

平成23年 5月 20日現在

研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2009～2010
課題番号：21890318
研究課題名（和文） 抗体プロテオミクスによる超難治性肝炎 NASH 関連マーカーの探索と創薬への展開
研究課題名（英文） Search for Proteomics-based analysis of non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD/NASH) in mice.
研究代表者 長野 一也（NAGANO KAZUYA） 独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部バイオ創薬プロジェクト・研究員 研究者番号：40548301

研究成果の概要（和文）：

本研究は、今後、肝硬変・肝がんの主要なリスクファクターになることが推測されている非アルコール性肝炎 (NASH) とその予備軍 (NAFLD) の分子病態の解明や診断薬/治療薬の開発に資する基礎情報の集積を目的とし、NAFLD 関連分子の探索をプロテオミクスにより試みた。その結果、正常マウスの肝に比較して NAFLD モデルマウスの肝で発現変動していた 8 種類の蛋白質を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

It has been estimated that non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), early stage of NASH, become main factors to cause liver cancer and hepatic cirrhosis in future. Therefore, development of diagnostic and therapeutic techniques is urgently needed. However these diseases are hardly known, due to having been recently recognized. In this study, we searched for NAFLD-related proteins and resulted in successfully identifying 8 kinds of candidate proteins more highly expressed in liver of NAFLD model mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：メタボリックシンドローム、Non-alcoholic steatohepatitis (NASH)、Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

昨今の食生活の欧米化と相まって、肥満に糖尿病、高血圧、高脂血症等を伴う症候群、いわゆるメタボリックシンドロームと位置づけられる患者が本邦でも年々増加している。メタボリックシンドロームは、さらに重篤な疾患のリスクファクターとなることから、その予防・治療等の対策は急務となっている。このような背景のもと、メタボリックシンドロームを基礎疾患とした非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が新たな肝疾患として認識され始め、臨床現場で問題視されている。NAFLD・NASH に関する最近の調査によると、一般人 (健診受診者) の約 25% が脂肪性肝障害を患っており、その約半数が NAFLD とされている。NAFLD 患者のうちの 1 割、一般人の 100 人に 1 人が線維化を伴う肝炎、すなわち NASH の状態にあり、我が国では 100 万人もの NASH 患者がいるものと考えられている。さらに NASH 患者の約 50% は、肝硬変・肝癌へと急速に進行してしまうハイリスク患者である。今後、ウイルス性肝癌が減少に向かうと予測されているのに対し、昨今のメタボリックシンドローム患者の急速な増加は、NAFLD・NASH 予備軍の加速度的増加を意味しており、NAFLD とそれに続く NASH は今、最も克服すべき疾患の一つである。しかしながら、この疾患群はメタボリックシンドロームを背景とすることは明らかであるものの、NAFLD から NASH、NASH から肝硬変・肝癌へと進展していくメカニズムは殆ど理解されておらず、有効な治療法もない。また、診断法も侵襲的肝生検および形態学的診断に頼らざるをえず、簡便かつ的確な診断法の開発が待望されている。

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、プロテオミクスを駆使することにより、NAFLD や NASH 関連マーカー蛋白質を探索し、NAFLD や NASH の分子病態の解明と医薬品開発に向けた基礎情報の集積を目指すことを目的とする。従って本研究は、NAFLD や NASH に対する的確な診断法の開発や有効な治療法の開発につながる挑戦的パイロット研究として期待される。

3. 研究の方法

(1) NAFLD モデルマウスの作製

6 週齢雌の BALB/c マウス (日本 SLC) に Choline-deficient L-amino acid-defined diet、以後 CDAA 食 (チャールズリバー) を 1 週間摂食させることにより NAFLD モデルマウスを作製した。

(2) NAFLD モデルマウスの評価

通常食を摂取させたマウスをコントロールに、CDAA 食摂取マウスの外見的、剖検的観察を行った。本疾患群の病巣である肝臓について、①重量測定、②Hematoxylin-Eosin 染色による病理所見の解析、③オイルレッド染色による脂肪蓄積を評価した。②については、各マウスの肝から凍結切片を作製し、マイヤーの Hematoxylin (Dako) に浸した後、Eosin (Wako) に浸水させ定法により染色した。③については、各マウスの肝凍結切片を 30 秒水洗した後、60% の 2-プロパノール溶液に 1 分間浸水させた。オイルレッド O 溶液 (Sigma Aldrich) に 37°C で 15 分浸水させた後、先ほどと同様に 60% の 2-プロパノール溶液に 1 分間浸水させた。軽く水洗後、マイヤーの Hematoxylin (Dako) に 5 分間浸水させた。流水にて洗浄後、水溶性のグリセリンで封入した。

(3) Two dimensional differential in-gel electrophoresis (2D-DIGE) 解析による発現変動蛋白質の定量解析

