

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460492

研究課題名(和文)細胞間コミュニケーションを介したNASH進展制御に関わる分子基盤

研究課題名(英文)The role of gap junctional intercellular communication in NASH and its-related hepatocarcinogenesis

研究代表者

内木 綾 (NAIKI-ITO, Aya)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20509236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞ギャップ結合タンパクCx32および抗酸化物質luteolinの、NASHおよび肝発がんに対する修飾作用を、Cx32ドミナントネガティブトランスジェニック(Cx32^{-Tg})ラットを用いて検討した。肝の活性酸素、炎症性サイトカイン発現、脂肪肝炎、線維化と前癌病変の誘導は、野生型に比較してCx32^{-Tg}ラットで有意に強く、いずれのジェノタイプにおいてもluteolin投与により減弱した。肝発がん感受性と関連した遺伝子発現変化を解析した結果、Bex1が前癌病変内で高発現していることがわかった。肝細胞株を用いた機能解析では、Bex1がNF- κ Bシグナルを解して細胞増殖を亢進することが解明された。

研究成果の概要(英文)：NASH has the potential to lead to the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). To clarify the role of hepatocyte gap junction protein, Cx32 and luteolin on the progression of NASH and hepatocarcinogenesis, Cx32 dominant negative transgenic (Tg) were used. Steatohepatitis, fibrosis, inflammatory cytokine expression, reactive oxygen species and number of preneoplastic foci were greater in Tg as compared with Wt rats, and significantly suppressed by luteolin in both genotypes. Microarray analysis identified Bex1 as an up-regulated gene in Tg rat liver. in situ hybridization revealed that increased Bex1 mRNA was localized in preneoplastic foci in Tg rats. Moreover, Bex1 increased cell proliferation through activation of NF- κ B signaling in rat hepatocyte and HCC cell lines. These results show that Cx32 and luteolin have suppressive roles in inflammation, fibrosis and hepatocarcinogenesis during NASH progression, suggesting a potential therapeutic application for NASH.

研究分野：発がん

キーワード：NASH 細胞間コミュニケーション 疾患モデル フラボノイド 肝発がん

1. 研究開始当初の背景

食生活やライフスタイルの欧米化による肥満の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) の発症率が近年増加の一途をたどっており、検診受診者の約 30%に見られる。肝への脂肪蓄積を生じる NAFLD の約 2~3 割は、肝細胞の壊死、炎症および線維化を生じる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に進展するといわれており、肝硬変や肝がんの発症母地となりうる危険性が明らかになりつつある。NASH の病態進行には酸化ストレス上昇、加齢すなわちホメオスタシス低下の関与が指摘されており、抗酸化物質の食事や投薬による摂取は NASH および NASH に関連した肝がんの予防や治療に有効である可能性が示唆される。

一方、細胞間結合装置の一つであるギャップ結合は、Connexin (Cx) タンパクから構成され、隣接細胞間のコミュニケーションを介し組織や生体のホメオスタシスを担っている。我々は肝で発現している Cx32 のドミナントネガティブトランスジェニック (Cx32 Tg) ラットを作製し、Cx32 Tg では同腹の野生型 (Wt) ラットと比較して肝前がん病変の形成が促進されることを明らかにした。Cx32 Tg ラットで認めたこの現象は、加齢 Wt ラットで生理的に起こる Cx32 発現の低下と肝がん性の亢進と酷似していることもわかってきた。従って、Cx32 Tg ラットモデルは、加齢動物の形質を示す点で、NASH の病態進行のリスクを表現しており、NASH および NASH 関連肝がんの病態や化学予防効果の解析に有用なモデルであると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Cx32 および luteolin の NASH および NASH 関連肝がんに対する役割を解明するとともに、肝がんに関わる遺伝子を同定することにある。Cx32 Tg および同腹の Wt ラットに対して methionine-choline deficient (MCD) 飼料摂取により NASH を誘導し、NASH に対する luteolin の予防効果の検討と Cx32 の役割の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 動物の繁殖

