

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860499

研究課題名(和文) 原発性胆汁性肝硬変症における転写因子Nrf2の機能解析と治療基盤の創出

研究課題名(英文) Functional analysis of transcription factor Nrf2 and production of new therapy in primary biliary cirrhosis

研究代表者

川田 一仁 (Kawata, Kazuhio)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90722968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Nrf2欠損マウスとNrf2誘導マウスに20Aを使用して原発性胆汁性肝硬変症(PBC)モデルマウスを作成した。Nrf2欠損マウスでは胆管炎所見は悪化し、Nrf2誘導マウスでは胆管炎が改善した。また、肝内浸潤したT細胞中のNrf2が欠損することでIFN γ の発現が増加し、逆にT細胞中のNrf2を誘導することで、IFN γ の発現を減少させた。PBCに対してUDCAがNrf2の発現を増加させることは解明されているが、今回の結果よりUDCAが肝内浸潤したT細胞のNrf2を誘導することでIFN γ の発現を減少させ、胆管炎が改善すると考えられた。PBCに対して、Nrf2誘導剤が新たな治療薬と成る可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have constructed xenobiotic-induced murine model of primary biliary cholangitis (PBC) in Nrf2 knock out (Nrf2 -/-) mouse, Nrf2 increase mouse used with sulforaphane and C57BL/6 mouse immunized with 20A. Nrf2 -/- mouse with 20A immunization developed cholangitis, in contrast, Nrf2 increase mouse with 20A immunization demonstrated less cholangitis compared with C57BL/6 mouse with 20A immunization. Production of IFN γ in hepatic T cell from Nrf2 -/- mouse with 20A immunization was significantly higher than C57BL/6 mouse with 20A immunization. In contrast, hepatic T cell from Nrf2 increase mouse with 20A immunization demonstrated less IFN γ production compared with C57BL/6 mouse with 20A immunization. It is known that UDCA treatment can enhance hepatic Nrf2 activation in PBC. According to these result, UDCA treatment reduces IFN γ production by enhanced Nrf2 activation in hepatic T cells and ameliorates cholangitis in PBC. Nrf2 activation in hepatic T cell may be a new therapy in PBC.

研究分野：肝臓学

キーワード：原発性胆汁性肝硬変 Nrf2

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子 Nrf2 について

酸化ストレス応答転写因子 Nuclear factor- erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)は塩基性-ロイジンジッパー構造を持ち、生体防御機構の中心的な役割を担っている。通常は Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)と結合して細胞質内に存在するが、親電子性物質や活性酸素種などにさらされると Keap1 から離脱して核に移行し、酸化ストレス応答配列 antioxidant response element に結合して、さまざまな酸化ストレス応答因子の発現を誘導し酸化へ導く。

(2) 原発性胆汁性肝硬変症における Nrf2 の抗酸化作用

原発性胆汁性肝硬変症(PBC)は原因不明の慢性に経過する微小胆管の破壊と抗ミトコンドリア抗体の発現が特徴的な自己免疫性肝疾患であり、厚生労働省の難治性肝疾患に認定されている。治療法としてはウルソデオキシコール酸(UDCA)のみが保険適応されている。stage I, II の早期の PBC に対して UDCA が病態の進展を遅らせる事は証明されているが、肝硬変への進展を阻止する事は出来ない。また約 10%において UDCA 不応例が存在し、その症例に対してエビデンスや保険適応が得られた治療法は確立されていない。さらに現在、stage III や IV の病態の進行した症例に対しての有効な治療法は肝移植のみである。以前、我々の実験室から PBC における胆管細胞や肝細胞の障害に酸化ストレスが関与している事を報告している¹⁾。また UDCA が PBC の病態進展を遅らせるメカニズムとして利胆作用や細胞障害性胆汁酸からの置換作用などが推測されているが、申請者は UDCA が PBC において肝細胞と胆管細胞内の Nrf2 を活性化し thioredoxin と thioredoxin reductase 1 を誘導することにより抗酸化作用を増強させ、病態進展を抑制させるメカニズムを解明し報告した²⁾

(3) PBC における Nrf2 の機能解析と臨床応用

近年 Nrf2 は抗酸化作用のみならず、免疫応答においても重要な働きを持つ事が解明されている。PBC は血清や肝臓組織中の Th1、Th17 系サイトカインの発現の亢進が病態に関与している事が多数報告されている。申請者も以前 xenobiotics の 2-octynoic acid を投与して作成する PBC マウスモデルにおいて IL-12/Th1 pathway、特に IFN γ の発現が胆管炎を誘導する重要なサイトカインである事を報告している³⁾。これらの結果より Nrf2 は PBC において酸化ストレスの減弱をコントロールするだけでなく、炎症性サイトカインの発現においても重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

