

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00931

研究課題名(和文)生活習慣の乱れから起こるNAFLD/NASHの診断キットの開発

研究課題名(英文)Development of a diagnostic kit for NAFLD/NASH due to unhealthy lifestyle habits

研究代表者

長嶺 憲太郎 (Nagamine, Kentaro)

広島国際大学・医療栄養学部・教授

研究者番号：80412352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)患者の早期発見のための非侵襲的なバイオマーカーの同定を目的としている。まず、フルクトース処理により糖化させた培養細胞から、糖化された蛋白質としてHNRNPMを同定した。次に、HNRNPMの機能を減弱させた細胞における遺伝子発現の変化を確認したところ、RASGRP2を含む複数個の遺伝子の発現量が増減していたことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HNRNPMは、ヒトの糖尿病を模倣した培養細胞から見つかったものであり、NASHの原因遺伝子の候補となりえる。HNRNPMの機能の減弱によって発現が変化する遺伝子の中には、バイオマーカーとなり得るものが含まれている可能性が考えられる。これらバイオマーカーを用いてNAFLD/NASH診断用キット(簡易化したもの)を構築することができれば、大掛かりな機器や手間を必要とせず診療所レベルでの検査も期待でき、利用分野の拡大が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify noninvasive biomarkers for the early detection of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Initially, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (HNRNPM) was identified as a glycosylated protein from cultured cells treated with fructose for glycation. Subsequently, changes in gene expression in cells subjected to the attenuation of HNRNPM function were analyzed. The expression levels of multiple genes, including RAS guanyl-releasing protein 2, had either increased or decreased.

研究分野：分子生物学

キーワード：NASH AGE LAMP バイオマーカー 診断 生活習慣病

## 1. 研究開始当初の背景

NASH は、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝炎に類似する組織所見を呈する疾患である。これは、生体内のタンパク質と食事を取る食品に含まれている糖（特にフルクトース）が結びついてできるある種の終末糖化産物（AGEs）が病因物質であるとの報告がある。しかしながら、ヒトの血中や肝臓における AGEs 量は NASH 以外の様々な疾患においても増加するため、研究材料として NASH 患者の組織を利用する場合、当該患者が同時に NASH 以外の疾患を罹患していると使用できない。そこで我々は、NASH でのみ認められる AGEs の蓄積に依存するバイオマーカーを同定するため、肝細胞培養系を用いた研究を行っている。

## 2. 研究の目的

NASH は、自覚症状がほとんどないことから肝硬変・肝臓へと進行するケースが多い疾患である。また、NASH 患者は 100 万人程度と推定されているが、簡便な診断法が開発されるとさらに激増すると言われており原因究明が急がれる疾患である。本研究の目的は、申請者らが見いだした新規糖化タンパク質 HNRNPM に着目し、特異的且つ非侵襲的な診断マーカーの選定により早期診断を可能とし、栄養指導等による患者の QOL の改善に寄与することである。さらに、本研究で得られた遺伝子の中には NASH 発症の原因となるものが存在することも考えられるため、それらの機能を解析することで原因究明に繋げることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) マイクロアレイによる遺伝子探索

#### HNRNPM ノックダウン

ヒト肝癌細胞株 Hep3B の HNRNPM の発現を抑制させるため、HNRNPM をターゲットにした 2 つの Silencer Select siRNAs (si1 と si2) (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を設計した。そして、MISSION siRNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて siRNA のトランスフェクションを行った。

#### マイクロアレイ解析

ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて、未処理の Hep3B と HNRNPM 発現を抑制した Hep3B から total RNA を単離後、Cy3-CTP または Cy5-CTP で蛍光標識したものを利用し、DNA マイクロアレイを行った。解析は、Agilent Microarray Scanner を用いてデータを得た後、Agilent Feature Extraction software 10.7.3.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いた。ジーンオンロジー解析は AmiG02 により行った。

### (2) LAMP 法による検出系の確立

#### LAMP 法の検討

ストレプトコッカス ミュータンスの DNA を pGEM-T Easy Vector に組み込み (SM プラスミドと cnm プラスミド)、LAMP 反応の評品とした。LAMP 用プライマーを作製し (SM プライマーと cnm プライマー)、上記で作製したプラスミド DNA 鋳型を鋳型として LAMP 反応を行った。LAMP 反応は 64 で 2 時間反応させた後、紫外線ランプ下で反応チューブを観察した。