Cx32 Tg ラットは当研究室で開発されたトランスジェニック動物であり、自家繁殖により本研究で用いる実験動物を得た。すなわち Cx32 Tg 雄ラットと Wt 雌ラットの交配により出生した雄に対して、PCR により Cx32 Tg および Wt ラットにジェノタイプし、両者を実験に使用した。すべての動物実験は、本学医学研究科動物実験施設 SPF にて行った。

(2) 動物実験プロトコール

10週齢雄性 Cx32 Tg および Wt ラットに diethylnitrosamine (DEN, 200 mg/kg) を単

回腹腔内投与し、DEN 投与2日後から、MCD 飼料を投与した (1群19匹)。各々に luteolin (100ppm) 混餌投与群を設け、実験開始2週間 (各群4匹) と、12週間後 (各群15匹) に肝組織を採取した。

(3) NASH および肝前癌病変の組織学的評価

肝組織における脂肪変性、炎症、肝細胞障害および線維化の程度と肝前癌病変の評価を行った。肝組織をホルマリン固定の後、HE 染色標本および AZAN 染色標本 (膠原線維染色) を作製し、脂肪変性と炎症細胞浸潤の指標となる NAFLD activity score; NAS 指標や線維化の程度を組織学的に定量した。脂肪変性に関しては、肝凍結組織を用いた Oil red O 染色 (脂肪染色) による確認も行った。肝前癌病変は、GST-P 免疫染色による陽性細胞巢の数 (/cm²) および面積 (mm²/cm²) を蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キーエンス) にて定量化した。

(4) NASH における活性酸素 (ROS) と炎症性サイトカインの定量

肝凍結組織を用いて、活性酸素に反応して蛍光発色する dihydroethidium (DHE) による染色を行い、核における蛍光シグナルを数値化し、NASH 肝組織における ROS の定量を行った。肝における炎症性サイトカインの mRNA 発現量を定量 RT-PCR により確認した。炎症性サイトカインの下流に存在する NFκB シグナルをウエスタンブロットにより解析した。

(5) NASH における Cx32/Cx26 タンパク発現変化の解析

MCD 飼料投与後2週間および12週間後の肝凍結組織を用いて、ウエスタンブロットおよび蛍光免疫組織染色を行い、NASH に伴う Cx32/Cx26 タンパクの発現および局在の変化を観察した。

(6) マイクロアレイ解析

MCD 飼料を12週間投与した Cx32 Tg および Wt ラットの肝を用いて、cDNA マイクロアレイ解析を行った。Luteolin 投与あるいはジェノタイプにより変化する遺伝子群を抽出し、NASH 関連肝がん性に関与する遺伝子の解析を試みたところ、Cx32 Tg で Wt ラットより発現が高く、luteolin 投与により発現低下し、肝がん性と連動して発現変動する遺伝子として、brain expressed, X-linked 1 (Bex1) が同定された。

(7) *in situ* hybridization による Bex1 mRNA の NASH における局在

NASH 関連肝がんに対する Bex1 の役割を検討するため、*in situ* hybridization を行った。NASH における Bex1 mRNA の発現局在を検討した。また、発現強度を 0、陰性; 1、弱陽性; 2、中等度陽性に分類し、群間で比較した。

(8) 肝細胞および肝癌細胞の増殖能に対する Bex1 の機能解析

ラット肝癌細胞株 HSU-C2 および HSU-C6 に対して、siRNA を用いて Bex1 ノックダウンを行い、肝癌細胞の増殖能や増殖シグナル

タンパク発現に対する影響を検討した。また、ラット正常肝細胞 Clone 9 に Bex1 遺伝子を導入した安定細胞株も作製し解析した。

4. 研究成果

(1) MCD 飼料によるラット NASH の誘導と luteolin と Cx32 による予防効果 (図 1)

