

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591001

研究課題名(和文) 肥満関連液性因子ANGPTL2を介した、脂肪肝・肝臓癌の病態機序の解明

研究課題名(英文) Unraveling the role of Angptl2 in the pathogenesis of steatohepatitis and liver cancer

研究代表者

富田 謙吾 (Tomita, Kengo)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・病院・講師)

研究者番号：50317129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：アンジオポエチン様分子の一つであるAngptl2は脂肪組織へのマクロファージの動員を惹起し脂肪組織局所の炎症を増悪させ、インスリン抵抗性および肥満を引き起こすadipocytokineである。メタボリックシンドロームの肝臓での表現形と考えられている非アルコール性脂肪肝(NASH)およびそれに関連した肝臓癌病態機序にAngptl2が重要な役割を果たす可能性が示唆される。そこで今回Angptl2遺伝子欠損マウスと、ヒトNASHおよび肝臓癌臨床検体を用いて、NASH発症・進展と発癌病態機序におけるAngptl2の果たす役割の解明を試みた。臨床応用を目指し、今後の研究を推進させる。

研究成果の概要(英文)：Angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) is an adipocytokine, which induces chemotaxis of macrophages to adipose tissue, exaggerates adipose tissue inflammation, and aggravates insulin resistance and obesity. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is thought to be a hepatic manifestation of metabolic syndrome. Therefore, Angptl2 may play an important role in the pathogenesis of NASH and NASH-related liver cancer. In the present study, we tried to unravel the role of Angptl2 in the progression of NASH and NASH-related liver cancer, using Angptl2-deficient mice and human liver samples in patients with NASH or liver cancer. We intend to promote necessary study and research for clinical application.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：非アルコール性脂肪肝 肝臓線維化 肝臓癌 Angptl2

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH)はメタボリックシンドロームの肝臓での表現形と考えられている。肥満人口の増加に伴い増加の一途にあるNASHは、一部が肝硬変まで進展する進行性の疾患であり肝発癌も引き起こすため、治療法の確立は緊急課題である。

NASHはその背景にインスリン抵抗性を有するケースが多いが、我々はいち早く、インスリン抵抗性改善薬でありPPAR α アゴニストであるPioglitazoneが脂肪肝炎の病態を改善することを報告した(Tomita, et al. *Gastroenterology* 2004)。同じく、インスリン抵抗性改善に関与するAMP kinaseのactivatorの投与によっても脂肪肝炎の病態が改善された(Tomita, et al. *Alcohol Clin Exp Res* 2005)。また、レプチンはインスリン抵抗性に深く関与するadipocytokineであるが、そのシグナル欠損が、肝細胞のストレスタンパク質メタロチオネインの発現誘導の抑制を介して脂肪肝炎発症への易感受性を惹起することも明らかとした(Tomita, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004)。同様にadipocytokineの一つであるTNF α が、肝臓星細胞TIMP-1発現増強を介して、NASH病態での肝線維化を促進する(Tomita, et al. *Gut* 2006)ことが判明した。一方でAdiponectinはインスリン抵抗性改善作用を有する主要なadipocytokineとして知られている。Adiponectinの肝臓での主要な受容体はAdipoR2であるが、肝臓局所でのAdiponectin/AdipoR2シグナルの増強によりNASH病態が改善し、また逆に肝臓Adiponectin/AdipoR2シグナルの減弱によりNASH病態が増悪することを我々は解明した(Tomita, et al. *Hepatology* 2008)。このように、我々はadipocytokineが全身のインスリン抵抗性の制御作用を有すると同時に、肝臓の各構成細胞へ直接的な作用機序を有し、

metabolic syndromeをバックグラウンドとするNASHの病態に深く関与することを明らかにしてきた。一方、我々は近年、ユビキチンリガーゼの構成因子であるF-boxタンパク質の一つであるFbxw7が、肝臓局所でのSREBP-1cの分解に関与し、肝臓局所でのFbxw7機能欠損により、NASH病態が発症する機序を解明した(Tomita, et al. *J Clin Invest*, 2011)。

