

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18993

研究課題名(和文) NASHにおける酸化ストレス 小胞体ストレス連関の分子機構解析と創薬基盤の確立

研究課題名(英文) The involvement of oxidative stress in high fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

松本 みさき (Matsumoto, Misaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80533926

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)：本研究では、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)における肝障害にNOX1/NADPH oxidaseが関わることを遺伝子欠損マウスを用いて明らかにした。NOX1 mRNAは肝類洞内皮細胞に多く発現しており、実質細胞には殆ど発現しない。NOX1発現は高脂肪食負荷およびパルミチン酸添加によって増加した。NOX1発現増加は肝類洞周囲における酸化ストレスの増加、一酸化窒素量の減少および肝星細胞の収縮をもたらし、肝臓の微小血流循環を障害することでNASHにおける肝細胞障害を惹起する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is strongly associated with obesity and metabolic syndrome. Oxidative stress is known to play a critical role in the development of NASH. In this study, we demonstrated that NOX1/NADPH oxidase is involved in the high fat diet (HFD)-induced liver injury. The mRNA expression of NOX1, but not of NOX2 or NOX4 was significantly elevated after 8 weeks of HFD. The expression of NOX1 mRNA was much higher in the fractions of liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) than in those of hepatocytes. In primary cultured LSECs, palmitic acid, a saturated free fatty acid, significantly up-regulated the level of NOX1 mRNA. The increase in NOX1 induced the nitrotyrosine adduct formation in hepatic sinusoids, the in vitro reduction of nitric oxide and the in vitro contraction of hepatic stellate cells. Accordingly, oxidative stress derived from NOX1 in LSECs may accelerate hepatocellular injury by impairment of hepatic microcirculation in NASH.

研究分野：病態分子薬理学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 酸化ストレス 肝類洞 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) への進行に酸化ストレスや小胞体ストレスが関与することが数多く報告されているが、これらのストレス応答の引き金となる分子は特定されていない。研究代表者らは予備的な実験から、肝臓に発現するスーパーオキシド産生酵素 NOX1/NADPH oxidase 1 が酸化ストレスを誘導し肝障害を悪化させることを、高脂肪食誘発性 NASH モデルマウスを用いて見出した。

2. 研究の目的

NOX1 由来の酸化ストレスが NASH においてどのように肝障害に関わるか、その機序を明らかにする。特に、近年注目されている肝臓における小胞体ストレスとの関連に注目して解析する。

3. 研究の方法

(1) NASH モデルマウスの作製

8~10 週齢の野生型マウス (wild-type: WT) または *Nox1* 遺伝子欠損マウス (*Nox1*-KO) を実験に使用した。正常食 (normal diet: ND) として CE2 飼料 (日本クレア社) を、高脂肪食 (high fat diet: HFD) として変型 F2HFD1 飼料 (オリエンタルバイオサービス社) を 8 週間マウスに給餌した。

(2) ニトロチロシンの免疫染色・ELISA

肝臓のパラフィン切片を作製し、抗ニトロチロシンウサギポリクローナル抗体 (ミリポア社) および 2 次抗体を使用し蛍光染色を行った。また、血管マーカーとして赤色蛍光標識トマトレクチン (ベクター社) を用いた。また、肝臓ライセート中のニトロチロシン含有量の定量には、ニトロチロシン ELSIA キット (アブカム社) を使用した。

(3) 肝細胞および肝類洞内皮細胞の単離

マウス肝臓をコラゲナーゼで灌流し、分散した細胞塊をさらにプロテアーゼ、DNase 処置して分散した。メッシュを通して細胞塊を除いた後、低速遠心 (20 g) にて肝細胞を単離した。その上清を用いて次に、Optiprep を用いた密度勾配遠心および磁気ビーズ標識抗 CD146 抗体 (ミルテニーバイオテック社) による磁気細胞分離を行い、肝類洞内皮細胞 (liver sinusoidal endothelial cells: LSECs) を単離した。LSECs は内皮細胞マーカーである CD31 陽性であることを確認した。これらの細胞は DMEM/10% 血清/ペニシリン・ストレプトマイシン含有培地にて 37 5% CO₂ 条件のもと培養した。