2 週間の MCD 飼料投与により、肝には NASH の組織変化のうち脂肪変性が誘導され、Cx32 Tg および Wt ラット両者でその程度に明らかな差を認めなかった。Wt ラットでは、対照群と比較して luteolin 投与群で有意に脂肪変性の抑制を認めた。12 週時における脂肪変性は、2 週時と同様に Wt ラットにおいて luteolin 投与による抑制効果が見られた。炎症の程度は、Wt と比較して Cx32

Tg ラットで有意に増強され、いずれのジェノタイプにおいても luteolin 投与により有意な改善を認めた。その結果、脂肪変性と炎症の程度を表す NAS は、Cx32 Tg、Wt ラットでそれぞれ 6.6 ± 1.2 、 5.6 ± 0.5 と、Cx32 Tg ラットで有意に高値を示した。また、luteolin 投与により Cx32 Tg、Wt ラットでそれぞれ 5.5 ± 1.0 、 4.1 ± 1.0 と有意に低下した。線維化は Wt ラットに比較して Cx32 Tg ラットで顕著であり、luteolin 投与による改善を認めた。

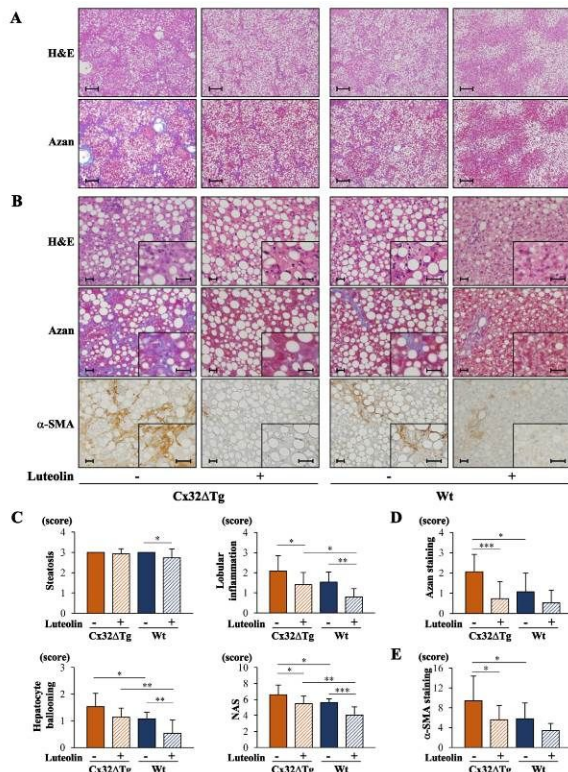


図 1. Luteolin による脂肪肝と線維化の抑制 (MCD 飼料投与後 12 週間の Cx32ΔTg および Wt ラットの肝組織). (A) (B) H&E, Azan 染色 (線維化) および α-SMA 免疫染色. Scale bars: (A) 200 μm; (B), 25 μm. (C) 脂肪肝 (NAS), (D) 線維化 (Azan) の程度および (E) α-SMA 陽性領域の定量. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

(2) 肝前癌病変に対する luteolin の予防効果

(図 2)

DEN 投与および MCD 飼料投与により、すべての動物に肝前癌病変である GST-P 陽性細胞巣が誘発された。GST-P 陽性細胞巣の数は、Cx32 Tg ラットにおいて luteolin 投与により有意に減少した。一方、面積には有意な群間差は見られなかった。

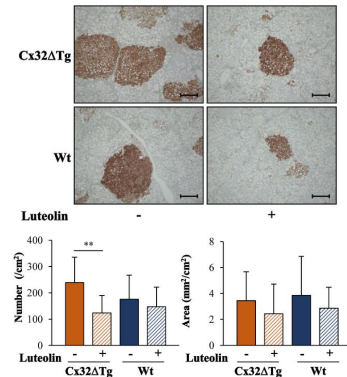


図 2. Cx32ΔTg ラットにおける luteolin による GST-P 陽性細胞巣発生数の抑制. 上段: GST-P 免疫染色. Scale bars: 200 μm. 下段: GST-P 陽性細胞の発生数および面積. **P<0.01

(3) ラット NASH における ROS および炎症性サイトカインの誘導と luteolin と Cx32 による予防効果 (図 3)

DHE 染色の結果、Wt と比較して Cx32 Tg ラットの肝では、ROS 蓄積がより高度で、酸化ストレスが亢進していた。またいずれのジェノタイプにおいても、luteolin 投与群で酸化ストレスの減少が観察された。定量 RT-PCR の結果、炎症に関連する炎症性サイトカイン (Tnf-α, Ifn-γ, Il-18, Il-6, Il-1β) のうち、Il-18 と Il-6 は Cx32 Tg ラットにおいて luteolin 投与群で有意に低下した。線維化に関連する炎症性サイトカイン (Tgf-β, Colla1, Timp1, Timp2, Ctgf) の mRNA 発現量は、いずれも Cx32 Tg ラットにおいて luteolin 投与群で有意な低下を認めた。また、Il-6, Tgf-β, Colla1, Ctgf の mRNA とリン酸化 NFκB タンパクの発現量は、Wt と比較して Cx32 Tg ラットにおいて有意な上昇を認めた。NFκB の阻害作用を有する IκB タンパクの発現は Cx32 Tg ラットにおいて有意に減少していた。

(4) NASH に伴う Cx32/Cx26 タンパクの発現変化 (図 4)

Cx32 および Cx26 タンパクは、肝細胞における主要なギャップ結合タンパクで、正常肝細胞の膜に強発現している。NASH をきたした Wt ラットの肝では、MCD 飼料投与 2、12 週時のいずれにおいても、肝細胞膜上の Cx32 および Cx26 発現は減少しており、NASH の進行度と逆相関関係を示した。一方で、luteolin 投与により Cx32 および Cx26 発現の減少は軽減された。

(5) NASH における遺伝子発現変化の解析

cDNA マイクロアレイ解析の結果、Cx32 Tg で Wt ラットより発現が高く、luteolin 投与により発現低下する、肝発がん性と連動して発現変動する遺伝子として、Bex1 が同定され (Cx32 Tg + luteolin / Cx32 Tg 発現比: 0.21)、NASH 関連肝発がん性への関与が示

唆された。

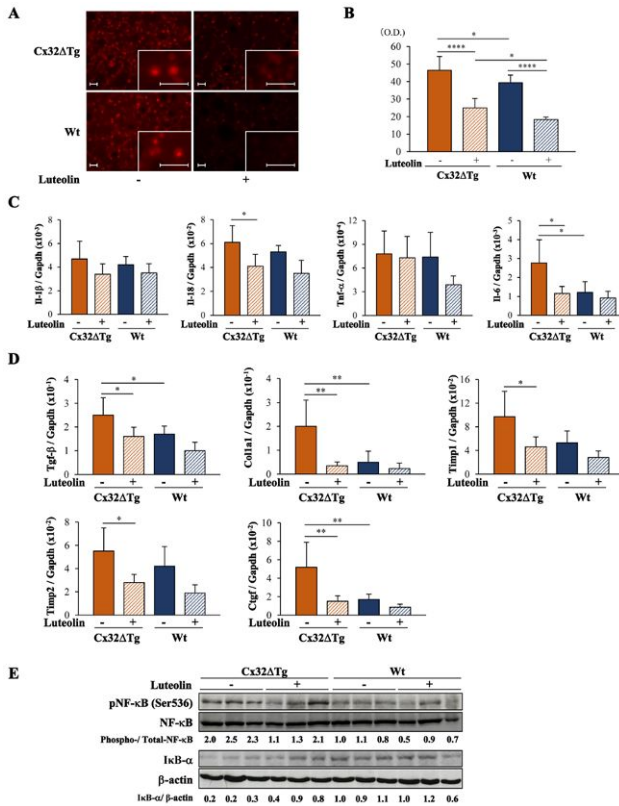


図3. Cx32機能抑制によるNASHの酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン発現の上昇とluteolinによる減少 (MCD飼料投与後12週間) . Scale bars: 25 μ m . (A)(B) Dihydroethidium染色 (A)肝組織像および(B)蛍光強度定量値 (518/605 nm) . (C)(D)肝における炎症性サイトカインmRNA発現量 (定量的RT-PCR) . (E) NF- κ B, pNF- κ BおよびI κ B- α のタンパク発現 (Western blotting) .

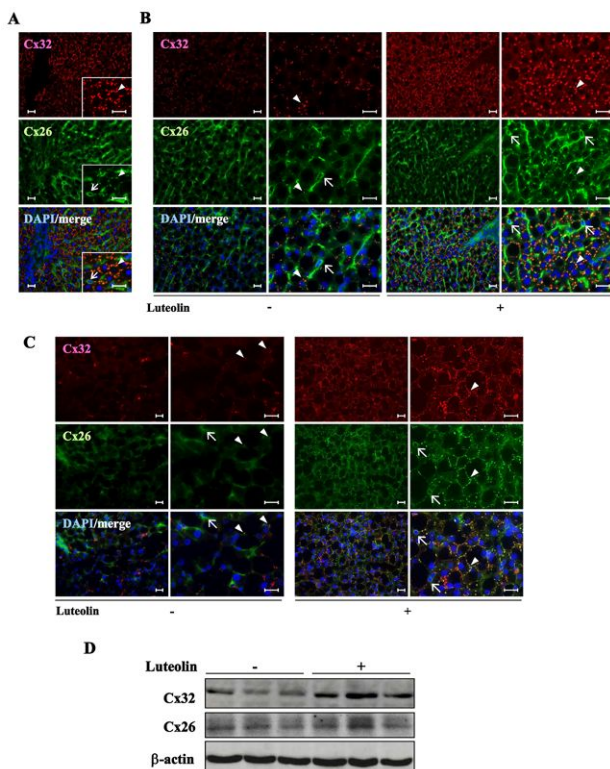


図4. NASHの進行によるCx32およびCx26タンパク発現の減少とluteolinによる予防効果 . (A)-(C)Cx32およびCx26の蛍光二重免疫染色 (A)正常肝 (B)WtラットMCD飼料投与後2週間 (C)12週間 . Scale bars: 25 μ m . 矢印、血管内皮細胞; 矢頭、肝細胞 . (D)Cx32およびCx26のタンパク発現 (Western blotting) .

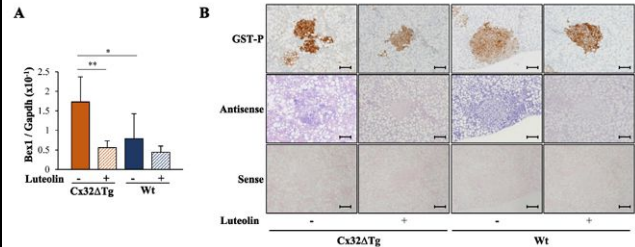


図5. Cx32ΔTgラットのGST-P陽性細胞巢におけるBex1 mRNA発現の上昇とluteolinによる抑制 . (A)定量的RT-PCR (B)*in situ* hybridization . Scale bars: 100 μ m .