このようなNASH肝臓局所の病態とadipocytokineシグナルとの相関において、肝臓でのKupffer細胞浸潤・活性化の機序が重要な役割を果たすことを我々は近年明らかとしている。肝臓でのTNF α シグナル増強による肝臓へのKupffer細胞の集積・活性化がNASH病態を増悪させる機序を我々は解明した(Tomita, et al. *Gut* 2006)。また、活性化増強と並行した肝臓でのKupffer細胞の貪食能低下が、ヒトNASH病態機序においても重要な役割を果たすことを我々は明らかとした(Tomita, et al. *J Magn Reson Imaging* 2008) (Tomita, et al. *Scand J Gastroenterol* 2009)。一方で、我々は近年、Kupffer細胞が主に細胞表面マーカーCD68、CD11bによりサブセット分類され、各々が貪食能、サイトカイン産生能などの機能分担を果たしているという新たな肝臓病態機序を明らかとした(Seki, et al. *Hepatology* 2008)(Seki, et al. *J Hepatol* 2010)。

一方で近年、アンジオポエチン(Ang)ファミリーの構造上の特徴であるcoiled-coilドメインとフィブリノゲン様ドメインを有するが、Tie2受容体には結合しないAng様分子(Angpt1)が、我々を含めたグループにより次々と報告され、その多彩な生物学的活性が明らかとなりつつある(Oike, et al. *Nat Med* 2005)。

特に我々は、主に脂肪組織から分泌されるadipocytokineの一つであるAngpt12が、そのケモタキシス作用と内皮細胞活性化作用

により脂肪組織へのマクロファージの動員を惹起し、脂肪組織局所の炎症を増悪させ、インスリン抵抗性および肥満を引き起こす事を近年明らかとした(Oike, et al. *Cell Metab* 2009)。ヒト血清 Angpt12 濃度は、肥満、インスリン抵抗性と有意な正の相関を呈していた。我々は、また、慢性関節リウマチ患者の関節液中の Angpt12 濃度が上昇しており、同部への単球の遊走・集積を惹起していることも明らかとした(Oike, et al. *Am J Pathol* 2010)。

以上の結果は、Angpt12 が、NASH 肝臓局所における Kupffer 細胞集積・活性化と、それに伴う肝線維化病態機序に中心的な役割を果たしている事を示唆するものである。また、Angpt12 は脂肪組織局所における TNF α および IL-6 産生を増強するが、近年それらのサイトカインの、肥満に起因する発癌への関与が報告されている(Park-EJ, et al. *Cell* 2010; 140: 197-208)。そのため NASH に起因する発癌病態への Angpt12 の関与も示唆される。

2. 研究の目的

以上より、今回各種 Angpt12 遺伝子変異マウスと、ヒト NASH および肝臓癌臨床検体を用いて、NASH 発症・進展と発癌病態機序における Angpt12 の果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は既に、Angpt12 ノックアウトマウスを作成した。これらのノックアウトマウス・wild マウスに、メチオニン・コリン欠損食、コリン欠損食投与を、各群が同一カロリーを摂取するように12週間施行しNASH モデルを作成する。また、我々は既にマウス肝臓にNASH を発症させる高脂肪食を調整しているため、同食餌に関しても各群が同一カロリーを摂取するよう24週間投与を施行しNASH モデルを作成する。同様に、これらのノックア

ウトマウス・wild マウスに CCL₄ 4週間投与、DMN 12週間投与、Bile duct ligation 施行により各々肝硬変モデルを作成する。また同様に、Diethylnitrosamine 6週間投与、またはコリン欠損食+ethionine 9カ月投与による、肝臓癌モデルを作成する。併せて、近年報告された、高脂肪食摂取とDiethylnitrosamine の組み合わせによる肥満誘導性の肝臓発癌モデル (Park-EJ et al. *Cell* 2010; 140: 197-208)も作成する。さらに、部分肝切除実験を施行することにより、肝再生モデルも作成する。その後、各群のマウスの肝臓、内臓脂肪、皮下脂肪、骨格筋、血清を採取し、脂肪肝・肝障害・肝臓線維化・肝臓発癌・肝臓再生の差異を、組織学的・血清学的に評価検討する。