4. 研究成果

(1) 肝類洞における酸化ストレス亢進

ニトロチロシンは、活性酸素種のひとつ peroxynitrite (ONOO⁻) によってチロシン残基がニトロ化修飾されたタンパク質の総称であり、酸化ストレスマーカーとして用いられる。ND および HFD 8 週給餌の肝臓においてニトロチロシンの免疫染色を行ったところ、肝臓の中心静脈から肝細胞の隙間に沿って放射状に広がるように、ニトロチロシン免疫活性が認められた。WT および *Nox1*-KO の肝臓においても同様の染色像が認められたが、WT-HFD 群では最も強く染色される傾向があった。

次に、この局在を詳細に調べるため血管マーカーであるトマトレクチンとの二重染色を行った。ニトロチロシン免疫活性は一部トマトレクチンと共存し、極めて隣接することが明らかとなった (図 1)。

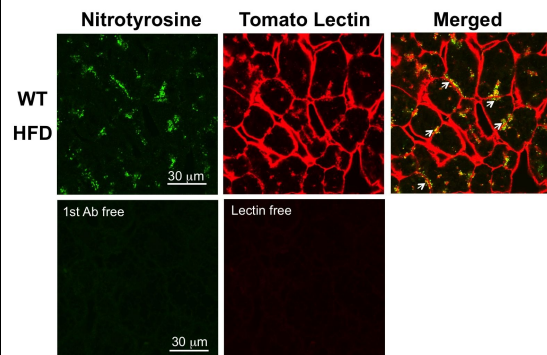


図 1. WT-HFD 肝臓におけるニトロチロシン免疫活性 (緑) と血管マーカー (赤) の二重染色

さらに、肝臓ライセートを用いて ELISA によるニトロチロシン含有量を測定した。ND 給餌下では WT および *Nox1*-KO に差は認められなかったが、WT-HFD 群ではニトロチロシン含有量が有意に増加していた。一方、*KO*-HFD 群では増加は認められなかった (図 2)。

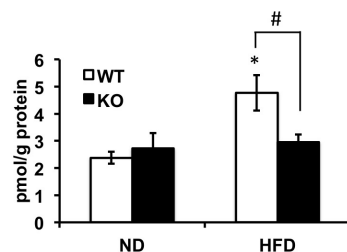


図 2. 肝臓におけるニトロチロシン含有量

以上のことから HFD モデルにおける酸化ストレスは肝毛細血管網を構成する肝類洞周囲に増加し、この増加は NOX1 依存的であることが明らかとなった。

(2) NOX1 の発現増加

Real-time PCR 法を用いて、HFD 給餌 8

週後の肝臓で NOX1 mRNA が有意に増加していることを見出した。一方、NOX2 および NOX4 は殆ど変化しなかった。

次に肝臓における NOX1 の局在を明らかにするため、肝細胞および LSECs を単離し比較した。その結果、NOX1 mRNA は LSECs に多く発現しており、実質細胞である肝細胞には殆ど発現しないことを見出した。一方、NOX4 は肝細胞に高発現していた。この結果を受けて、当初予定していた肝臓における酸化ストレス-小胞体ストレス連関の研究計画を一部変更し、LSECs における NOX1 を介した酸化ストレス産生とその細胞機能に対する影響に焦点を当てて研究を進めることとした。

肥満や HFD 給餌によって血中に遊離脂肪酸が増加することから、パルミチン酸 (palmitic acid; PA, 400 μ M) を初代培養 LSECs に処置したところ、24 時間後に NOX1 mRNA の発現誘導が認められた。この増加は TLR4 阻害剤である TAK-242 によって抑制された。

これらのことから、HFD モデルの肝臓における NOX1 増加に遊離脂肪酸が関わる可能性が示された。また、LSECs における NOX1 の発現は肝臓における酸化ストレスマーカーの局在と極めて一致することが明らかとなった。

(3) 酸化ストレスによる LSECs の細胞機能障害

上述したパルミチン酸は、諸種の細胞毒性を惹起することが知られている。最初に Caspase-3/7 活性を測定することで、lipoapoptosis に対する Nox1 欠損の影響を調べた。パルミチン酸は高濃度になるに従って LSECs の Caspase-3/7 活性を増加させたが、その程度は WT および Nox1-KO で同等であった。

