

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01736

研究課題名(和文)酸化ストレスに起因した脂肪肝・NASHの発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of onset of fatty liver / NASH caused by oxidative stress

研究代表者

鈴木 敬一郎 (Suzuki, Keiichiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化酵素の一つであるSOD1の欠損マウスは脂肪肝になり、肝の線維化を経てやがて肝がんで死亡することが報告されている。脂肪肝から肝線維化への移行には過剰なコラーゲンの蓄積を伴う。SOD1 KOマウスの肝臓におけるコラーゲン量の増加を検討した結果、合成と分解のバランスが崩れたことに加え糖化修飾によるコラーゲン自体の分解阻害によるものであり、その結果として肝線維化が起こったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：SOD1 plays a protective role in cells by catalyzing the converting of the superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide. SOD1 is highly expressed in the liver. We measured expression level of RAGE and found that RAGE was highly expressed in SOD1 knock out (KO) mouse liver. These results suggested that oxidative stress was also accelerated by AGEs through RAGE.

SOD1 KO mice are fatty liver, resulting in liver cancer finally through fibrosis, NASH, cirrhosis of the liver with further progression. We found a higher accumulation of collagen in liver tissue from SOD1 KO mice. The level of TIMP, which is inhibitor of MMP, was also increased in SOD1 KO mice livers. These results indicate that collagen degradation is inhibited. In addition, SOD1 KO mice liver sections were modified by AGEs. These results suggest that modified collagen would be more resistant to the action of collagen degrading enzymes.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：酸化ストレス 抗酸化酵素 SOD1 NASH 脂肪肝 グリケーション

## 1. 研究開始当初の背景

日本をはじめ先進諸国では豊かな食生活に加え、今後超高齢化社会を迎えるにあたり、NASH や肥満などのメタボリックシンドロームの増大が深刻な問題となっている。肝臓や腎臓に多く発現する Cu,Zn-スーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)は、スーパーオキシドラジカルを過酸化水素と酸素に変換する酵素で、酸化ストレスから生体を守る重要な役目を有している。SOD1 を欠損したマウス(SOD1 KO マウス)は正常に生まれるものの、脂肪肝から肝硬変ひいては肝癌を引き起こすことが報告されている。一般的には糖質や脂質の過剰摂取による肥満から脂肪肝になると考えられているが、SOD1 KO マウスは普通食でも10週令で脂肪肝になり、肥満を伴わないまま肝硬変を経て肝癌に進む。つまり、当マウスは肥満を経ない NASH 自然発症モデルマウスと言える。さらに、我々は SOD1 KO マウスが鉄代謝異常を引き起こし、肝臓や腎臓に鉄が沈着することを明らかにしている(Yoshihara et al, 2009, 2012)。NASH 発症には脂肪肝に加え酸化ストレスやインスリン抵抗性などの要因が必要だと考えられているが、発症機序は不明な点が多い。近年 NASH 患者において鉄代謝異常が報告されており、低鉄食で NASH が改善されることが報告されるようになった。しかし、肝硬変と鉄代謝異常に関する研究報告は国内外において少なく、詳細な分子機構はほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、SOD1 KO マウスと野生型マウスを比較することで、酸化ストレスがコラーゲンの合成と分解にどのような影響を及ぼすかを解析し、NASH 発症メカニズムを解明する。具体的には、

酸化ストレスはコラーゲン産生系を亢進させるのか。

酸化ストレスはコラーゲン分解系を低下させるのか。

鉄過剰は亜鉛量と MMP 活性の低下を招くのか。

HSP47 および TIMP の新規阻害物質の探索を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

(1)酸化ストレスによるコラーゲン産生能あるいは分解系の解析を行う。

酸化ストレスによる過剰なコラーゲンの

蓄積は、合成と分解のバランスが崩れているためだと考えられる。我々は SOD1 KO マウスが 10 週令ですでに脂肪肝になりコラーゲンが蓄積していることを見出している。以下の実験で、SOD1 KO マウスでコラーゲンの産生が亢進しているのか、コラーゲンの分解が抑制されているのか、または両者ともに見られるのか、を明らかにできる。

SOD1 KO マウスと野生型マウスに対し 4、8、12 週令で体重を測定し、血液を採取する。血清からは NASH の指標となるコレステロール、中性脂肪、グルコース、インスリン、鉄濃度、フェリチン、ALT、AST を測定する。

12 週令の両マウスを PBS で灌流後、肝臓を取り出し、マイナス 70 度で保存する。

一部のマウスは灌流固定し、凍結切片とパラフィン切片を作製する。

凍結切片を用いて Oil Red O 染色で脂肪滴の量を比較する。

凍結切片をシリウスレッドで染色し、コラーゲンの沈着度合いを調べる。

各マウスの肝臓から Total RNA を抽出精製し、RT-PCR にて HSP47、MMP2、MMP9、TIMP1 の mRNA 発現量を調べる。

各マウスの肝臓からタンパク質を抽出し、HSP47、MMP2、MMP9、TIMP1 のタンパク質発現量をウエスタンブロットにて解析する。

各マウスの肝臓をホモジナイズし、コラーゲンとヒアルロン酸を定量する。

各マウスの肝臓からタンパク質を抽出し、ゼラチンゼイモグラフィーで MMP2、MMP9 の活性測定を行う。

凍結切片とパラフィン切片を用いて HSP47、MMP2、MMP9、TIMP1 の免疫組織染色を行う。

(2)鉄過剰は亜鉛量と MMP 活性の低下を招くのか検討する。

SOD1 KO マウスにおいて、鉄代謝を制御する IRP1 の発現量が低下し、鉄吸収に貢献する TfR1 が異常に増大していることを報告している。鉄代謝異常がコラーゲン産生・分解に及ぼす影響を検討するとともに、亜鉛量の低下や MMP 活性を阻害する TIMP1 の発現量も検討する。