#### 唾液の培養法の検討

cnm 陽性ストレプトコッカス ミュータンスを保有することが分かっている被験者から採取した唾液 20  $\mu$  L を 2 mL の BHI 液体培地に移して、1 日間培養後の培養液を回収した (唾液の BHI 液体培地による培養液)。

別途、同唾液 20  $\mu$  L を、内直径 6 cm のシャーレ中に作成した MSB 寒天培地上に載せて、37 で 24 時間静置培養した。この培養後にコロニーは目視観察により認められなかった。次いで、この MSB 寒天培地上に 50  $\mu$  L の BHI 液体培地を注入して、培地表面を洗った後、回収した (MSB 寒天培地上の菌の回収液)。

唾液の BHI 液体培地による培養液、及び MSB 寒天培地上の菌の回収液を、それぞれ 1  $\mu$  L ずつ用いて LAMP 反応液を調製した。別途、SM プラスミド及び cnm プラスミドを、それぞれ 1  $\mu$  L ずつ用いて LAMP 反応液を調製した。

### (3) RASGRP2 の機能解析

## Rap1 活性の測定

培養細胞を RIPA バッファーで溶解し、RalGDS-RBD Agarose Beads (Cell Biolabs) を加えて 1 時間混和後、ビーズを SDS サンプルバッファーに溶解した。その後、SDS-PAGE を行い、抗 Rap1 抗体にて検出した。

## アポトーシスの測定

培養細胞を TNF で処理した後、NucView488 (Biotium Inc.) で染色した。顕微鏡観察下、蛍光を発する細胞をデータ化し ImageJ を用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロアレイによる遺伝子探索

#### HNRNPM 発現抑制の確認

siRNA を用いた RNA 干渉により HNRNPM がノックダウンされたことをウエスタンブロットによって確認した。その結果、設計した si1 及び si2 いずれにおいても HNRNPM の発現量はコントロールと比較して著しく減少していた (右図)。

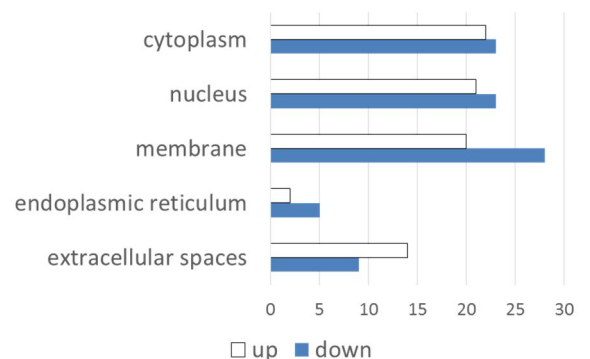
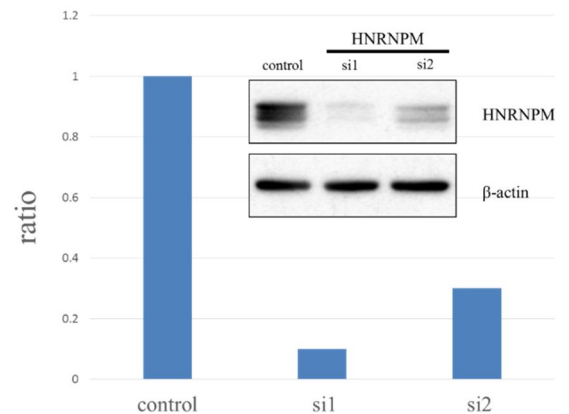
#### DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変化

HNRNPM ノックダウンに伴う遺伝子発現の変化について解析するため、RNA 干渉によって HNRNPM 発現を抑制したヒト肝癌細胞株 Hep3B を用いて、DNA マイクロアレイを行った。その結果、138 遺伝子の発現が 1.5 倍以上増加しており、100 遺伝子の発現が 1.5 倍以上減少していた。

#### ジーンオントロジー解析

1.5 倍以上発現量が変化した遺伝子の細胞内局在について調べるため、ジーンオントロジー解析を行った。ジーンオントロジー解析は、タグを基に遺伝子を 3 つのカテゴリ (biological process、cellular component、molecular function) に分け、そこからさらに詳細なカテゴリに分類することができる。今回、非侵襲的バイオマーカーとなり得る遺伝子を選別するため、cellular component に絞って分類した (右図)。その結果、発現が増加した 138 遺伝子では、79 遺伝子が cellular component に分類され、このうち cytoplasm が 22 遺伝子、nucleus が 21 遺伝子、membrane が 20 遺伝子、endoplasmic reticulum が 2 遺伝子、extracellular spaces が 14 遺伝子あった。発現が減少した 100 遺伝子では、88 遺伝子が cellular component に分類され、このうち cytoplasm が 23 遺伝子、nucleus が 23 遺伝子、membrane が 28 遺伝子、endoplasmic reticulum が 5 遺伝子、extracellular spaces が 9 遺伝子あった。

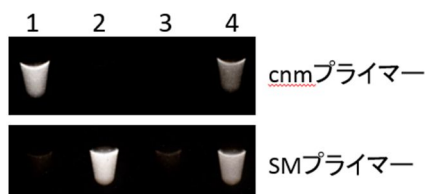
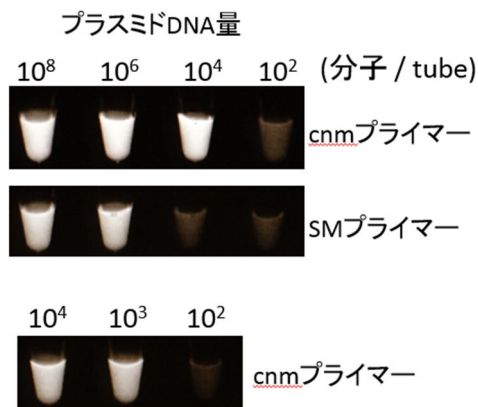
非侵襲的なバイオマーカーを開発するには、血中等で測定できる蛋白質でなければならない。そのため、細胞外に分泌される蛋白質をコードした遺伝子に着目した。今回見出した遺伝子産物の細胞分布をジーンオントロジー解析によって調べた結果、細胞外で機能すると同定された遺伝子のうち、発現が増加したものは 14 遺伝子あり、減少したものは 9 遺伝子見出された。このうち、発現が増加した 6 遺伝子と減少した 6 遺伝子が、細胞外分泌顆粒であるエクソソームに含まれると同定された。エクソソームは唾液等に含まれているため、非侵襲的に検出するためには有用なターゲットとなり得る。今後、それらの遺伝子を詳細に解析し、バイオマーカーに繋げていきたい。



No.	Function description	Genes	
		up	down
1	cytoplasm	22	23
2	nucleus	21	23
3	membrane	20	28
4	endoplasmic reticulum	2	5
5	extracellular spaces	14	9

## (2) LAMP 法による検出

非侵襲的なサンプリング法の一つに、唾液を用いる方法がある。そこで、唾液から LAMP 法による遺伝子増幅が可能か検討した。予備検討として、まずは口腔内細菌を検出できるか検討することにした。ストレプトコッカス ミュータンスを検出するプライマーを 2 種類 (SM プライマーと *cnm* プライマー) 作製し、LAMP 反応を行った。この結果、SM プライマーは 100 万分子の DNA が無ければ検出できなかったが、*cnm* プライマーは、1000 分子程度の DNA を検出することができた (右図)。この結果から、プライマーの作製方法 (塩基配列や使用量) を検討することにより、高感度な検出系を作り出すことが可能であることが示唆された。



