でもMCD群よりはやや弱いものの、Chow群より有意に強く染色され、DI群ではChow群レベルまで改善していた。

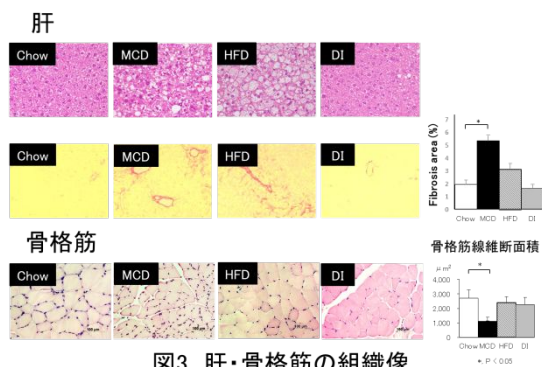


図3 肝・骨格筋の組織像

(4) 肝mtDNAコピー数は、Chow群に比べ、MCD群で有意に減少し、HFD群では増加傾向であったが、DI群ではChow群レベルまで低下した。また、骨格筋でも同様の傾向を認めた(図4)。

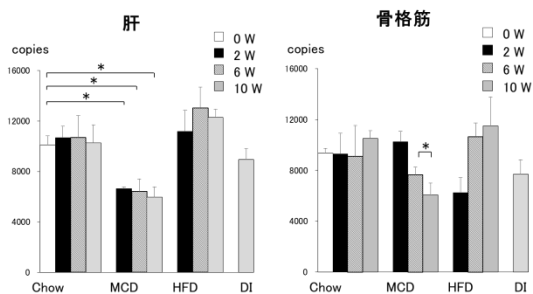


図4 肝・骨格筋のmtDNAコピー数

(5) 定量的RT-PCR法によりmtDNAコピー数に関する遺伝子のmRNA発現量を評価すると、MCD群では生合成系、分解系遺伝子とも増加していた。一方、HFDはいずれも減少傾向にあったが、DI群では回復傾向を認めた(図5)。

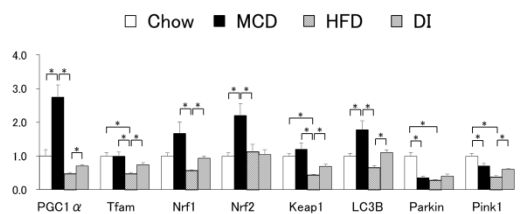


図5 定量的RT-PCRによるmRNA発現量

(6) ウェスタン・ブロットによりmtDNAコピー数を増加させるPGC1とLC3Bの蛋白発現量を評価すると、PGC1には有意差を認めなかったが、LC3BはHFD群で増加し、DI群でさらに増加していた(図6)。

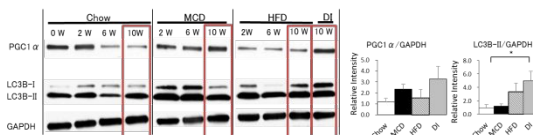


図6 ウェスタン・ブロットによる蛋白発現量

(7) 結果をまとめると、mtDNAコピー数は、MCD群で減少、HFD群で増加傾向となる。生合成系遺伝子mRNAレベルは、MCD群においては増加・不変、分解系(LC3B)は有意に増加し、HFD群においては生合成系、分解系ともに低下傾向となる。mtDNAコピー数は、これらのミトコンドリア生合成系・分解系遺伝子発現量のバランスにより、図7のように規定されている可能性があるかと推定された。

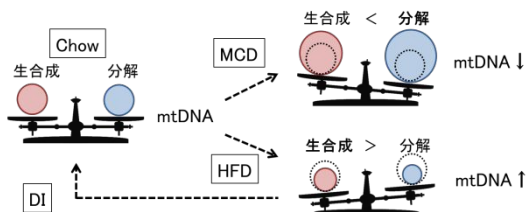


図7 mtDNAコピー数と関連遺伝子発現量

(8) 本研究により、mtDNA コピー数変化は、ミトコンドリア生合成・分解関連遺伝子発現量の複雑なバランスにより規定されている可能性が示唆された。MCD 群と HFD 群では肝脂肪蓄積という共通した事象が存在するにも関わらず、mtDNA コピー数と関連遺伝子発現は全く異なった変化を起こすことが判明し、病態形成メカニズムの違いを示す所見と思われた。これまで mtDNA コピー数が増加する、もしくは減少する様々な疾患が報告されているが、その機序についてまで検討した報告は少なく、本研究により機序の一端を解明できたことは意義深いと考える。本研究結果を元に、将来的に NASH と脂肪肝における新規病態診断法、重症度・進行度評価法の確立、およびミトコンドリア数の制御による治療の可能性を探っていきたい。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

荒生祥尚、川合弘一、寺井崇二、NASH の病態進展におけるミトコンドリア DNA コピー数変化の差異の解析と病態解析、第 52 回日本肝臓学会総会、2016 年 5 月 19 日、ホテルニューオータニ幕張(千葉県・千葉市)

荒生祥尚、川合弘一、寺井崇二、脂肪肝と NASH のモデルマウスにおいて肝・骨格筋ミトコンドリア DNA コピー数と肝病態進展は関連する、第 24 回肝病態生理研究会、2016 年 5 月 18 日、ホテルニューオータニ幕張(千葉県・千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川合 弘一 (KAWAI, Hirokazu)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号： 80419291

##### (2) 研究分担者

須田 剛士 (SUDA, Takeshi)  
新潟大学・医歯学総合病院・教授  
研究者番号： 10361916

##### (3) 連携研究者

なし