

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09010

研究課題名(和文) 自然肝発癌するNASHモデルマウスでのPPAR- α を介した発癌抑制の分子機構

研究課題名(英文) PPAR-alpha mediated molecular mechanisms involved in spontaneous hepatocarcinogenesis among NASH mouse model

研究代表者

西原 利治 (SAIBARA, Toshiji)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：60145125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自然肝発癌モデルマウスであるMC4R KOとMC4RとPPAR- α のdouble KOマウスは共に通常食の給餌下でも極めて強いインスリン抵抗性を示し、脂肪酸合成関連の遺伝子や炎症関連遺伝子、脂肪酸酸化および酸化関連遺伝子群やスカベンジャー受容体遺伝子の発現は増強していた。また、炎症性細胞浸潤に伴いIL-6遺伝子の発現亢進も認められた。しかしながら、48週齢の検討では、MC4R KOマウスにおける肝腫瘍発生数に比べてMC4RとPPAR- α のdouble KOマウスでは腫瘍数が有意に少なく、このモデルにおいても肝発癌におけるPPAR- α を介した肝発癌促進系の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Both MC4R KO mouse and MC4R-PPAR-alpha double KO mouse showed progressive impairment of insulin sensitivity and enhanced mRNA expression of genes involved in fatty acid synthesis, fatty acid beta and omega oxidation, inflammation, and scavenger receptors in addition to IL-6 mRNA. However, there was a significant difference in neoplastic nodule size and number among these two KO mice, i.e., averaged diameter and averaged number of tumor were significantly fewer in MC4R-PPAR-alpha double KO mouse than in MC4R KO mouse. This observation suggests that PPAR-alpha mediated mechanisms are involved in spontaneous hepatocarcinogenesis among NASH mouse models.

研究分野：消化器病学

キーワード：PPAR-alpha melanocortin receptor insulin resistance fatty liver IL-6 NASH hepatocellular carcinoma knockout mouse

1. 研究開始当初の背景

肥満人口の増加に伴って非アルコール性脂肪性肝疾患が急増し、肝臓の線維化進展の速やかな非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の増加が生じている (J Gastroenterol. 2012 ;47:586-595.)。このため 10 年後には肝硬変が 1.3 倍、肝細胞癌の 3 割弱が NASH 由来となるのではないかと、危惧されている。NASH の予後を規定する因子としては肥満に伴う生活習慣病が最も重要であるが、無症候で慢性肝疾患が肝硬変・肝細胞癌へと進展するため肝疾患に対する配慮が不可欠である。

2. 研究の目的

摂食中枢に異常を有するヒトの遺伝性肥満症の一つである MC4R 欠損症で NASH が好発 (J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2014;58:155-159.) し、同遺伝子の欠損マウスでも NASH (Am J Pathol. 2011;179:2454-2463.)に伴う肝細胞癌が好発することに着目し、NASH からの肝発癌の分子機構を検討し、NASH からの肝発癌の抑制・予防に生かしたい。

3. 研究の方法

(西原利治)... MC4R KO 自然肝発癌モデルマウスは通常食の給餌下でも極めて強いインスリン抵抗性を示す。そこで経時的に空腹時血糖と空腹時インスリン値を測定し、インスリン感受性の推移を検討する。通常食に加えて高脂肪負荷食でも検討する。また、MC4R と PPAR- の double KO マウスでも同様の検討を行う。

(戸田勝巳)...上記のように経時的に空腹時血糖と空腹時インスリン値を測定しインスリン感受性の推移を検討したマウスについて、microarray を用いて遺伝子発現の推移を検証する。変化が観察された遺伝子の一部については Western blot や免疫組織染色を行い、機能解析も行う。

(耕崎拓大、水田洋)...計画的に MC4R KO 自然肝発癌モデルマウスの繁殖を進め、ノックアウト遺伝子の genotyping を行い、安定的な供給に努める。また、PPAR- 遺伝子を KO することにより、発癌抑制効果を検討するために KO 個体の集積を行う。

4. 研究成果

(西原利治)... MC4R KO 自然肝発癌モデルマウスは通常食の給餌下でも極めて強いインスリン抵抗性を示す。8 週令に達すると空腹時血糖は正常であるが、野生型に比して高インスリン血症を示す。高脂肪負荷では顕著な高インスリン血症にも関わらず空腹時血糖の上昇も認められた。このような変化は 20 週令に至るまで持続した。しかし、16 週令より尿糖が急激に増加し、体重の減少を認める個

