

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860512

研究課題名(和文) 肝臓病におけるp32遺伝子の役割

研究課題名(英文) The role of p32 in liver disease

研究代表者

後藤 和人 (Kazuhito, Gotoh)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：50711214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究計画の予定通り、p32コンディショナルノックアウトマウスを作成して、解析を行った。Alb、LysM、Tie2それぞれマウスの血漿より、特異的な代謝産物の同定ができ、現在、さらなる解析を進めている。研究計画の当初の予定は、Albマウスにて有用なマーカーが見つかる予定であったが、Tie2マウスより、より有用なマーカーを見つめたため、現在はその解析を進めている。本研究助成の成果は、日本臨床検査医学会、日本ミトコンドリア学会にて発表をして、共に評価は良好であった。

研究成果の概要(英文)：According to the research plan, we created and analyzed several p32 conditional knockout mice, including Alb-, LysM-, Tie2-cre. Furthermore, We found specific metabolites in the plasma of each mouse. We originally planned to analysis in alb-cre mice, but we found the useful marker in tie2-cre mice. We presented the results of this research grant in the Japanese Society of Laboratory Medicine and the Japan Society of mitochondria.

研究分野：肝臓

キーワード：肝臓 ミトコンドリア 臨床検査

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは酸化的リン酸化により通常細胞が行うATP産生の80~90%を担い、細胞内エネルギー代謝の中心である。それ以外にもリン脂質の合成、ステロイドの合成、細胞内のCa濃度調節など様々なエネルギー代謝を司っている。近年になり日本も食の欧米化により、メタボリックシンドローム(腹囲増大、高血圧、高脂血症、糖尿病)が社会問題となっている。メタボリックシンドロームは疾患概念の総称であるが、その原因の本質は、過栄養、食の欧米化に依存する肝臓の脂肪化が一因であると考えられている。またこの肝臓の脂肪化は臨床的に、①肝細胞の脂肪の沈着のみの状態を単純性脂肪肝、②脂肪沈着とともに炎症や線維化を伴った状態を脂肪性肝炎として診断される。①と②を総称して、Non-Alcoholic Fatty Liver Disease(NAFLD)という疾患として、メタボロームシンドロームの一つとして近年になり加療されつつある。

近年、このNAFLDとミトコンドリアの関係は、国内外で学問的注目を集めている(Sunny NE. et al. *Cell metabolism* 14:804-810, 2011, Cusi K. *Gastroenterology* 142:711-725, 2012)。近年になりNAFLDとミトコンドリアの関係が明確になってきた背景には、生体内における代謝産物(メタボライト)を網羅的に解析する技術(メタボローム解析)の発展が寄与しているものと考えられる。すなわち、この代謝産物の網羅的解析により、ミトコンドリアにおけるTCAサイクルやβ酸化などの状態をリアルタイムに測定でき、過栄養などによるNAFLDの進展にミトコンドリアが寄与していることなどが明らかとされた。

また国内の研究グループより、NAFLDよりいわゆる肝硬変の状態NASH(Non-Alcoholic Steatohepatitis)の進展に、肝臓のクッパー細胞上のCD14の過剰発現が重要であることが報告された(Imajo K. et al. *Cell metabolism* 16:44-54, 2012)。さらに同論文において今城らのグループはクッパー細胞のエンドトキシン(LPS)への過剰反応が炎症反応を惹起して、NAFLDをNASHへと進展させていくことも報告した(左図1)。

2. 研究の目的

様々なミトコンドリアの機能不全を呈する遺伝子改変マウスを用いて予備的に解析を行った結果、私が独自に作製したミトコンドリアの翻訳を制御する遺伝子の一つであるp32のマクロファージ特異的欠損マウスにおいて肝臓のクッパー細胞の数が減少する

ことを見いだした。さらにLPS投与後の生存性、肝炎の進展においてもp32遺伝子が重要役割を演じていることを明らかにした。その結果などによりミトコンドリアと肝臓病には密接な関係があることを確信したため、p32遺伝子欠損の肝臓病(NASH(NAFLD))における影響を解析し、肝臓病とミトコンドリアの関係を明確にすることを本研究の目的とした。