現在、PBC における Nrf2 の機能、特に免疫応答に及ぼす影響について未だ十分に解明されていない。PBC の免疫応答における Nrf2 の機能解析を行い、臨床応用することで UDCA 以外の新たな治療法の発見へ導く事が出来る可能性がある。

2. 研究の目的

Nrf2 が PBC における T cell の炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

(1) Nrf2 KO マウスとコントロールマウス (C57BL/6)で PBC モデルマウスを作成し、胆管炎所見、肝内の単核球細胞の機能や炎症性サイトカインの発現について調べる。

(2) PBC モデルマウスに Nrf2 活性剤 sulforaphane(SFN)を投与し、非投与群と上記(1)と同様に胆管炎所見、肝内の単核球細胞の機能や炎症性サイトカインの発現について比較検討する。

PBC モデルマウスの作成

AMA の対応抗原 Lipoic acid と類似構造の化学物質 2-octynoic acid(2OA)に BSA を conjugate した 2OA-BSA を実験開始時(0 週)と 2 週後にマウスの腹腔内に投与する。

肝組織内の病理所見の比較検討

初回の 2OA-BSA 投与時から 8 週間後にマウスから肝臓を摘出し、HE 染色を行い胆管炎や肝実質の炎症を評価する。

肝内に浸潤した単核球細胞の抽出と検討
Flow cytometry にて肝臓、脾臓内の CD4 T cell、CD8 T cell、B cell、NK cell、NKT cell の細胞数を比較する。

T cell を刺激して 4 時間培養を行い、炎症性サイトカインの発現を Flow cytometry にて評価する。

肝内や血清中の炎症性サイトカインの発現の検討

肝組織の蛋白抽出液と血清から Cytometry Bead Assay を使用して測定する。

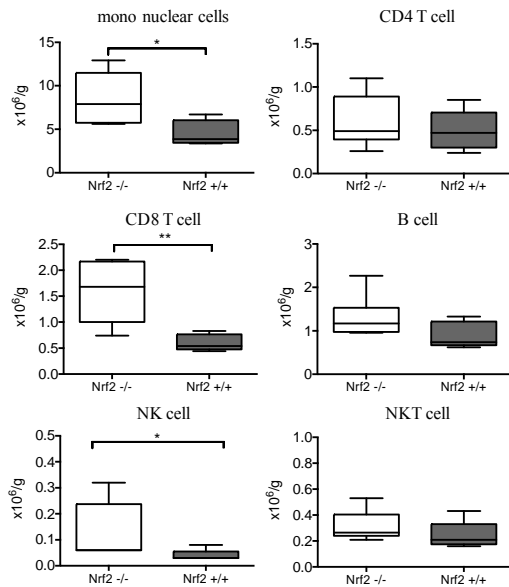
4. 研究成果

(1)Nrf2 KO マウスとコントロールの比較

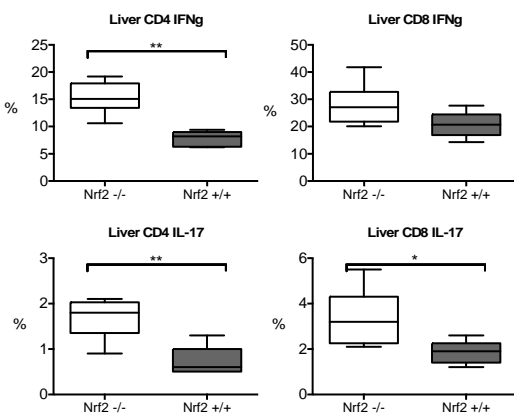
Nrf2 KO マウス 5 匹、C57BL/6 マウス 6 匹に 2OA を投与し PBC モデルを作成した。また、Nrf2 KO マウス 3 匹、C57BL/6 マウス 3 匹に PBS を投与し、ベースの肝組織も確認した。

肝組織の胆管炎所見を 2 群間で比較検討したが、Nrf2 KO マウスの方がコントロールマウスよりも門脈域の炎症細胞浸潤、胆管炎の所見が強く、granuloma の発現も多かった。PBS 投与群は Nrf2 KO マウス、C57BL/6 マウス共に胆管炎所見は認めなかった。

肝内の単核球細胞数は Nrf2 KO マウス: $7.89 \times 10^6/g$ 、コントロールマウス: $3.86 \times 10^6/g$ であり、有意に Nrf2 KO マウスの方が多かった。肝内の CD8 T cell と NK cell 数も Nrf2 KO マウスの方が明らかに多かったが、CD4 T cell, B cell, NKT cell 数で 2 群間に差は無かった。また、Nrf2 KO マウスは CD69 陽性 CD8 T cell の比率がコントロールより高かった。