通常食を摂取させたコントロールマウスと CDAA 食を摂取させた NAFLD モデルマウスの肝をそれぞれ可溶性 Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10mM Tris-HCl (pH 8.5)) 中でホモジナイズし、TCA/Aceton 沈殿法 (2D-Clean up kit ; GE healthcare) にて肝蛋白質を精製した。2D Quant kit (GE healthcare) にて蛋白質濃度を測定したうえで、各蛋白質 50 μ g をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 cy2, cy3, cy5 (GE Healthcare) と氷上で 30 分間反応させ、その後 10 mM Lysine を加え、氷上で 10 分間静置して反応を停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT, 2% pharmalyte (GE Healthcare), 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS) で 450 μ l にメスアップした。一方、蛋白質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化試薬で標識していないサンプルも

同様に混合調製した。等電点泳動用の専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 4-7) ストリップ (GE Healthcare) を入れ、oil を重層した。ETTAN IPGPhor (GE Healthcare) を用いて、プレ膨潤を 10 時間行い、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma Aldrich)) に浸し、各 15 分間平衡化を行った。二次元目の SDS-PAGE を行うため、ゲル溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyl-tartardiamide gels) に IPG-gel ストリップをセットした。アガロースで封入後、Ettan Daltsix Electrophoresis System (GE Healthcare) を用いて、2 次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare) を用いて一晚染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (GE Healthcare) を使用した。

(4) 質量分析による発現変動蛋白質の同定

ゲル片に 100 μ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振盪させた後、脱色液を取り除くことで脱色を行った。続いて 200 μ l の acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器によって乾燥させることで脱水を行った。脱水したゲル片に 5 μ l の trypsin 溶液 (20 μ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。消化後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ l の 100% acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドを抽出した。このペプチド抽出液を遠心濃縮器によって濃縮し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 5 μ l を nano-LC

(EASY-nLC (Bruker Daltonics)) にて分離し、各画分のペプチドの ESI-Q-TOF MS (maxis (Bruker Daltonics)) にて配列の決定並びに、蛋白質同定を行った。なお、ペプチドの同定には、メチオニン残基の酸化、iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮した。

4. 研究成果

(1) NAFLD モデルマウスの作製と評価

6 週齢の BALB/c マウスにそれぞれ CDAA 食と通常食を 1 週間摂食させた結果、CDAA 食を摂食させたマウスでは、通常食を摂食させたマウスに比べ、毛並みが悪く、体重も増加傾向にあった。また、開腹して観察したところ、腹腔内の至る所に脂肪の沈着が認められた。中でも、肝臓では、通常食を摂食させたマウスに比べて顕著に肥大しており、肝重量も有意に上昇していた。また、色も白く、脂肪肝様の所見が観察された。そこで、脂肪の蓄積を詳細に検討するため、肝組織切片を作製し、オイルレッド染色を試みた。その結果、CDAA 食を摂食させたマウスの肝臓組織で脂肪滴が観察され、本マウスが NAFLD に移行していることが判明した。

(2) 2D-DIGE による発現変動蛋白質の定量解析と NAFLD 関連蛋白質の同定

NAFLD に関連する蛋白質を見出すため、コントロールマウスと NAFLD モデルマウスの肝試料を 2D-DIGE により解析した。その結果、コントロールマウスに比べ、NAFLD モデルマウスの肝試料で 2 倍以上発現変動していたスポットを 15 個、2 倍以上発現減少していたスポットを 18 個みいだすことができた。そこでこれらの蛋白質を質量分析解析したところ、8 種類の NAFLD 関連蛋白質を新規に同定することに成功した。今後は、これら蛋白質の発現を各種 NAFLD/NASH モデルマウスの肝臓やヒト NAFLD/NASH の肝臓で評価すると共に、NAFLD/NASH の病態における役割を解析する予定である。本研究が、NAFLD/NASH の分子病態の解明、並びに新規診断/治療法の開発に資する知見になることを期待している。

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)

- ① Yoshida Y., Yamashita T., Nagano K., Imai S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Limited expression of reticulocalbin-1 in lymphatic endothelial cells in lung tumor but not in normal lung., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 405(4):610-614, 2011. 査読有.
- ② Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Mukai Y., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., *Biomaterials*, 32(1):162-169, 2011. 査読有.

〔学会発表〕(計 2件)

- ① 渡邊貴信、長野一也、山下琢矢、岡村賢孝、金崎聡一郎、阿部康弘、吉川友章、吉岡靖雄、鎌田春彦、伊藤徳夫、小泉桂一、角田慎一、堤 康央：プロテオミクスによる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD/NASH) のバイオマーカー探索., 日本薬学会 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
- ② Watanabe T., Yamashita T., Nagano K., Kanasaki S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteomics-based analysis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice., HUP02010 World Congress, Sydney (Australia), September, 2010.

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野一也 (NAGANO KAZUYA)

医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・研究員
研究者番号 : 21890318

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

尚、本研究の研究協力者を下記に列挙する。
今澤孝善、小泉桂一、堤 康央、角田慎一、
鎌田春彦、阿部康弘、渡邊貴信、山下琢矢、
金崎聡一郎、前田祐香、井上雅己、有田修
平、古屋 剛