本研究は各種コンディショナルノックアウトマウスを用いてp32の機能を個体レベルで解析するのはもちろんのこと、学際的・融合的アプローチにより、ミトコンドリアの機能解析や代謝産物の動態も含め包括的に解析をしようという点に特徴がある。その成果は、ミトコンドリアの翻訳制御が肝臓においてどのような意義があるのかという疑問に対して、明確な回答を提示できるという点で学術的に大きなインパクトを与えるものと期待される。

そのメカニズムを解明することにより学問的進展はもちろんのこと、実際の臨床の現場へのメタボローム解析の必要性、ミトコンドリア機能検査の重要性を提示して、最終的には肝臓病の早期診断、治療成績の改善へと寄与するものと考えられる。

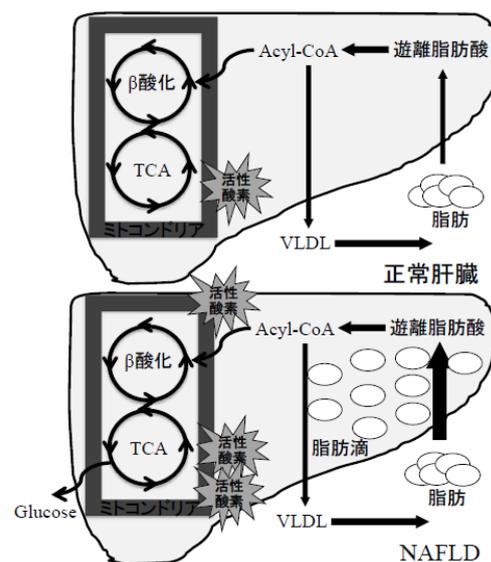


図1 NAFLDになると肝臓内に脂質が沈着して、肝臓外へと糖が流出して、細胞内ROSが増加する。

3. 研究の方法

本研究は、発生工学・実験病理学・メタボロミクスを融合したアプローチにより、「肝臓病におけるp32遺伝子の役割」を明らかにすることを目的としている。このため、以下のような計画・方法にて研究を進める。

- ① Cre-loxP システムを用いて、肝臓内の各細胞 ①肝細胞(Alb-Cre)、②クッパー細胞(LysM-Cre)、③血管内皮細胞(Tie2-Cre)

などの p32 コンディショナルノックアウトマウスを作製する(図 1)。

- ② それぞれのマウスに抗原(LPS)を投与し、各種サイトカインの産生能や各臓器の病理的变化を解析する。さらに、過栄養モデルや Apo-E マウスと掛け合わせることに より p32 と NASH、NAFLD、メタボロームシンドロームの関係も明らかにする。

最終的に個体レベルでの代謝物質の網羅的解析(メタボローム解析)を行うことにより、人への臨床応用のプロトタイプとする(下図)。

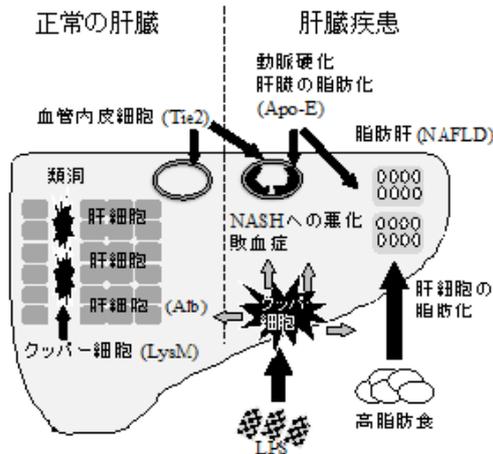


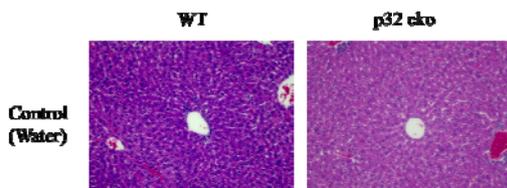
図 1 肝臓の各細胞のコンディショナルマウスの作製予定

4. 研究成果

1. マウスの作成

すでに作成すみの②クッパー細胞(LysM-Cre)、③血管内皮細胞(Tie2-Cre)のコンディショナルマウスに関しては、本研究助成により、マウスの維持、解析を行った。①肝細胞(Alb-Cre)特異的マウスに関しては、新規に作成を行った。実際のそれぞれのマウスを作成したが、体重、マウスの行動などに異常な所見を認めなかった。