A. 鉄過剰が亜鉛濃度に与える影響を調べる。

野生型マウスと SOD1 KO マウスの肝臓

における鉄および亜鉛の濃度を原子吸光法により測定する。

野生型マウスに鉄を投与した場合や鉄のキレート剤を投与した場合に肝臓において亜鉛の濃度に変化が生じるかを原子吸光法などにより測定する。

マウスの肝臓より初代培養肝細胞 (Hepatocyte) をコラゲナーゼ灌流法を用いて単離し、培養液中に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの酸化ストレスを与え、IRP や TIR の発現量を調べることで鉄代謝を解析する。

B. 鉄過剰がMMP活性に与える影響を調べる。

野生型マウスの肝臓より単離した Hepatocyte を培養し、酸化ストレスを与えたり (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> など) 培養液中に種々の濃度の鉄を添加し、MMP と TIMP の発現量をリアルタイム PCR 法で定量する。

Hepatocyte の培養液中に鉄を添加し、MMP の活性をゼラチンザイモグラフィで測定し、酸化ストレスと鉄代謝、および TIMP の関係を検討する。

#### 4. 研究成果

抗酸化酵素の一つである Cu,Zn-SOD(SOD1) はスーパーオキシドを過酸化水素に代謝する酵素であり、特に肝臓において活性が強いことが知られている。ここで、SOD1 KO マウスは酸化ストレスにより強くさらされていると考えられる。SOD1 KO マウスの肝臓を用いて RAGE (Receptor for AGE) の発現量を調べたところ、mRNA およびタンパク量とも増加していた。このことから、SOD1 KO マウスの肝臓では活性酸素種(ROS)の消去系の機能低下に加え、RAGE を介した酸化ストレスの増悪が示唆された。

一方、欠損マウスの肝臓では脂肪肝となり、最終的に肝硬変、肝がんへと移行することが報告されている。肝臓のコラーゲンを染色したところ、SOD1 KO マウスでコラーゲン量が増加していた。その原因として、コラーゲンを分解する MMP の酵素活性が TIMP の発現量増加により阻害されていることが明らかとなった。

さらに、コラーゲンが糖化反応で生じる中間体である CMA (carboxymethylarginine) や CML (carboxymethyl-lysine) により糖化修飾されていることを突き止めた。コラーゲンがこれにより糖化修飾されることで、分解が阻害されることも一因であることがわかった。

以上より、SOD1 KO マウスの肝臓におけるコラーゲン量の増加は、合成と分解のバランスが崩れたことに加え糖化修飾による分解阻害によるものであり、その結果として肝線維化が起こったと考えられる。

#### 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2件)

Sakiyama H, Fujiwara N, Yoneoka Y, Yoshihara D, Eguchi H, Suzuki K, CuZn-SOD deficiency induces the accumulation of hepatic collagen. *Free Radic. Res.* 50, 666-677, 2016 (査読あり)

Yoshihara D, Fujiwara N, Kitanaka N, Kitanaka J, Sakiyama H, Eguchi H, Takemura M, Suzuki K. The absence of the SOD1 gene causes abnormal monoaminergic neurotransmission and motivational impairment-like behavior in mice. *Free Radic. Res.* 50, 1245-1256, 2016 (査読あり)

[学会発表](計5件)

崎山晴彦, 江口裕伸, 藤原範子, 吉原大作, 鈴木敬一郎. 糖化修飾が SOD1 欠損による肝線維化へ及ぼす影響. 第26回日本メイラード学会年会, 2016.11.11, つくば

崎山晴彦, 井上美奈子, 江口裕伸, 藤原範子, 吉原大作, 鈴木敬一郎. 酸化ストレスが ChREBP 活性化に与える影響の検討. 第89回日本生化学大会, 2016.9.26. 仙台

崎山晴彦, 江口裕伸, 藤原範子, 吉原大作, 鈴木敬一郎. The study of liver fibrosis in SOD1 knockout mice. 国際 NO 学会, 2016. 5. 22, 仙台

崎山晴彦, 米岡由佳, 江口裕伸, 藤原範子, 吉原大作, 鈴木敬一郎. 酸化・糖化は肝臓においてコラーゲン蓄積を引き起こす. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学大会 合同大会) 2015. 12. 03, 神戸

崎山晴彦, 江口裕伸, 吉原大作, 米岡由佳, 藤原範子, 鈴木敬一郎. 酸化ストレスと転写因子 Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP) の活性化について 第15回日本 NO 学会学術集会, 2015. 6. 26, 豊中市.

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0）

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）

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

<http://www.hyo-med.ac.jp/faculty/course/biochemistry.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 敬一郎 (Suzuki, Keiichiro)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221322

(2)研究分担者

崎山 晴彦 (Haruhiko, Sakiyama)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30508958

江口 裕伸 (Eguchi, Hirobobu)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60351798

吉原 大作 (Yoshihara, Daisaku)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00567266

藤原 範子 (Fujiwara, Noriko)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10368532

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )