

令和元年6月8日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19343

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎進展に関与するERストレスの同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of identification of the ER stress to be involved in non-alcoholic fatty liver disease and the new therapy

研究代表者

的野 智光(MATONO, TOMOMITSU)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60571841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：FLS、FLS-ob/obモデルマウスの肝組織からERストレスの発現を確認した。FLS-ob/obマウスは24週齢、36週齢では脂肪肝炎を、36週齢、48週齢で明らかな肝線維化を認めた。Tgfb1、Colla1、Timp-1の発現は、24週齢、36週齢、48週齢で有意に増加しており、Tgfb1、Timp-1は週齢が進むにつれて増加した。ERストレス関連遺伝子であるAtf3、Nupr1、C-junの発現はFLSマウスに比較して24週齢、36週齢、48週齢で有意に増加していた。結果として、NASHの病態進展にはERストレスが関与していることが明らかとなり、臨床応用への可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、非アルコール性脂肪肝炎の病態進展に小胞体ストレスの関与が報告されているが、本研究は、FLS-ob/obマウスを用いて、非アルコール性脂肪肝炎における小胞体ストレスの役割について明らかにしたものである。非アルコール性脂肪肝炎マウスでの肝線維化進展にAtf3、Nupr1、C-jun遺伝子発現が増加し、さらにアポトーシスが深く関与している可能性が示唆された。本研究は、非アルコール性脂肪肝炎において、小胞体ストレス遺伝子であるAtf3、Nupr1、C-jun遺伝子が肝線維化や炎症などの病態形成に関与する新たな知見であり、将来的に非アルコール性脂肪肝炎の創薬に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify that ER stress is involved in NASH. We confirmed the expression of ER stress in liver tissue of FLS and FLS-ob/ob model mouse. We analyzed the gene expression of ER stress by using RT-PCR. Severe steatohepatitis was detected in 24 and 36 weeks in FLS-ob/ob mouse and liver fibrosis at 36 weeks of age, 48 weeks of age respectively. The gene expression of Tgfb1, Colla1 and Timp-1 significantly increased at 24, 36 and 48 weeks compared with FLS mouse. The gene expression of Tgfb1 and Timp-1 increased as a week of age advanced. The gene expression of Atf3, Nupr1 and C-jun significantly increased at 24, 36 and 48 weeks compared with FLS mouse. It was found that ER stress was involved in clinical condition extension of NASH, and likelihood to clinical application was suggested.

研究分野：非アルコール性脂肪性肝炎

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 ERストレス

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) はメタボリックシンドローム (MS) の肝における表現型であり、肝硬変、肝癌へ進展する重篤な病態である。これまで申請者は、ヒト NASH に最も類似した NASH モデルマウスとして FLS-*ob/ob* マウス、単純性脂肪肝 (SS) モデルとして FLS マウスについて詳細な報告を行ってきた (Hepatology Res, 2013)。FLS-*ob/ob* マウスは、肥満、糖尿病、高脂血症をもち、肝組織では高度の脂肪沈着とともに明らかな線維化を認め、48 週では肝硬変、肝癌に至る極めてヒト NASH に類似したモデルである。一方、FLS マウスは肝での軽度から中等度の脂肪沈着を認めるが、線維化は軽度でありヒト SS、あるいは mild NASH に相当するモデルである。また、これらのモデルを用いてどのような薬物が NASH に有用か、さらにその作用機序は何かを検討し報告してきた (Hepatology Res 2010, Int J Mol Med 2012, Hepatology Res 2013)。ヒトの NAFLD において SS から NASH に進展する因子としてインスリン抵抗性や酸化ストレスが関与していることは多くの研究から明らかとなっており、FLS-*ob/ob* マウスにおいても同様の機序が関与していることを報告した (Hepatology Res, 2013)。

近年、肥満、糖尿病、メタボリックシンドロームの基盤にあるインスリン抵抗性の発症に小胞体 (ER) ストレスの関与が示唆されており、肥満モデルや高脂肪食摂取マウスの肝臓に ER ストレスが誘導され、NAFLD の病態進展および NASH 発症に関与することが明らかとなってきた。しかし、正常肝から SS、SS から NASH へ進展する過程における ER ストレスの役割は未だ明らかではない。本研究では、まずこれまで申請者を中心に独自に解析してきた FLS-*ob/ob*、FLS マウスにおける ER ストレスマーカー (具体的に) の発現を経時的に検討し、SS と NASH 病態進展過程においてどのような ER ストレスの異同があるものか、ER ストレス応答がどのように病態に関わっているのかを明らかにする。また、これまで申請者らが NASH の進展に関わる miRNA を同定してきており、miRNA が制御するタンパクと ER ストレスとの関係が明らかとなればより病態を明らかにすることができる。実際、これまで FLS-*ob/ob* マウスを用いてアンジオテンシン II 受容体拮抗剤、レニン阻害剤、コレステロール吸収阻害剤、Dipeptidyl peptidase (DPP)-4 阻害剤の有効性を検証してきたが、これらの薬効性と ER ストレス応答に関連する miRNA を同定できれば NASH 病態解明の一助となり、miRNA が ER ストレスのバイオマーカーとして NASH の診断、治療に大きく貢献できる。

