

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592689

研究課題名(和文)新規蛋白質ナオフェンはエンドトキシンによる肝障害を制御する新たな因子となりうるか

研究課題名(英文)The functions of a new WD-repeat domain containing protein naofen to modulate LPS-induced liver dysfunction

研究代表者

馮 国剛 (Feng, Guo-Gang)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：70351111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の内毒素であるエンドトキシン(LPS)による肝障害において新規タンパク質naofen(WD-repeat domainを有するので、WDR35とも言われる)の役割を調べてきた。LPSはクッパー細胞を活性化させ、TNFなどの炎症性サイトカインを遊離することによって肝細胞のnaofen発現を増加させる。増加したNaofenは細胞のアポトーシスを抑制する物質であるBcl-2、Bcl-xLの発現を抑制し、肝細胞のアポトーシスを誘導したことを明らかにした。これらの実験結果から、エンドトキシン血症による肝障害の治療に際して、naofenが新たな標的分子になる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Endothxin (LPS) causes hepatocytic apoptosis and liver dysfunction, as described in cases of sepsis. In this study, we therefore investigated the functions of a new WD-repeat domain containing protein naofen (WDR35) in LPS-induced liver dysfunction. LPS activated Kupffer cells and released cytokines, such as TNF-alpha. Which then increased mRNA and protein expression of naofen in hepatocytes. Naofen/WDR35 inhibited expressions of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL, and stimulated apoptosis of hepatocytes. These results suggested that naofen may be involved in endotoxin-induced liver injury, and as a new therapeutic targets for endotoxin-induced liver injury therapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：エンドトキシン(LPS) クッパー細胞ptosis TNF caspase-3 アポトーシス Bcl-2 Bcl-xL cytochrome c

1. 研究開始当初の背景

エンドトキシン (lipopolysaccharide: LPS) は肝炎・肝障害の病態を修飾したり、助長することで、多臓器不全の引き金となり予後に悪い影響を与えている。ヒトの腸管内には、LPS の産生源になるグラム陰性細菌が存在する。肝疾患においては敗血症などの感染症の兆候がないにも関わらず血中の LPS が陽性となる症例が多く存在する。LPS による肝炎・肝障害の病態進行に与える影響の解明は、炎症の発生機序と感染防御機構の究明に極めて重要であると考えられる。

そこで、本研究ではエンドトキシンによる肝障害の発症・進行における新規体内物質 naofen (WD-repeat domain を有することから、WDR35 とも言われる) の役割を調べ、肝障害の発生機序を解明するとともに、肝障害に対して新たな治療法および予防法を探索する基礎的な研究情報を提供する。

2. 研究の目的

(1) LPS による肝細胞アポトーシスの発生と naofen/WDR35 発現の変化との関連について調べた。さらに、初代培養した肝細胞あるいはクッパー細胞を用いて、肝細胞アポトーシス発生において naofen/WDR35 の役割を究明し、その作用メカニズムを明らかにした。

(2) Naofen/WDR35 の発現を増加する物質を同定し、さらに naofen/WDR35 による肝細胞アポトーシスの発生においてそのシグナル伝達経路を検索した。

(3) 静脈内麻酔薬であるプロポフォールはエンドトキシンによる肝障害に対する保護作用を検討した。

3. 研究の方法

(1) In vivo 実験

モデルラットの作製:

LPS 群 (肝障害ラット群): 麻酔したラットの大腿静脈から LPS を投与した。

Propofol + LPS 群: LPS の投与 1 時間前から実験が終わるまでラット静脈内にプロポフォールを継続投与した。

Gadolinium chloride ($GdCl_3$) + LPS 群: LPS 投与 2 日前にクッパー細胞の活性化阻害剤である塩化ガドリニウム ($GdCl_3$) をラットに腹腔内に投与し、クッパー細胞を失活させる。

LPS を投与したラットから経時的に血液を採集し、血清中の AST, ALT を測定し、肝障害の進行を評価した。

Quantitative real time PCR (qPCR) と Western blot 法: 肝臓あるいは「細胞」から total RNA と蛋白質を抽出し、各種蛋白質の発現と caspase-3 の活性を測定した。

免疫染色法と TUNEL 法: 抗 naofen、BCL-2、Bcl-xL、TNF、cytochrom c などの抗体を用いて、肝臓におけるこれらの物質の発現部位と発現量の変化を調べた上に、抗 CD68 抗体 (クッパー細胞のマーカー) を用いて、TNF の発現細胞を同定した。さらに、TUNEL 法を用いて、肝細胞アポトーシスの発生を検討した。

(2) In vitro 実験

肝細胞の初代培養: ラットの肝臓を 0.05% collagenase-Hanks 液で *in situ* 灌流し、肝細胞を分離培養した。

Kupffer 細胞の初代培養: 0.02% pronase E+0.05% collagenase で灌流した肝臓し、Percoll 比重遠心法を用いて、クッパー細胞を分離培養した。

siRNA の導入: 培養した肝細胞に control siRNA および naofen siRNA を導入した。qPCR を用いて、siRNA による naofen knockdown 効果を確認した。さらに、naofen knockdown は肝細胞アポトーシスの発生に対する影響を検討した。

LPS による肝障害に対する naofen の関与: 分離後 24 時間の Kupffer 細胞を LPS を含む「培養液」で 12 時間培養した。この培養上澄み (condition medium: KC-CM) を培養液として分離後 24 時間の肝細胞をさらに 12 時間培養した。

初代培養肝細胞に naofen/WDR35 の強制発現: lipofectamine 2000 を用いて、naofen/

WDR35 を発現ベクターを導入した。

4. 研究成果

(1) 生食投与ラットに対して (LPS 500 μ g/kg) を静脈内投与したラット肝臓において投与後 3 時間から、naofen/WDR35 の発現が mRNA と蛋白質レベルで有意に増加し、9 時間後に最大におなつたと同時に、caspase-3 の活性も増大した(下記の図 1)。さらに、LPS 投与 9 時間後の肝細胞において naofen の発現増加に伴って、アポトーシス発生増加も認められた。初代培養肝細胞において、LPS 投与 (100ng/ml) は naofen/WDR35 の発現に影響を及ぼさなかったが、KC-CM は naofen/WDR35 の発現を有意に増加させた。初代培養肝細胞において KC-CM は Bcl-2 と Bcl-xL の発現を抑制したと同時に、caspase-3 活性化を促進した。これにに対して、naofen siRNA の前導入は KC-CM による Bcl-2 と Bcl-xL の発現抑制と caspase-3 活性化促進作用を消失させた。Naofen/WDR35 を強発現した肝細胞において、Bcl-2 と Bcl-xL 発現抑制、ミトコンドリアからのチトクロム c の遊離促進と caspase-3 活性の増加が認められた。以上の結果から、エンドトキシンによる誘導した肝細胞アポトーシスにおいて、LPS による活性化したクッパー細胞は naofen/WDR35 の発現を増加させた。Naofen/WDR35 はミトコンドリア経路を介してアポトーシスを促進する可能性が示唆された。Naofen/WDR35 はエンドトキシンによる肝障害の病態に強く関与し、エンドトキシン血症の治療に際して、naofen/WDR35 が新たな分子標的となる可能性が考えられる。

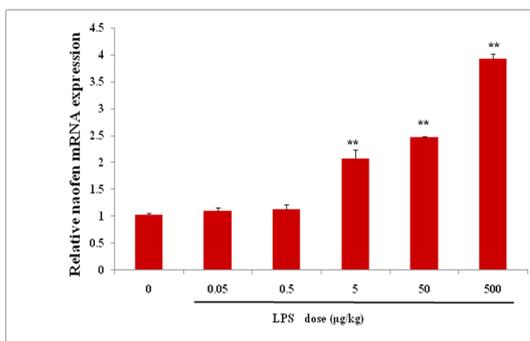


図 1

(2) LPSを投与したラットにおいてTNF の発現がmRNAとタンパク質レベルで増加し、1 時間後に最大になり、その後減少し、6 時間後ではコントロールレベルまで回復した。これに対して、プロポフォル(Prop, 5 mg/kg/h)の前投与はエンドトキシンによって増加したTNF を有意に抑制した。さらに、エンドトキシン投与 6 時間後のラットにおいて肝細胞アポトーシスの増加と血清ALTおよびAST (図2) 活性の上昇もプロポフォルの前投与によって有意に抑制された。抗TNF 抗体と抗CD68抗体(マクロファージのマーカー)を用いて、蛍光二重染色を行い、TNF の発現細胞を同定した結果、CD68の陽性細胞(クッパー細胞)にTNF が発現したことから、TNF 陽性細胞数の増加が認められた。GdCl₃の前処理はエンドトキシンによるTNF 発現増加を明らかに減少させた。以上の結果から、エンドトキシンによって活性化したクッパー細胞から、遊離したTNF は肝細胞のアポトーシス促進に重要な役割を果たしていることが示唆された。臨床用量のプロポフォルはクッパー細胞のTNF 発現を抑制したことを介して、肝細胞のアポトーシスを抑制し、肝機能を保護する可能性が示唆された(論文投稿中)。