スーパーオキシドは一酸化窒素と反応し peroxynitrite を産生することで、一酸化窒素を枯渇させる作用がある。そこで次に、LSECs における一酸化窒素産生量について DAF-2 蛍光プローブを用いて測定した。WT の LSECs では 24 時間のパルミチン酸処置によって DAF-2 蛍光強度の減少が認められたが、Nox1-KO の LSECs では維持されていた (図 3)。このことから、パルミチン酸処置によって増加する NOX1 由来のスーパーオキシドは一酸化窒素と反応し、肝臓における一酸化窒素のバイオアベイラビリティを著しく減少させることが明らかとなった。

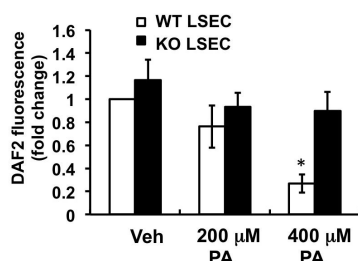


図3. 初代培養LSECsにおける一酸化窒素産生量

一酸化窒素は内皮由来血管弛緩因子として重要な役割を担うが、肝臓でも同様に、肝臓の毛細血管である肝類洞を弛緩させ肝微小血流循環を維持する。肝臓における一酸化窒素の減少は、肝類洞周囲の肝星細胞または線維芽細胞の過収縮をもたらす、肝微小血流循環障害を引き起こす。そこで、パルミチン酸処置によって減少した一酸化窒素の影響について調べるために *in vitro* コラーゲンゲルアッセイを行った。ヒト由来肝星細胞株 TWNT-1 細胞 (医薬基盤・健康・栄養研究所) は血清刺激によって収縮作用を示すが、この作用はコラーゲンゲル上に培養することでゲル面積の縮小度 (収縮) として定量することができる。ここに WT または Nox1-KO より単離した LSECs を共培養すると、TWNT-1 細胞によるゲル収縮は有意に抑制され、LSECs 依存性弛緩効果が認められた。一方、この弛緩効果は 24 時間のパルミチン酸処置によって消失したが、KO-LSECs では維持されていた。

以上のことを合わせて考察すると、LSECs 由来の一酸化窒素は NOX1 由来のスーパーオキシドによって消費され、肝臓の微小血流循環を障害し、NASH における肝細胞障害を惹起または促進する可能性が考えられた。また、スーパーオキシドによる一酸化窒素消費に伴って増加する peroxynitrite そのものが強い細胞毒性を有することから、肝類洞で発生した peroxynitrite によって肝細胞障害が生じる可能性も示唆された。現在、経口投与可能な NOX1 阻害薬が海外において開発中の段階にあるが、本研究成果は NOX1 を標的とした新しい NASH 治療戦略の開発に繋がると期待される。

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 4 件)

松本みさき、張嘉、張雪晴、矢部千尋：
NASH の発症に関わる活性酸素産生酵素 NADPH オキシダーゼ、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 (長崎)

M. Matsumoto, J. Zhang, X. Zhang, C. Yabe-Nishimura. A potential role for Nox1 isoform of NADPH oxidase in the development of nonalcoholic steatohepatitis. Program No.425, SfrBM's 23rd Annual Meeting (SfrBM/SFRRI 2016), Hyatt Regency San Francisco (USA), Nov 2016

松本みさき、張 嘉、張 雪晴、矢部 千尋：非アルコール性脂肪性肝炎モデルの肝類洞における酸化ストレスの解析、第59回日本糖尿病学会、2016年5月（京都）

矢部 千尋、**松本みさき**、張 嘉：非アルコール性脂肪性肝炎モデルにおける活性酸素種産生酵素 NOX1 の役割、58回日本糖尿病学会（第2回肝臓病と糖尿病・代謝研究会）、2015年5月（山口）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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：
出願年月日：
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

松本みさき（MATSUMOTO, Misaki）
京都府立医科大学・大学院医学研究科病態
分子薬理学・助教
研究者番号：80533926

(2) 研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

（ ）

研究者番号：

(4) 研究協力者

（ ）