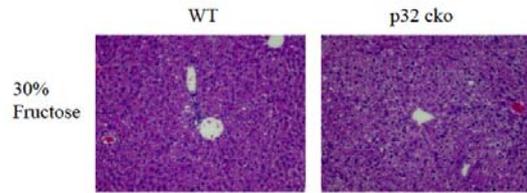
p32 肝細胞特異的マウスにおいては、肝臓の脂肪化に影響を与えていることが示唆された(下図)



2. 病態モデルの解析

実際に、脂肪肝モデルを作成のため、高脂肪食や 30%フルクトースをマウスに投与して、解析を行った。ApoE 欠損マウスや 30%フルクトースモデルが、良好に脂肪肝の病態を呈

した。(下図)



3. 作成した p32 コンディショナルマウスの血漿代謝物を測定して、①肝細胞(Alb-Cre)、②クッパー細胞(LysM-Cre)、③血管内皮細胞(Tie2-Cre)などの p32 コンディショナルノックアウトマウスの特徴的な代謝産物を同定した。その研究に関しては、発展性があるため、さらなる研究を進めていく予定である。

4. 研究助成により、予定していた研究は予定通り進展して、下記内容の研究発表を行った。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

1. 後藤和人, 佐々木勝彦, 方圓, 瀬戸山大樹, 伊神恒, 八木美佳子, 安川武宏, 内海健, 康東天
樹状細胞におけるミトコンドリア p32 の機能解析,
日本ミトコンドリア学会 第 15 回年会 2015.11.19. 福井県国際交流会館(福井県福井市)
2. 瀬戸山大樹, 後藤和人, 内海健, Dongchon Kang,
ミトコンドリア異常を反映する新たな血しょうバイオマーカーの探索
第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015.11.21. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
3. 後藤和人, 八木美佳子, 瀬戸山大樹, 堀田多恵子, 内海健, 康東天
樹状細胞におけるミトコンドリア p32 の機能解析
第 62 回日本臨床検査医学会学術集会 2015.11.21. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
4. 後藤 和人, 瀬戸山 大樹, 堀田多恵子, 内海健, 康東天
樹状細胞におけるミトコンドリア p32 の機能解析
第 60 回日本臨床検査医学会九州地方会/第 26 回日本臨床化学会九州支部総会, 2015.03. 鹿児島大学医学部 鶴

- 陵会館(鹿児島県鹿児島市)
5. 瀬戸山 大樹, 後藤 和人, 堀田 多恵子, 内海 健, KANG DONGCHON, 質量分析法による糖尿病マウス血中に存在する糖化代謝物の同定
第 60 回日本臨床検査医学会九州地方会/第 26 回日本臨床化学会九州支部総会,2015.03. 鹿児島大学医学部 鶴陵会館(鹿児島県鹿児島市)
 6. 後藤 和人, 丸山 奏恵, 山中 基子, 堀田 多恵子, 内海 健, 康 東天
検査部における HBV 再活性化に対する取り組み
第 61 回日本臨床検査医学会学術集会,2014.11. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

[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

<https://www.med.kyushu-u.ac.jp/cclm/>
九州大学病院 検査部

6. 研究組織

(1) 研究代表者 後藤 和人
(Kazuhito Gotoh)
九州大学病院・検査部・助教
研究者番号：50711214

(2) 研究分担者

本研究に関する研究分担者は申請時には計画されていない。

(3) 連携研究者

本研究に関する研究分担者は申請時には計画されていない。