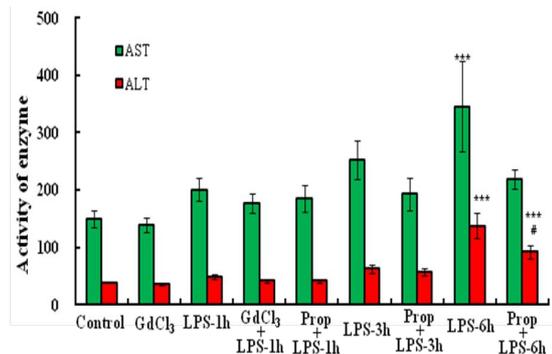


図 2

(3) LPSによる肝障害発生においてTNF は中心的な役割を果たしていることからLPSによるnaofen/WDR35の発現増加においてTNFの役割を検討した。ラット肝臓においてLPS投与後3時間からnaofen/WDR35の発現は増え始めることに先行して、TNF発現は1時間に最大になった(図3)。これに対して、抗TNF抗体の前投与はLPSによる増加した

naofen/WDR35 の発現、caspase-3 活性化と肝細胞アポトーシスを有意に抑制した。初代培養クッパー細胞において KC-CM は naofen/WDR35 発現と caspase-3 活性化を促進した。これに対して抗 TNF 抗体を用いて TNF の活性を中和した KC-CM は naofen/WDR35 発現と caspase-3 活性化 (図 4) に対する影響はほとんど見られなくなった。これらの結果から、LPS によって活性化したクッパー細胞から遊離した TNF は肝細胞の naofen/WDR35 発現を増加したことが考えられる。増加した naofen/WDR35 は肝細胞アポトーシスを誘導したことが示唆された。

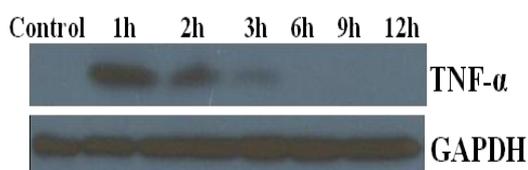


図 3

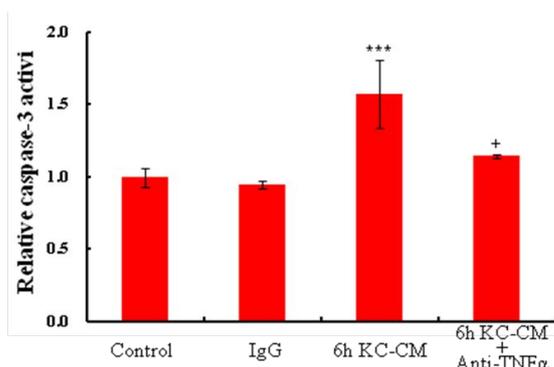


図 4

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 15 件)

1. Fan JH, Feng GG, Huang L, Tang GD, Jiang HX, Xu J. Naofen promotes TNF-mediated apoptosis of hepatocytes by activating caspase-3 in lipopolysaccharide-treated rats. *World J Gastroenterol.* 2014;20:4963-71. doi: 10.3748/wjg.v20.i17.4963. 査読有
2. Huang L, Kondo F, Goshio M, Feng GG, et al. Enhanced Expression of WD

repeat-Containing Protein 35 via CaMKK/AMPK Activation in Bupivacaine-Treated Neuro2a Cells. *PLoS One.* 2014; 9:e98185. doi:10.1371/journal.pone.0098185. 査読有

3. Huang L, Kondo F, Harato M, Feng GG, et al. Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 via nuclear factor-kappa B activation in bupivacaine-treated Neuro2a cells. *PLoS One.* 2014; 9:e86336. doi:10.1371/journal.pone.0086336. 査読有
4. Tachi Y, Hirai T, Miyata A, Ohara K, Iida T, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, et al. Progressive fibrosis significantly correlates with hepatocellular carcinoma in patients with a sustained virological response. *Hepatol Res.* 2014. DOI: 10.1111/hepr.12331. 査読有
5. Imai N, Katano Y, Kuzuya T, Honda T, Hayashi K, Ishigami M, et al. An increase in lesion density can predict lower local recurrence after transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2013;60: 965-70. doi:10.5754/hge121229. 査読有
6. Honda T, Katano Y, Kuzuya T, et al. Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. *J Med Virol.* 2013; 85(2): 228-234. doi: 10.1002/jmv.23444. 査読有
7. Hayashi K, Katano Y, Masuda H, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, et al. Pegylated interferon monotherapy in patients with chronic hepatitis C with low viremia and its relationship to mutations in the NS5A region and the single nucleotide polymorphism of interleukin-28B. *Hepatol Res.* 2013; 43(6): 580-8.