防衛医科大学校病院の単純性脂肪肝・NASH 患者、肝臓癌患者における血清 Angpt12 濃度の測定、Angpt12 遺伝子の SNP 解析を施行する。肝生検によって得られた組織より RNA を回収し、各種マーカー遺伝子の発現量を検討するとともに、免疫組織学的検討もおこなう。上記の動物実験で得られた知見とヒト病態との相関の検討をおこなう。本検討は、防衛医科大学校倫理委員会の承認のもと、文書にて患者の承諾を得た上で施行する。

4. 研究成果

実験モデル各群の肝臓より、RNA、タンパク質を抽出し、DNA array 法、Real time PCR 法、Western blot 法、免疫沈降法、Gel shift assay 法を用い、Akt、MAPK、AMP キナーゼ、PPAR α , beta gamma signal、サイトカインを初めとした各種パラメーター及び、STAT3 を含む転写因子の変化を定量的に評価している。ミトコンドリア抽出により、その膜電位・ATP 合成を定量評価している。また、各グループ内で、肝臓 RNA・タンパク質、血清タンパク質に関して、DNA マイクロアレイ法および protein chip 法をおこない、病態形成に有意義と考えられる遺伝子産物のピ

ックアップも施行中である。また、グルコースクランプ法、HOMA 指数によりインスリン抵抗性の変動を評価している。作成した肝臓癌・肝再生モデルに関しては apoptosis、細胞増殖能に関わる各種マーカーの評価検討を施行中である。

さらに我々は、ヒト NASH 病態の進展とともに肝臓 Angpt12 発現が上昇していることを明らかにした。そして肝臓における Angpt12 発現への肝星細胞の寄与が大きいことが明らかとなった。

現在得られたデータより、Angpt12 の肝臓構成細胞に対する直接作用のレベルで、非アルコール性脂肪肝炎・肝臓線維化・肝臓癌の病態機序に果たす Angpt12 の役割が解明されつつある。Angpt12 に関わるこれらの知見を、実際の臨床における診断・治療へ応用させるべく、今後の研究を推進させる。

Angpt12 は脂質異常症における動脈硬化を増悪させるが、我々は、食事由来のコレステロールが肝臓構成細胞の 1 つである肝星細胞に遊離コレステロールとして蓄積し、TLR4 シグナルの増強を介して肝星細胞の TGF β 感受性を増強し、肝臓線維化を増悪させることを明らかにした (Tomita, et al.

Gastroenterology 2012)。さらに肝星細胞での遊離コレステロール蓄積は、NASH 病態をも進展させた (Tomita, et al. *Hepatology* 2014)。また、肝星細胞遊離コレステロール蓄積機構の詳細なメカニズムと、それが、肝臓線維化病態増悪の悪循環機構を形成することも明らかとなった (Tomita, et al. *Hepatology*, 2014)。

さらに、遊離コレステロール代謝酵素 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 欠損が、肝臓線維化を増悪させる機序の解明 (Tomita, et al. *J Hepatol*, 2014 in press) や、NASH 病態において、肝臓での細胞老化シグナル因子 p53 が病態機序に果たす役割の解

明 (Tomita, et al. *J Hepatol*, 2012) も施行した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

1. Tomita K (28 人中 1 番目), et al. : Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1 mediates liver fibrosis by regulating free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2014 in press, 査読有
2. Tomita K (23 人中 2 番目), et al. : A pregnant woman with noncomatose autoimmune acute liver failure in the second trimester rescued using medical therapy: A case report. *Hepatology Res* 2014 in press 査読有
3. Tomita K (23 人中 1 番目), et al. : Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 59(1):154-69, 2014, 査読有
4. Tomita K (8 人中 5 番目), et al. : Fibroblast growth factor-5 participates in the progression of hepatic fibrosis. *Exp Anim* 63(1): 85-92, 2014, 査読有
5. Tomita K (14 人中 9 番目), et al. : Prevalence of serum celiac antibody in patients with IBD in Japan. *J Gastroenterol* 49(5): 825-834, 2014, 査読有
6. Tomita K (14 人中 2 番目), et al. : Effect of Telmisartan or Losartan for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Fatty Liver Protection Trial by Telmisartan or Losartan Study (FANTASY). *Int J Endocrinol* 2013:

- 587140, 2013. doi:
10.1155/2013/587140. 査読有
7. Tomita K (12人中9番目), et al. : C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice. **Hepatology** 58: 337-350, 2013, 査読有
 8. Tomita K (13人中9番目), et al. : Trans fatty acids in diets act as a precipitating factor for gut inflammation?.
J Gastroenterol Hepatol 28 Suppl 4: 29-32, 2013, 査読有
 9. Tomita K (12人中8番目), et al. : Trans fatty acids exacerbate dextran sodium sulphate-induced colitis by promoting the upregulation of macrophage-derived proinflammatory cytokines involved in T helper 17 cell polarization. **Clin Exp Immunol** 174 (3): 459-471, 2013, 査読有
 10. Tomita K (15人中12番目), et al. : Phlebosclerotic colitis that was difficult to distinguish from collagenous colitis. **Dig Endosc** 2013 Jul 31. doi: 10.1111/den.12151, 査読有
 11. Tomita K (15人中12番目), et al. : 1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid from *Propionibacterium freudenreichii* reduces inflammation in interleukin-10-deficient mice with colitis by suppressing macrophage-derived proinflammatory cytokines. **J Leukoc Biol** 94: 473-480, 2013, 査読有
 12. Tomita K (15人中12番目), et al. : Involvement of autotaxin/lysophospholipase D expression in intestinal vessels in aggravation of intestinal damage through lymphocyte migration. **Lab Invest** 93: 508-519, 2013, 査読有
 13. Tomita K (15人中12番目), et al. : Endoscopic finding of spontaneous hemorrhage correlates with tumor necrosis factor alpha expression in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis.
Int J Colorectal Dis 28: 1049-1055, 2013, 査読有
 14. Tomita K (15人中12番目), et al. : Dietary lipids and sweeteners regulate glucagon-like peptide-2 secretion. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 304: G708-714, 2013, 査読有
 15. Tomita K (18人中2番目: equally contributed first author), et al. : A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. **Gastroenterology** 142: 152-164, 2012, 査読有
 16. Tomita K (23人中1番目), et al. : p53/p66Shc-mediated signaling contributes to the progression of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice. **J Hepatol** 57: 837-843, 2012, 査読有
 17. Tomita K (11人中6番目), et al. : Indomethacin-induced small intestinal injury is ameliorated by cilostazol, a specific PDE-3 inhibitor. **Scand J Gastroenterol** 47: 993-1002, 2012, 査読有
 18. Tomita K (15人中7番目), et al. : HIF-1 in T cells ameliorated dextran sodium sulfate-induced murine colitis. **J Leukoc Biol** 91: 901-909, 2012, 査読有

有

19. Tomita K (10人中1番目), et al. : Serum immunoglobulin A concentration is an independent predictor of liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis before the cirrhotic stage. **Dig Dis Sci** 56: 3648-3654, 2011, 査読有
20. Tomita K (10人中1番目), et al. : Plasma free myristic acid proportion is a predictor of nonalcoholic steatohepatitis. **Dig Dis Sci** 56: 3648-3654, 2011, 査読有
21. Tomita K (8人中4番目), et al. : Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. **J Clin Invest** 121: 342-354, 2011, 査読有

[学会発表](計 33件)

1. Tomita K (17人中1番目) The characteristic Mechanisms of Free Cholesterol Accumulation in Hepatic Stellate Cells Aggravate liver fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice. The 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of Liver Diseases. Amsterdam, The Netherlands, April 24-28, 2013.
2. Tomita K (17人中1番目) p53/p66Shc signaling pathway plays a role in nonalcoholic steatohepatitis progression in human and mice. The 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Liver Diseases. Barcelona, Spain, April 18-22, 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 謙吾 (TOMITA KENGO)

防衛医科大学校・病院・講師

研究者番号 : 50317129

(2)研究分担者

関 修司 (SEKI SHUJI)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号 : 80531392

(3)連携研究者

尾池 雄一 (OIKE YUICHI)

熊本大学・大学院・教授

研究者番号 : 90312321