体が増加した。そこで、12 週令よりインスリン グラルギンを投与して尿糖を軽減したところ、その後の体重を維持することができ、48 週令での検討を行った。

また、MC4R と PPAR- の double KO マウスでは通常食の給餌下では野生型に比してインスリン抵抗性が軽減されたが、20 週令では野生型に比して耐糖能の低下がより顕著となり体重の減少を生じたためにインスリン感受性は野生型と同等であった。そこで、12 週令よりインスリン グラルギンを投与して尿糖を軽減したところ、その後の体重を維持することができ、48 週令で MC4R KO との比較検討を行うことができた。

(戸田勝巳)... 8 週令の MC4R KO マウスでは、既知の脂肪酸合成関連の遺伝子の発現が増強され、炎症関連遺伝子の発現も増強された。脂肪酸 酸化および 酸化関連遺伝子群やスカベンジャー受容体の発現も継時的に増強された。自然経過では体重の減少とともに、その発現が低下したが、インスリンを併用して体重を維持することにより高発現を維持することができた。炎症性細胞浸潤に伴い IL-6 の発現亢進が認められたが、これも細胞の枯渇に伴いその発現が抑制されたが、インスリンを併用して体重を維持することにより炎症細胞浸潤を維持することができ、IL-6 の発現亢進を継続することが可能であった。

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 10 件)

Oki Y, Ono M, Hyogo H, Ochi T, Munekage K, Nozaki Y, Hirose A, Masuda K, Mizuta H, Okamoto N, Saibara T, Evaluation of postprandial hypoglycemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease by oral glucose tolerance testing and continuous glucose monitoring, Eur J Gastroenterol Hepatol, 査読有、2018、巻「印刷中」、最初と最後の頁「印刷中」、doi: 10.1097/MEG.0000000000001118. Epub ahead of print PMID:29634665

Ishiba H, Sumida Y, Tanaka S, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Yoneda M, Takahashi H, Nakahara T, Seko Y, Mori K, Kanemasa K, Shimada K, Imai S, Imajo K, Kawaguchi T, Nakajima A, Chayama K, Saibara T, Shima T, Fujimoto K, Okanoue T, Itoh Y; Japan Study Group of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD), The novel cutoff points for the FIB4 index categorized by age increase the diagnostic accuracy in NAFLD: a multi-center study, J Gastroenterol, 査

読有、2018、1-9.doi:10.1007/s00535-018-1474-y. Epub ahead of print PMID:29744597

Tada T, Kumada T, Toyoda H, Saibara T, Ono M, Kage M. New scoring system combining the FIB-4 index and cytokeratin-18 fragments for predicting steatohepatitis and liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Biomarkers. 査読有、2018、23巻、328-334. doi: 10.1080/1354750X.2018.1425915. Epub 2018 Jan 19. PMID:29308929

Amano A, Kondo Y, Noda Y, Ohta M, Kawanishi N, Machida S, Mitsuhashi K, Senmaru T, Fukui M, Takaoka O, Mori T, Kitawaki J, Ono M, Saibara T, Obayashi H, Ishigami A. Abnormal lipid/ lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. Arch Biochem Biophys. 査読有、622巻、2017、47-58. DOI: 10.1016/j.abb.2017.03.007. Epub Mar 22. PMID: 28341248

Kamada Y, Ono M, Hyogo H, Fujii H, Sumida Y, Yamada M, Mori K, Tanaka S, Maekawa T, Ebisutani Y, Yamamoto A, Takamatsu S, Yoneda M, Kawada N, Chayama K, Saibara T, Takehara T, Miyoshi E, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG NAFLD): Use of Mac-2 binding protein as a biomarker for nonalcoholic fatty liver disease diagnosis. Hepatol Commun. 査読有、1巻、2017、780-791. DOI: 10.1002/hep4.1080 PMID: 29404494 PMCID: PMC5678915