- 1: *cnm*プラスミドDNA
- 2: SMプラスミドDNA
- 3: 唾液を液体培地で1日培養
- 4: 唾液を培養プレートで1日培養

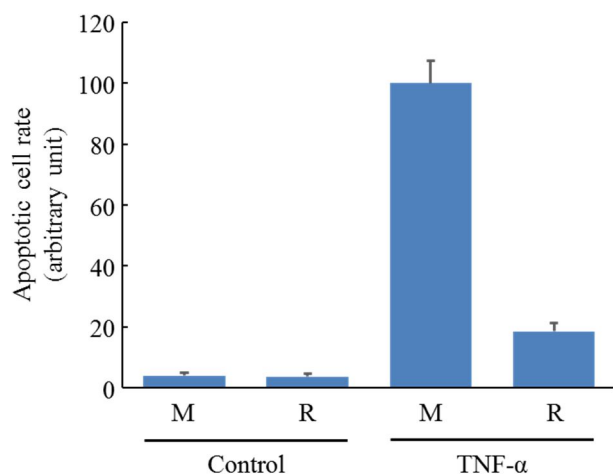
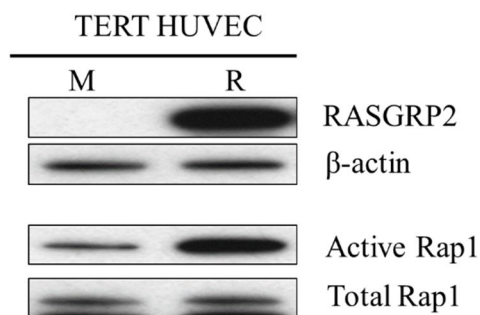
実際に口腔内ストレプトコッカス ミュータンスを簡便に検出できるか検討したところ、唾液を液体培地で 1 日培養しても検出できないのに対して、培養プレートで 1 日培養すれば検出できることを見出した (左図)。現在までに確立されている方法では、ストレプトコッカス ミュータンスの検出には 4-5 日かかっていたが、本法を用いれば 2 日で検出できる事を見出し、特許出願した。

以上の結果から、予備検討ではあるが、唾液を用いて LAMP 法により遺伝子増幅をすることが可能であることが分かった。これを応用することにより、エキソソーム中に存在しているバイオマーカーを指標とした診断に繋がりたいと考えている。

## (3) RASGRP2 の機能解析

NASH になり肝臓に炎症が起これば、炎症性のサイトカインが肝細胞から放出される。血管内皮細胞には、このような炎症性サイトカインから自分自身を守り、アポトーシスを防ぐ仕組みがあることが知られている。今回、HNRNPM の発現量を低下させた培養細胞 (MiaPaCa2 細胞株) において、遺伝子発現量が増加したものの中で血管内皮細胞の機能に關与する遺伝子として RASGRP2 を見出したので、この蛋白質の機能解析を行った。

RASGRP2 は低分子量 G 蛋白質である Rap1 を活性化することが知られているが、血管内皮細胞での活性については調べられていない。そこで、血管内皮細胞においても Rap1 を活性化するかを調べた結果、Mock の細胞株 (M) と比較して、RASGRP2 過剰発現株 (R) において Active Rap1 のバンドが濃くなっていることから Rap1 活性が亢進していることが確認できた (上図)。

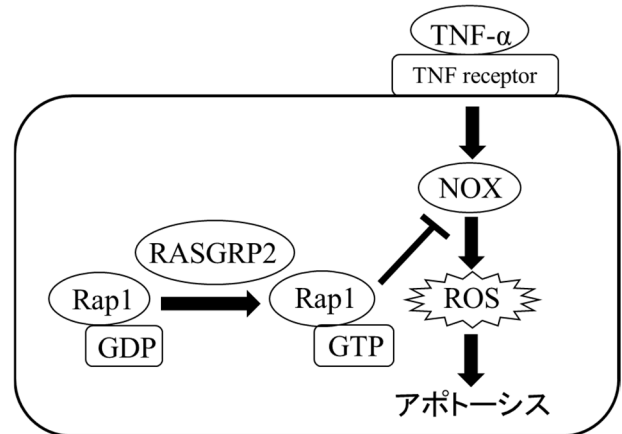


アポトーシスを起こす因子として TNF が知られている。そこで、TNF によって惹起されるアポトーシスに対する RASGRP2 の細胞増殖への影響について検討した。この結果、RASGRP2 過剰発現株 (R) は TNF によって惹起されるアポトーシスに対して抵抗性を持つことが分かった (左図)。このアポトーシス抵抗性の分子メカニズムを解明するために、TNF シグナリングに關与している蛋白質であり、Rap1 の標的分子としても知られている NOX 蛋白質の阻害実験を行った。この結果、Mock の細胞株は、NOX 蛋白質の阻害剤である DPI を前処理することによって ROS の生成およびアポトーシスの誘導が抑制された。一方、RASGRP2 過剰発現株は、DPI を前処理して

も ROS の生成およびアポトーシスの誘導に変化が見られなかった。これらのことから、血管内皮細胞において RASGRP2 によって活性化された Rap1 が、NOX 蛋白質を介する TNF シグナリングに影響を与えていることが考えられた。

以上の結果をまとめると右図のようになる。TNF からのシグナルは、NOX 蛋白質を介して活性酸素種である ROS を生成し、アポトーシスを引き起こすことが知られている。今回、RASGRP2 は Rap1 を活性化することによって、NOX 蛋白質の作用を減弱することでアポトーシスに抵抗性を示すことが明らかとなった。

上述した通り、NASH になり炎症が惹起されると血管内皮細胞にもダメージが起こる。そこで血管内皮細胞は、RASGRP2 の発現を誘導して自身のアポトーシスに対して抵抗性を示すように働くことが考えられる。今回の結果は、NASH に伴う炎症の進行を抑えるような薬の開発等に貢献できる可能性を示唆するものと考えており、今後もより詳細なメカニズムの解明を行っていききたい。



## 5. 主な発表論文等

### [学術論文] (計2件)

佐藤 拓真、瀧野 純一、長嶺 憲太郎、西尾 和人、堀 隆光、RASGRP2 suppresses apoptosis via inhibition of ROS production in vascular endothelial cells、The Scientific World Journal、査読有、2019、4639165、DOI: 10.1155/2019/4639165

瀧野 純一、長嶺 憲太郎、鈴木 美琴、逆井(坂井)亜紀子、竹内 正義、堀 隆光、Gene expression changes associated with the loss of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M function、American Journal of Molecular Biology、査読有、2017、87-98、DOI: 10.4236/ajmb.2017.72007

### [学会発表] (計9件)

瀧野 純一、長嶺 憲太郎、佐藤 拓真、竹内 正義、堀 隆光、肝星細胞の活性化における終末糖化産物(AGEs)の細胞死抑制、日本薬学会第139年会、2019

長嶺 憲太郎、北川 雅恵、應原 一久、新谷 智章、小川 郁子、栗原 英見、日本人における *Cnm<sup>+</sup> Streptococcus mutans* 保菌者の実態に関する検討、第22回日本病態栄養学会年次学術集会、2019

北川 雅恵、應原 一久、長嶺 憲太郎、新谷 智章、小川 郁子、栗原 英見、*Cnm*-positive *Streptococcus mutans* 保菌者の実態に関する検討：予備的研究、第11回日本口腔検査学会総会、2018

瀧野 純一、長嶺 憲太郎、佐藤 拓真、竹内 正義、堀 隆光、肝星細胞の活性化における終末糖化産物(AGEs)の影響、日本薬学会第138年会、2018

長嶺 憲太郎、瀧野 純一、和氣 亜莉沙、安田 華織子、竹内 正義、堀 隆光、RNA結合蛋白質 HNRNPM のノックダウンによる下流遺伝子の網羅的解析、日本薬学会第138年会、2018

佐藤 拓真、瀧野 純一、長嶺 憲太郎、堀 隆光、RASGRP2による血管内皮細胞死の抑制、2017年度生命科学系学会年次大会、2017

佐藤 拓真、瀧野 純一、長嶺 憲太郎、堀 隆光、Ras guanyl releasing protein2 (RASGRP2)による血管内皮細胞死の抑制、日本薬学会第137年会、2017

鈴木 美琴、長嶺 憲太郎、瀧野 純一、佐藤 拓真、竹内 正義、堀 隆光、HNRNPM ノックダウンによる遺伝子発現変化の解析、日本薬学会第137年会、2017

瀧野 純一、長嶺 憲太郎、永井 真也、山根 惇、平石 勇、逆井(坂井)亜紀子、竹内 正義、堀 隆光、Glycer-AGEsに関連したNASHの非侵襲的バイオマーカー探索、第55回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四

国支部学術大会、2016

[産業財産権]

出願状況（計1件）

名称：ストレプトコッカス ミュータンスの検出方法

発明者：長嶺 憲太郎、北川 雅恵、栗原 英見

権利者：学校法人常翔学園、国立大学法人広島大学

種類：特許

番号：特願 2018-203498

出願年：平成 30 年

国内外の別：国内