

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860526

研究課題名(和文) タンパク質チロシンフォスファターゼShp2による炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Impacts of protein tyrosine phosphatase Shp2 on liver inflammation

研究代表者

長田 直人(Nagata, Naoto)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・特任助教

研究者番号：70456408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、高脂肪食や運動習慣の欠如を背景として、脂肪肝炎(NASH)が急増している。本研究の目的は、過栄養状態の肝臓において発現が亢進するSrc homology phosphatase 2 (Shp2)が肝臓の脂肪蓄積と炎症の誘導・維持をいかに制御しているかを明らかにすることである。

本研究によって、1)肝臓特異的Shp2欠損マウスは、特殊飼料による肝臓への脂肪蓄積と炎症を著明に抑制した。2)Shp2阻害剤の投与は特殊飼料による脂肪肝炎を部分的には改善することが明らかとなった。従って、Shp2が脂肪肝炎の新しい治療標的分子となりうる所見が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Recently, non-alcoholic steatohepatitis has been rapidly increasing due to a high-fat diet and/or lack of exercise. Aim of this study is to investigate the role of Src homology phosphatase 2 (Shp2) in regulation of lipid metabolism and inflammation in the liver of mice model of NASH.

This study revealed that liver-specific deficiency of Shp2 reduced lipid accumulation and inflammation in the liver of mice fed CDAA diet. I also found that Shp2 inhibitor partially improved CDAA diet-induced NASH. Taken together, Shp2 might be a novel molecular target of NASH.

研究分野：肝臓学

キーワード：チロシンフォスファターゼ 脂肪肝炎 過栄養

## 1. 研究開始当初の背景

高脂肪食や運動不足によりもたらされる過栄養や肥満は、肝臓における糖脂質代謝異常と慢性炎症に密接に関連して、脂肪肝炎を引き起こし、近年では、原因不明の肝硬変・肝がんの主たる基盤病態であると考えられている。肥満症や2型糖尿病の増加を背景に、現在、日本人成人の約2割(約2000万人)は脂肪肝であり、少なくともその1割(200万人以上)はNASH(非アルコール性脂肪肝炎、nonalcoholic steatohepatitis)であると推定されている。

なぜ脂肪化した肝臓から炎症が生じるのか?というNASHの進展機構は未だ明らかでなく、その分子標的は十分に同定されていない。これまでにNASHに対して、糖尿病治療薬、高脂血症治療薬、抗酸化剤による治療が試みられたものの、ヒト臨床試験において十分な有効性と安全性は得られておらず、治療標的分子の同定と薬物療法の確立が急務である。

申請者らはこれまでに、肥満、糖尿病等の代謝疾患と脂肪肝に共通する基本病態としてインスリン抵抗性(インスリンシグナル伝達の不全状態)があり、モデルラットのNASHを大きく進展させることを見出した(Gastroenterology 132:282-293, 2007)。さらに、野生型マウスを高脂肪・高コレステロール食で飼育し、食餌性NASHモデルマウスを独自に作出した(Hepatology 46:1392-1403, 2007)。このモデルマウスでは、肝臓に中性脂肪とコレステロールが過剰に蓄積され、インスリン抵抗性と炎症性サイトカインの発現増強により、高度な炎症と線維化をもたらす。本モデルは、既存のモデル動物と異なり、1)特定の栄養素が欠乏した食餌や遺伝子改変を必要としない、2)ヒトNASHに類似した肝病理像と発現遺伝子プロファイルを示す、3)1年間の長期飼育により肝発がんを生じることから、過栄養を背景とした、インスリン抵抗性を合併するヒトの病態を反映したNASHモデルという特徴を有する。

本研究では、過栄養と炎症をつなぐ分子として、高脂肪食により肝臓でのタンパク質発現が誘導されるタンパク質チロシンフォスファターゼ Src homology phosphatase 2 (Shp2)に焦点を当てた。Shp2は、非受容体型チロシン脱リン酸化酵素である。ショウジョウバエから哺乳動物まで高度に保存されており、ヒト・マウスでは、全身の組織に普遍的に発現している。Shp2は、数多くのサイトカイン・ホルモン受容体、及び受容体のアダプター蛋白と複合体を形成し、下流へのシグナル伝達を調節している。実際に、Shp2をコードする遺伝子の活性化変異が、MAPキナーゼ経路を過剰に活性化させ、先天性心疾患、胸郭異常、精神遅滞等を呈するヌーナン症候群の原因となることが報告されている(Tartaglia et al., Nature Genetics, 2001)。

しかし、炎症性サイトカインの細胞内シグナル伝達に及ぼすShp2の役割は、未だ不明である。これまでに申請者は、1)高脂肪食がもたらす過栄養により、マウスの肝臓においてShp2のタンパク質発現が増加すること、2)Shp2は、インスリン受容体基質1のチロシン残基を脱リン酸化し、インスリンシグナル伝達を阻害すること、3)肝臓特異的Shp2遺伝子欠損(Liver specific Shp2 knockout, LSHKO)マウスは、高脂肪食による肥満、インスリン抵抗性、及び糖脂質代謝異常に対して抵抗性を示すことを世界に先駆けて報告した(Endocrinology 53:3158-3169, 2012; JBC 285:39750-39758, 2010)。これらの新しい知見は、Shp2がインスリン抵抗性だけでなく、炎症の増悪因子でもあることを示唆している。