Ochi T, Kawaguchi T, Nakahara T, Ono M, Noguchi S, Koshiyama Y, Munekage K, Murakami E, Hiramatsu A, Ogasawara M, Hirose A, Mizuta H, Masuda K, Okamoto N, Suganuma N, Chayama K, Yamaguchi M, Torimura T, Saibara T. Differences in characteristics of glucose intolerance between patients with NAFLD and chronic hepatitis C as determined by CGMS. Sci Rep. 査読有、2017、7巻、10146. doi: 10.1038/s41598-017-09256-4. PMID:28860506

Oeda S, Takahashi H, Yoshida H, Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Koshiyama Y, Ono M, Hyogo H, Kawaguchi T, Fujii H, Nishino K, Sumida Y, Tanaka S, Kawanaka M, Torimura T, Saibara T, Kawaguchi A, Nakajima A, Eguchi Y; Japan Study Group for NAFLD (JSG-NAFLD). Prevalence of pruritus in patients with chronic liver disease: a

multicenter study. Hepatol Res. 査読有、2017、48巻、E252-E262. doi: 10.1111/hepr.12978. PMID: 28877392

Ohmi S, Ono M, Takata H, Hirano S, Funakoshi S, Nishi Y, Yoshimura K, Amano E, Terada Y, Saibara T, Fujimoto S. Analysis of factors influencing glucose tolerance in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease. Diabetol Metab Syndr. 査読有、2017、9巻65. doi: 10.1186/s13098-017-0264-7. eCollection 2017. PMID: 28878826

Tsuboi M, Taniuchi K, Shimizu T, Saito M, Saibara T. The transcription factor HOXB7 regulates ERK kinase activity and thereby stimulates the motility and invasiveness of pancreatic cancer cells. J Biol Chem. 査読有、2017、292巻、17681-17702. doi:10.1074/jbc.M116.772780. Epub 2017 Sep 14.

Masuda K, Noguchi S, Ono M, Ochi T, Munekage K, Okamoto N, Suganuma N, Saibara T: High fasting insulin concentrations may be a pivotal predictor for the severity of hepatic fibrosis beyond the glycemic status in non-alcoholic fatty liver disease patients before development of diabetes mellitus. Hepatol Res. 査読有、2017、sep;47巻、983-990. doi: 10.1111/hepr.12832. Epub 2016 Dec 5. PMID: 27794176

[学会発表](計4件)

Ono M, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Ogasawara M, Okamoto N, Saibara T. Functional roles of AGE-RAGE system for the development of hepatic fibrosis of NASH. AASLD THE LIVER MEETING 2017. Washinton, DC. (Washinton, DC Convention Center), 2017.10.20-24.

Nagano S, Ono M, Ochi T, Munekage K, Yano Y, Mizuta H, Ogasawara M, Hirose A, Nozaki Y, Okamoto N, Iwasaki S, Jude A Oben T, Saibara T. Involvement of PNPLA3 function for hepatic lipids metabolism through XBP1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. APDW 2017. Hong Kong, (Hong Kong Convention and Exhibition Center), 2017.9.23-26.

Yano Y, Mizuta H, Ono M, Nagano S, Tsuda H, Kitagawa T, Hashiba M, Okamoto N, Kira M, Takeuchi H, Matsumura Y, Saibara T. Vonoprazan-based third-line triple therapy in Helicobacter pylori eradication and study of the diversity of

antimicrobial susceptibilities、APDW 2017、
Hong Kong, (Hong Kong Convention and
Exhibition Center), 2017.9.23-26.

Taniuchi K, Yawata T, Ueda T, Saibara T、
Efficient delivery of siRNA targeted
CCDC88A mRNA to pancreatic cancer tumor
inhibits the invasiveness and metastasis、
American Association for Cancer Research
Annual Meeting 2017、USA Washington, D.C.,
Vienna (Walter E, Washington Convention
Center), 2017.1.4 -5.

〔その他〕 ホームページ等
<http://www.kochi1nai.jp/home/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西原 利治 (SAIBARA Toshiji)
高知大学・教育研究部医療学系
臨床医学部門・教授
研究者番号：60145125

(2)研究分担者

耕崎 拓大 (KOUSAKI Takuhiro)
高知大学・教育研究部医療学系
臨床医学部門・講師
研究者番号：00332833

戸田 勝巳 (TODA Katsumi)
高知大学・教育研究部医療学系
基礎医学部門・准教授
研究者番号：40197893

水田 洋 (Mizuta Hiroshi)
高知大学・教育研究部医療学系
臨床医学部門・助教
研究者番号：70527605