- doi: 10.1111/hepr.12005. 査読有
8. Fan JH, Feng GG, Huang L, Tsunekawa K, Honda T, et al. Role of naofen in apoptosis of hepatocytes induced by lipopolysaccharide through mitochondrial signaling in rats. *Hepatol Res.* 2012; 42:696-705. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00972.x. 査読有
9. Tsunekawa K, Kondo F, Okada T, Feng GG, et al. Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 (WDR35) stimulated by domoic acid in rat hippocampus: involvement of reactive oxygen species generation and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *BMC Neurosci.* 2013;14:4. doi: 10.1186/1471-2202-14-4. 査読有
10. Harato M, Huang L, Kondo F, Tsunekawa K, Feng GG, et al. Bupivacaine-induced apoptosis independently of WDR35 expression in mouse neuroblastoma Neuro2a cells. *BMC Neurosci.* 2012; 13:149. doi: 10.1186/1471-2202-13-149. 査読有
11. Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, et al. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. *J Med Virol.* 2012;84: 61-70. doi: 10.1002/jmv.22272. 査読有
12. Ishizu Y, Katano Y, Honda T, et al. Clinical impact of HFE mutations in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27:1112-6. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.06976.x. 査読有
13. Hayashi K, Katano Y, Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, et al. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. *J Med Virol.* 2012; 84: 438-44. doi:10.1002/jmv.23207. 査読有
14. Orapin Wongsawatkul, Guo-Gang Feng, et al. Effects of Naofen on Enzyme Activities of Serine Proteases and Matrix Metallo-proteinases. *International Journal of Pharmacology* 7:388-393, 2011. doi: 10.3923/ijp.2011.388.393. 査読有
15. Hayashi K¹, Katano Y, Honda T, et al. Association of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int.* 2011 Oct;31(9):1359-65. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02571.x. 査読有
- 〔学会発表〕(計 9 件)
1. 馮 国剛、黄 磊、石川 直久。NF- B は WDR35 の発現に関与する。第 87 回日本薬理学会年会。2014.3.19-21. 仙台
2. 黄 磊、近藤 文雄、馮 国剛、藤澤 明子。AMPK は bupivacaine 処理 Neuro2a 細胞における WDR35 の発現に関与する。第 87 回日本薬理学会年会。2014.3.19-21. 仙台
3. 馮 国剛、神立 伸久。LPS を投与したラット肝細胞のアポトーシスに対するプロポフォルの保護作用。第 86 回日本薬理学会年会。2013.3.21-23. 福岡
4. 黄 磊、近藤 文雄、馮 国剛、恒川 幸司。Bupivacaine 処理 Neuro2a 細胞における WDR35 の発現に対する NF- B の関与。第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.21-23. 福岡
5. Hiroyuki Kinoshita, Kazuo Ando, Guo-Gang Feng, et al. Clinical doses of propofol reduce sepsis-induced hepatocyte apoptosis via regulation of TNF

expression in the rats. ANESTHESIOLOGY™
2013 annual meeting in U.S. 2013,10 :
12-16.San Francisco.

6. 恒川 幸司、近藤 文雄、黄 磊、馮 国剛。ドウモイ酸投与ラットの海馬における新規生体内物質 Naofen の役割。第 85 回日本薬理学会年会。2012.3.14-16. 京都。
7. 黄 磊、馮 国剛、范 俊華、恒川 幸司。ブピバカインは Neuro2a 細胞における naofen 発現を増加させる。第 85 回日本薬理学会年会。2012.3.14-16. 京都。
8. 馮 国剛、范 俊華、黄 磊、石川 直久。新規生体内物質 naofen はミトコンドリア経路を介して L P S により誘導される肝細胞アポトーシスを促進する。第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会。2011.7.29-30. 東京大学薬学総合研究棟
9. 范 俊華、馮 国剛、恒川 幸司、石川 直久。LPS は肝臓で naofen 発現を増加させてアポトーシスを引き起こす。第 83 回日本薬理学会年会。2010.3.16-18. 大阪

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

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 件)

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

馮 国剛 (Feng Guo-Gang)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号：70351111

(2)研究分担者

本田 隆 (Honda Takashi)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・
特任助教
研究者番号：10378052

(3)連携研究者

()

研究者番号：