## 2. 研究の目的

これまでに、申請者は、Shp2がインスリン抵抗性をもたらす機構を明らかにしたものの、Shp2が肝臓の脂肪化からの炎症の誘導・維持にも関わるか?は未だ不明である。本研究では、過栄養と炎症をつなぐ分子として、高脂肪食により肝臓でのタンパク質発現が誘導されるタンパク質チロシンフォスファターゼ Src homology phosphatase 2 (Shp2)に焦点を当てた。本研究では、1)脂肪肝炎・肝がんモデル動物において、肝臓特異的なShp2遺伝子の欠損、およびShp2阻害剤の効果を検討することにより、肝臓の脂肪化から炎症の誘導・維持におけるShp2の役割と機能を明らかにする。2)Shp2が作用する(Shp2が脱チロシンリン酸化する)炎症関連タンパク質を同定し、分子機構を明らかにすることによって、Shp2が脂肪肝炎の新規治療標的分子となる可能性を検討した。

## 3. 研究の方法

A)NASHモデルに対する肝臓特異的Shp2の遺伝子欠損効果の検証

動物: 8週齢雄性LSHKOマウスと同腹仔のShp2野生型マウスを用いた。肝臓(肝細胞)特異的遺伝子欠損マウスは、Cre-LoxPシステムを利用し、Shp2<sup>flox/flox</sup>マウスとAlbumin promoterの制御下でCreリコンビナーゼを発現するAlb-Cre Shp2<sup>flox/flox</sup>マウスの交配により作製した。

飼料: 通常食(6% fat)、メチオニン減量・コリン欠損CDA食(Research diet社) 4週間自由摂食、自由飲水後にマウスを屠殺し、肝臓と脂肪組織を回収した。得られたサンプルに対して以下に示す評価を実施した。

### 評価項目

1. 肝病理像(脂肪蓄積・炎症・線維化の程度)のスコア化: 専門の病理医に評価を依頼
2. 肝発がんの評価: 発がん頻度、がん数、

およびサイズの計測

3. 脂肪化・炎症・線維形成関連遺伝子の mRNA 発現量の測定：リアルタイム PCR 法による測定

4. 炎症関連分子の血中濃度測定：マルチプレックスサイトカインアッセイを用いた包括的な測定

5. 肝臓内リンパ球, Kupffer 細胞活性化の評価：FACS による表面抗原の免疫学的定量化

6. 肝臓中の炎症シグナル伝達の評価：従来の Western Blotting 法に加えて、抗体アレイ (CST 社) を利用。

B) Shp2 の基質となる (Shp2 によって脱チロシンリン酸化される) 炎症関連タンパク質の同定

多数の因子とシグナル経路が関与する生体の炎症制御機構のうち、Shp2 の基質となる分子を予測することは困難である。そこで、Shp2 の関与が推定される炎症シグナル経路をまず絞り込み、その後、経路の構成タンパク質と Shp2 との相互作用の有無を検討する。通常、フォスファターゼによる脱リン酸化反応は極めて短時間に行われるため、脱リン酸化酵素と基質の複合体は、不安定である。そこで、本研究では、脱リン酸化活性をもたずに基質と結合し続ける Shp2 変異体 (Shp2 C459S) を用いた共免疫沈降法により、標的となる基質分子を捕捉し (基質トラップ法) Western blotting により検出する。変異体と基質の結合特異性は、Shp2 の活性部位において基質のリン酸化チロシン残基と物理的に競合するバナジン酸によって確認する。

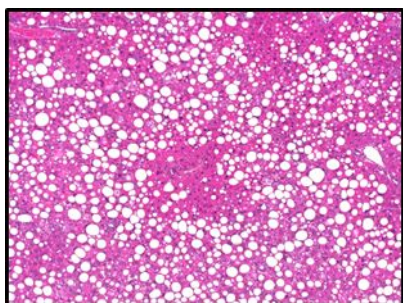
#### 4. 研究成果

肝臓の脂肪蓄積に関して

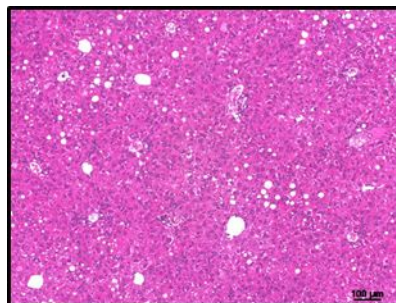
肝組織像を HE 染色にて確認したところ、肝臓特異的 Shp2 欠損マウスでは、対照マウスと比較して、肝臓への脂肪蓄積が著明に抑制されていた (図 1)。