2. 研究の目的

FLS-*ob/ob* マウスは、鳥取大学独自で交配を続ける、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に最も類似したモデルである。このマウスを用いて正常肝～単純性脂肪肝 (SS)、NASH へ進展する過程における、小胞体 (ER) ストレスの役割を明らかとする。ER ストレスとその標的蛋白の同定を行い、ER ストレスの NASH 診断バイオマーカーへの有用性を明らかにするものである。

(具体的な目的)

- (1) SS モデルマウス (FLS マウス)、NASH モデルマウス肝内の ER ストレスを RT-PCR 法および Western blotting 法により確認し、各病態間での発現量を解析する。
- (2) ER ストレス関連タンパクと細胞外マトリックス代謝、酸化ストレス、脂質代謝との関係を明らかにする。
- (3) NASH に対する薬物療法による上記候補 ER ストレスの変動から薬物の作用機序を解明する。

3. 研究の方法

マウスモデルを用いて NASH 進展に關与する ER ストレスを RT-qPCR 法を用いて同定し、それらが制御している一連の蛋白を明らかにする。同定された ER ストレス関連タンパクと NASH 進展の細胞内作用機序を解明する。

(1) NASH 進展に關与している ER ストレス関連タンパク

本研究では SS モデルである FLS マウス、NASH モデルである FLS-*ob/ob* マウスの肝内の ER ストレスの発現を同定し、解析する。

・ NASH 関連 ER ストレスの同定

FLS、FLS-*ob/ob* マウス肝組織間の mRNA 発現プロファイルを RT-PCR 法で解析し、各病態間および発現量に強い変化を認める ER ストレス関連タンパクの mRNA を抽出する。

肝組織内の実際の発現状況を Western blotting 法で確認する。

(2) NASH 治療による ER ストレスの変動の解析

これまで FLS-*ob/ob* マウスを用いて NASH に対する有効な薬物としてアンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (irbesartan)、レニン阻害剤 (aliskiren)、コレステロール吸収阻害剤 Niemann-Pick C1-Like 1 タンパク阻害剤 (ezetimibe)、DPP-4 阻害剤 (Sitagliptin) を報告してきた。現在新規糖尿病治療薬であるナトリウム-グルコース共輸送体 2 阻害薬、イプラグリフロジン薬物治療群とコントロール群における ER ストレス発現の違いを調べ薬物の作用機序の相違を調べる。

FLS-*ob/ob* マウスに薬物を投与した薬物治療群とコントロール群から肝 RNA を抽出し RT-qPCR にて ER ストレスの発現を比較する。また ER ストレス関連タンパク、mRNA の変化を比較する。(1)によって選択された ER ストレスを Western blotting 法にて確認する。これによって薬物の作用機序が明らかとなる。

4. 研究成果

(1) SS モデルマウス (FLS マウス)、NASH モデルマウス (FLS-*ob/ob* マウス) での ER ストレスの発現

NAFLD モデルである FLS マウス (n=12) 及び NASH モデルである FLS-*ob/ob* マウス (n=28) に標準食餌を与えた。FLS マウスは、24 週齢で屠殺し対照群とした。FLS-*ob/ob* マウスは 24 週齢 (n=9)、36 週齢 (n=10)、48 週齢 (n=9) で屠殺し、採血及び肝組織、内臓脂肪を採取した。血中と肝組織中のコレステロール値及び中性脂肪値を測定した。また肝脂肪化面積及び肝線維化面積を測定した。肝組織を用いて肝線維化に関する遺伝子 (*Tgfb1*, *Col1a1*, *Timp-1*)、*Tnfa*、肝脂肪化に関する遺伝子 (*Ppara*, *Srebp1*)、ER ストレス関連遺伝子 (*C-jun*, *Atf3*, *Nupr1*, *Chop*) の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて測定した。アポトーシスは TUNEL 染色によって評価した。対照群のマウスは明らかな線維化を認めず脂肪肝のみを示した。一方、FLS-*ob/ob* マウスは 24 週齢、36 週齢では重度の脂肪肝炎を、36 週齢、48 週齢で明らかな肝線維化を認めた。*Tgfb1*, *Col1a1*, *Timp-1* の発現は、対照群に比較して 24 週齢、36 週齢、48 週齢で有意に増加しており、*Tgfb1*, *Timp-1* は週齢が進むにつれて増加した。*Atf3*, *Nupr1*, *C-jun* の発現は対照群に比較して 24 週齢、36 週齢、48 週齢で有意に増加していた。*Chop* の発現は FLS-*ob/ob* マウスで対照群と比較し差を認めなかった。TUNEL 染色では FLS-*ob/ob* マウスと対照群で差を認めなかった。