T cell を Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™(BD Biosciences) で刺激して炎症性サイトカインの発現を評価したが、Nrf2 KO マウスの CD4 cell からの IFN γ と IL-17, CD8 T cell からの IL-17 の産生がコントロールよりも有意に多かった。



肝組織中の IFN γ の発現は Nrf2 KO マウスの方がコントロールよりも多い傾向 ($p=0.0517$) であった。

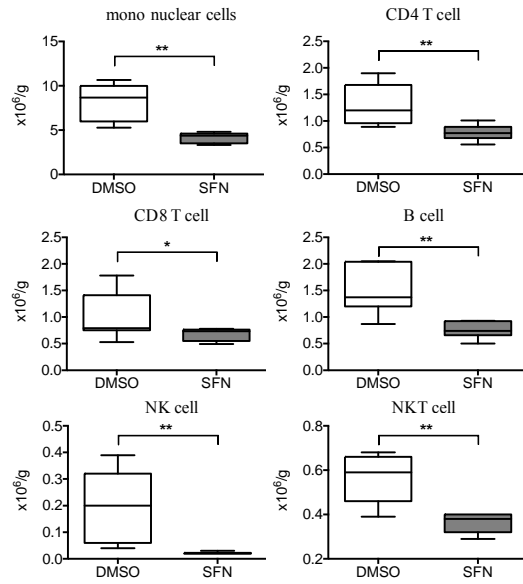
(2) PBC モデルマウスに 0 週から週 3 回 SFN 投与した SFN 群、DMSO を投与した DMSO 群で比較した。

6-8 週齢雌の C57BL/6 マウスに 20A-BSA を 0 週と 2 週後に投与した。SFN 群 7 匹、DMSO 群 6 匹で比較検討した。

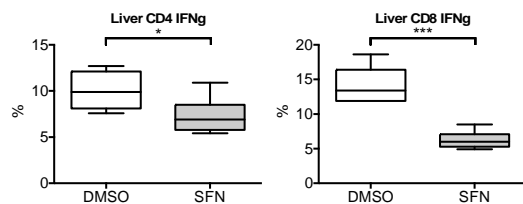
肝組織の胆管炎所見を 2 群間で比較検討したが、SFN 群の方が DMSO 群よりも門脈

域の炎症細胞浸潤が軽く、胆管炎所見も軽度であった。

肝内の単核球細胞数は SFN 群: $4.37 \times 10^6/g$ 、DMSO 群: $8.67 \times 10^6/g$ であり、有意に SFN 群の方が少なかった。肝内の CD4 T cell, CD8 T cell, B cell, NK cell, NKT cell 数も SFN 群の方が明らかに少なかった。



T cell を Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™(BD Biosciences) で刺激して炎症性サイトカインの発現を評価したが、SFN 群の CD4, CD8 T cell からの IFN γ 産生が DMSO 群よりも有意に少なかった。



肝内と血清中の炎症性サイトカインの発現は二群間で差はなかった。

(1),(2)より Nrf2 欠損マウスでは胆管炎所見は悪化し、Nrf2 誘導マウスでは胆管炎が改善した。また、PBC モデルマウスにおいて肝臓に浸潤した T cell の炎症性サイトカインの発現に Nrf2 が影響を及ぼしていた。肝内浸潤した T cell 中の Nrf2 が欠損することで IFN γ と IL-17 の発現が増加し、逆に T cell 中の Nrf2 を誘導することで、IFN γ の発現を減少させた。PBC に対して UDCA を投与することで Nrf2 の発現を増加することは解明されているが、UDCA の免疫抑制作用については解明されていなかった。今回の結果より UDCA が肝内浸潤した T cell の Nrf2 を誘導することで IFN γ の発現を減少させることで胆管炎が改善すると考えられた。今後 PBC に対して、Nrf2 誘導剤が新たな治療薬と成りうる可能性がある。

<引用文献>

1: Kawamura K et al, Enhanced hepatic lipid peroxidation in patients with primary biliary cirrhosis. Am J Gastroenterol. 2000 Dec; 95 (12): 3596-601.

2: Kawata K et al, Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis. Antioxid Redox Signal. 2010 Aug 1;13(3):259-68.

3: Kawata K et al, Identification of potential cytokine pathways for therapeutic intervention in murine primary biliary cirrhosis. PLoS One. 2013 Sep 10;8(9):e74225.

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

川田 一仁 (KAWATA, kazuhito)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90722968

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

下山 真 (SHIMOYAMA, shin)