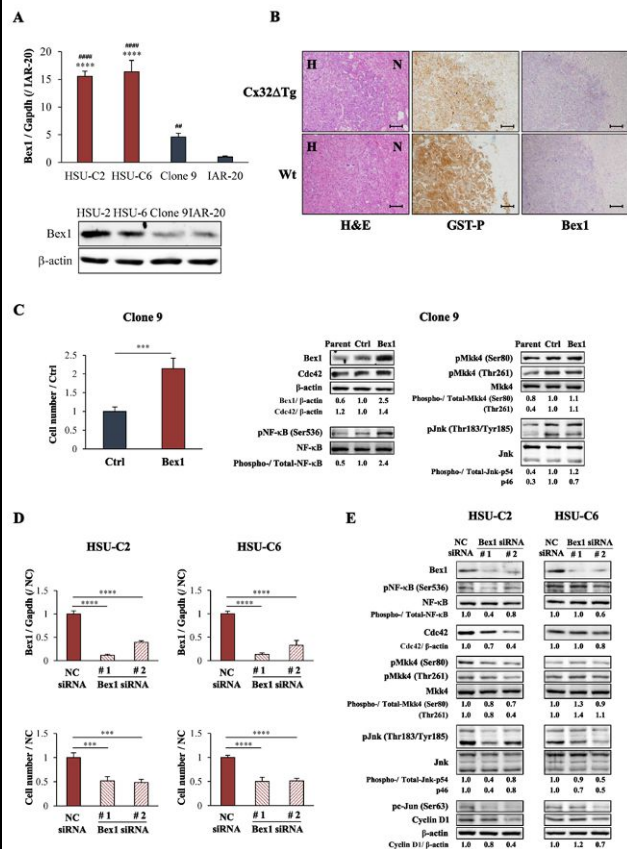


図6. ラット肝癌細胞および肝細胞癌におけるBex1 mRNA発現の上昇と肝細胞および肝癌細胞の細胞増殖に対するBex1の促進作用 . (A)ラット肝癌細胞HSU-C2およびHSU-C6とラット正常肝細胞Clone 9およびIAR-20におけるBex1 mRNA発現 (定量的RT-PCR) およびタンパク発現 (Western blotting) (B)ラット肝細胞癌におけるBex1 mRNA発現 (*in situ* hybridization) (C) Bex1遺伝子導入によるラット肝細胞Clone 9の細胞増殖および増殖シグナルタンパク発現変化 (D) Bex1遺伝子ノックダウンによるラット肝癌細胞HSU-C2およびHSU-C6の(D)細胞増殖および(E)増殖シグナルタンパク発現変化 . Scale bars: 100 μ m .

(6) NASHにおけるBex1 mRNA発現とその局在 (図5)

定量的RT-PCRにより、Bex1の発現はWtと比較してCx32 Tgラットで有意に高く、いずれのジェノタイプにおいてもluteolin投与により減少した。またBex1 mRNAは肝細胞およびGST-P陽性細胞巢に局在することが*in situ* hybridizationにより明らかになった。さらにGST-P陽性細胞巢内のBex1 mRNAの染色強度を検討すると、Cx32 TgラットではBex1が高発現する細胞巢が多く、luteolin投与によりその発現が低下することがわかった。

(7) 肝細胞株および肝癌細胞株の増殖能と増殖シグナルに対するBex1の影響 (図6)

Bex1 は、NASH に発生した前癌病変内に局在していること、ラット正常肝細胞株と比較しラット肝癌細胞株で、また非腫瘍部と比較しラット肝細胞癌組織で Bex1 発現が亢進していることから、肝細胞の腫瘍性増殖能に關与していることが予測された。この仮説を検証するため、はじめにラット正常肝細胞株 Clone 9 に対して、Bex1 遺伝子を導入した。その結果、mock 細胞と比較して、有意な細胞増殖能の上昇とリン酸化 NFκB タンパク発現の増加を認めた。一方、ラット肝癌細胞株 HSU-C2 および HSU-C6 の Bex1 発現をノックダウンした結果、細胞増殖抑制とリン酸化 NFκB タンパクとリン酸化 JNK タンパクの発現低下が見られた。

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9件)

1. Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T, Takahashi S. Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonist, Suppresses Rat Prostate Carcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 17:pii: E2071, 2016. DOI: 10.3390/ijms17122071, 査読有
2. Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S, Mori H, Takahashi S. Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. *Nutrients*. 8:421, 2016. DOI: 10.3390/nu8070421, 査読有
3. Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S, Kondo Y. Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res*. 76:4192-4204, 2016. DOI: 10.1158/0008-5472, 査読有