(2) NASH モデルマウス (FLS-*ob/ob* マウス) に対する糖尿病治療薬ナトリウム-グルコース共輸送体 2 阻害薬、イプラグリフロジンの効果

FLS-*ob/ob* 雄マウスを対照群とイプラグリフロジン投与群 (1 mg/kg 体重) に分け、12 週齢か

ら 24 週齢までの 12 週間イブラグリフロジンを胃ゾンデ法により経口投与した。24 週齢で屠殺し、採血及び肝組織を採取した。血清及び肝組織中のコレステロール値及び中性脂肪値を測定し、肝脂肪化面積と肝線維化面積を検討した。肝線維化に関連する遺伝子(*procollagen I*, *TGF-1*, *TIMP-1*)、肝脂肪化に関連する遺伝子(*PPAR-*、*SREBP1c*)、小胞体ストレスに関連する遺伝子(*ATF3*, *CHOP*, *C-JUN*, *NUPR-1*)、*TNF-* を RT-PCR 法にて定量した。また肝組織中の F4/80 及び 8-OHdG を免疫染色で検討した。肝組織中のコレステロール値は対照群で 69.0 ± 20.0 mg/dL に対し、イブラグリフロジン群で 51.4 ± 15.6 mg/dL ($P=0.003$)、肝中性脂肪値は対照群で 2479 ± 690 mg/dL に対し、イブラグリフロジン群で 2182 ± 819 mg/dL ($P=0.021$) と有意に低下した。肝組織中の脂肪化面積および線維化面積は、いずれも対照群と比較してイブラグリフロジン群で著明に減少した ($P<0.001$)。 *TNF-* 遺伝子発現は、対照群と比較してイブラグリフロジン群で増加し ($P=0.016$)、*PPAR-* 遺伝子発現は対照群と比較して、イブラグリフロジン群で有意に低下していた ($P=0.0004$)。小胞体ストレスに関連する遺伝子発現、肝組織中の F4/80 陽性細胞数、8-OHdG 陽性細胞率は、両群間に差を認めなかった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Ran Nagahara, Tomomitsu Matono, Masahiko Koda, Yukako Matsuki, Kenichi Miyoshi, Takakazu Nagahara, Takaaki Sugihara, Junichi Okano, and Hajime Isomoto. Genes expression profiles related to activating factor 3 (ATF3) / Nuclear protein 1 (NUPR1) axis in NASH model mice. *Yonago Acta Med.* 2019 Mar 28;62(1):36-46. eCollection 2019 Mar.

Masafumi Yamane, Tomomitsu Matono, Jun-ichi Okano, Ran Nagahara, Yukako Matsuki, Toshiaki Okamoto, Ken-ichi Miyoshi, Takaaki Sugihara, Takakazu Nagahara, Masahiko Koda and Hajime Isomoto. Protective Effects of Ipragliflozin, a Sodium-glucose Cotransporter 2 Inhibitor, on a Non-alcoholic Steatohepatitis Mouse Model. *Yonago Acta Med.* 2019 Mar 28;62(1):30-35. eCollection 2019 Mar.

[学会発表] (計 4 件)

Takaaki Sugihara, Tomomitsu Matono, Ran Nagahara, Hajime Isomoto. Gene Expression Analysis of the Activating Factor 3/Nuclear Protein 1 Axis in a Non-alcoholic Steatohepatitis Mouse Model. DDW 2019, San Diego

Tomomitsu Matono, Ran Nagahara, Yukako Matsuki, Masafumi Yamane, Toshiaki Okamoto, Ken-ichi Miyoshi, Takaaki Sugihara, Takakazu Sugihara, Kenji Oyama, Keiko Hoshio, Jun-ichi Okano, Masahiko Koda, Hajime Isomoto. The involvement of endoplasmic reticulum stress in the progression of hepatic fibrosis and carcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis mice. AASLD 2018, San Francisco

永原 蘭、的野智光、孝田雅彦、松木由佳子、山根昌史、岡本敏明、三好謙一、杉原誉明、大山賢治、法正恵子、岡野淳一、磯本 一 NAFLD モデルマウス (FLS、FLS-ob/ob) の肝線維化進展と ER ストレスの関連 第 54 回日本肝臓学会総会 大阪国際会議場 大阪市 2018 年

永原 蘭、的野智光、孝田雅彦、松木由佳子、三好謙一、永原天和、杉原誉明、大山賢治、法正恵子、岡野淳一、磯本 一 NASH モデルマウスにおける ER ストレスの関与 第 5 回肝臓と糖尿病代謝研究会 米子市 2018 年