肝臓からイソプロパノールを用いて脂質を抽出し、中性脂肪と遊離脂肪酸を定量したところ、欠損マウスは対照マウスと比較して、それぞれ 80%、84% (いずれも  $p < 0.01$ ) 減少していた。

(図 1) 肝臓 HE 染色  
対照 Shp2<sup>flox/flox</sup> マウス

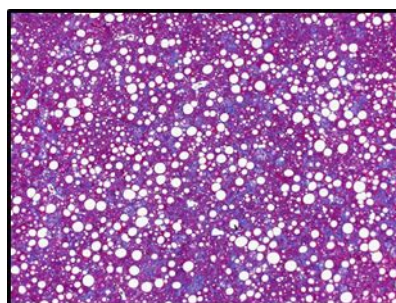


肝臓特異的 Shp2 欠損 (LSHK0) マウス

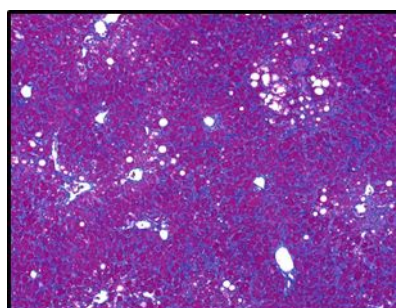


肝臓の線維化に関して  
肝組織像を Azan 染色にて確認したところ、肝臓特異的 Shp2 欠損マウスでは、対照マウスと比較して、線維化が改善傾向にあった (図 2)。

(図 2) 肝臓 Azan 染色  
対照 Shp2<sup>flox/flox</sup> マウス



肝臓特異的 Shp2 欠損 (LSHK0) マウス



肝臓の線維化を定量する目的で、コラーゲン線維特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンを測定したところ、欠損マウスは対照マウスと比較して、15%減少していた ( $p = 0.21$ )。また、肝機能マーカー ALT も欠損マウスで低下傾向を示した ( $64.7 \pm 7.7$  vs  $47.5 \pm 6.4$ ,  $p = 0.14$ )。一方で、AST 値には差を認めなかった ( $79.7 \pm 13.8$  vs  $80.3 \pm 4.7$ ,  $p = 0.98$ )。以上の結果より、肝臓特異的 Shp2 欠損は肝臓の線維化に対して、改善傾向を示すものの、その程度は軽微であることが示された。

肝臓の遺伝子発現について

肝臓から総 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により遺伝子発現解析を行った。欠損マウスの肝臓では、対照マウスと比較して、脂肪

酸合成系遺伝子(SREBP1c, FASN, 及び SCD1)、炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子(IL-1beta, TNF-alpha, MCP1, 及び CCR2)、マクロファージマーカー(F4/80, 及び CD11c)、及び酸化ストレス系遺伝子(NOX2, 及び p22phox)の発現が有意に減少していた(全て  $p < 0.05$ )。一方で、線維化関連遺伝子(TGF-beta, 及び Collagen 1a1)の発現には差を認めなかった。この所見は、上記において、肝線維化に有意差を認めなかった結果と一致するものである。

その他の結果と今後の計画に関して

CDA 食による NASH に対して、Shp2 阻害剤は部分的ではあるものの、NASH の脂肪蓄積と炎症を改善していた。今後、遺伝子の発現解析をはじめ詳細な検討を加える。以上に示したとおり、Shp2 欠損マウスと Shp2 阻害剤によって脂肪蓄積や炎症の軽減が明らかとなり、Shp2 が NASH の新規の治療標的分子となりうる所見が本研究によって得られたと考えている。

今後、どの炎症シグナル経路が改善されているのか、また Shp2 の標的分子(基質)を明らかにしていく予定である。Shp2 の基質の探索に関しては、現在、変異体プラスミドを構築し、マウス初代培養細胞への導入したところである。今後、当初の計画通り、免疫沈降物の質量分析を行い、基質分子を同定する予定である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

国際糖尿病学会議 (IDF2013)

日時: 2013 年 12 月 3 日

場所: メルボルン・オーストラリア

演者名: Naoto NAGATA, Yinhua NI, Mayumi NAGASHIMADA, Fen ZHUGE, Shuichi KANEKO, Tsuguhito OTA

演題名: Astaxanthin ameliorates hepatic insulin resistance and inhibits the progression of lipotoxic model of nonalcoholic steatohepatitis.

(口頭発表)

第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会

日時: 2013 年 5 月 18 日

場所: 熊本市 (熊本ホテルキャッスル)

演者名: 長田 直人, Graham James, 太田嗣人, Haj Fawaz

演題名: 肝臓のタンパク質チロシンホスファターゼ Shp2 による糖脂質代謝調節機構の解明

(口頭発表)

〔図書〕(計 1 件)

月刊糖尿病 Vol.5 No. 9 p32-38 (2013)

題名: 脂肪肝とインスリン抵抗性

著者名: 長田直人, 篁 俊成、医学出版、

〔その他〕

ホームページ等

研究内容紹介ホームページ

<http://ota.w3.kanazawa-u.ac.jp/study.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 直人 (NAGATA, Naoto)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・特任助教

研究者番号: 70456408