4. Kato H, Naiki-Ito A, Naiki T, Suzuki S, Yamashita Y, Sato S, Sagawa H, Kato A, Kuno T, Takahashi S. Connexin 32 dysfunction promotes ethanol-related hepatocarcinogenesis via activation of Dusp1-Erk axis. *Oncotarget*. 7:2009-2021, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.6511, 査読有
5. Kato A, Naiki-Ito A, Nakazawa T, Hayashi K, Naitoh I, Miyabe K, Shimizu S, Kondo H, Nishi Y, Yoshida M, Umemura S, Hori Y, Mori T, Tsutsumi M, Kuno T, Suzuki S, Kato H, Ohara H, Joh T, Takahashi S. Chemopreventive effect of resveratrol and apocynin on pancreatic carcinogenesis via modulation of nuclear phosphorylated GSK3 β and ERK1/2. *Oncotarget*. 6:42963-42975, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.5981, 査読有
6. Sagawa H, Naiki-Ito A, Kato H, Naiki T, Yamashita Y, Suzuki S, Sato S, Shiomi K, Kato A, Kuno T, Matsuo Y, Kimura M, Takeyama H, Takahashi S. Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats. *Carcinogenesis*. 36:1539-1549, 2015. DOI: 10.1093/carcin/bgv143, 査読有
7. Suzuki S, Naiki-Ito A, Kuno T, Punfa W, Long N, Kato H, Inaguma S, Komiya M, Shirai T, Takahashi S. Establishment of a syngeneic orthotopic model of prostate cancer in immunocompetent rats. *J Toxicol Pathol*. 28:21-26, 2015. DOI: 10.1293/tox.2014-0050, 査読有
8. Etani T, Suzuki T, Naiki T, Naiki-Ito A, Ando R, Iida K, Kawai N, Tozawa K, Miyata N, Kohri K, Takahashi S. NCL1, a highly selective lysine-specific demethylase 1 inhibitor, suppresses prostate cancer without adverse effect. *Oncotarget*. 6:2865-2878, 2015. DOI: 10.18632/oncotarget.3067, 査読有
9. Naiki-Ito A, Chewonarin T, Tang M, Pitchakarn P, Kuno T, Ogawa K, Asamoto M, Shirai T, Takahashi S. Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. *Prostate*. 75:151-160, 2015. DOI: 10.1002/pros.22900, 査読有

[学会発表](計3件)

1. 加藤寛之、内木綾、不二哲、鈴木周五、佐藤慎哉、久野壽也、高橋智. Connexin32の低下は Dusp1-Erk シグナル制御機構を介しラットエタノール肝発がんを促進する。

第 32 回日本毒性病理学会学術集会, 2016 年 1 月 28 日, サンポートホール高松(香川県高松市)

2. 内木綾、加藤寛之、久野壽也、高橋智. ラット非アルコール性脂肪肝炎および肝発がんにおける connexin 32 の役割と luteolin による予防効果. 第 30 回発癌病理研究会, 2015 年 8 月 26 日、オリビアン小豆島(香川県小豆郡)
3. 内木綾、加藤寛之、久野壽也、高橋智. ラット非アルコール性脂肪肝炎における connexin 32 の役割と luteolin による予防効果. 第 30 回日本毒性病理学会学術集会, 2014 年 1 月 30 日, あわぎんホール(徳島県徳島市)

[その他]

「フラボノイドの一種であるルテオリンが、非アルコール性脂肪肝炎の進行やがん化を予防する/がん化に關与する新規遺伝子の同定」研究成果プレスリリース(2015 年 10 月)
<http://www.nagoya-cu.ac.jp/about/press/press/release/files/169397/271023.pdf>

科学研究費成果事例

http://www.mext.go.jp/component/a_menu/science/detail/_icsFiles/afieldfile/2017/01/06/1372552_02_01.pdf

富山市主催セミナーにおける招待講演

「ルテオリンの非アルコール性脂肪肝炎およびがん化に対する予防効果」(2016 年 1 月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木 綾 (NAIKI-ITO, Aya)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 20509236

(2) 研究分担者

高橋 智 (TAKAHASHI, Satoru)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 60254281

鈴木 周五 (SUZUKI, Shugo)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号: 60363933