

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08776

研究課題名(和文) 肝臓および非アルコール性肝炎に対する生体内抗酸化因子による治療法の開発

研究課題名(英文) Prevention of NASH and NASH-related hepatocellular carcinoma by intrinsic anti-oxidative factor

研究代表者

吉田 隆文 (YOSHIDA, TAKAFUMI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30368899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスNASHに対してPEDFはNADPH oxidaseを介し酸化ストレス抑制し炎症を抑えるだけでなく、肝臓内の脂質蓄積を減少させた。ヒト肝臓組織においてPEDFの発現低下やPEDF受容体の発現亢進は肝臓の悪性度と関連することがわかった。PEDF受容体トランスジェニックマウスではNASHによる肝臓が増悪していた。また、終末糖化産物(AGEs)による酸化ストレスがNASHによる肝臓発癌を促進し、AGEsを標的としたNASHの治療法の可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性肝炎(NASH:Non-alcoholic steatohepatitis)における生体内抗酸化因子の治療的役割を明らかにした。近年、増加の一途を辿りつつも有効な治療法のない非アルコール性肝炎に対して、本研究は新たな治療法の開発に貢献するものとする。

研究成果の概要(英文)：PEDF could slow the development and progression of steatohepatitis through the suppression of steatosis and oxidative stress in mice NASH model. In human tissues, the decreased expression of PEDF and the elevated expression of PEDF receptor was associated with aggressive properties of cancer. Moreover, NASH-related hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma were exacerbated in PEDF receptor transgenic mice. We furthermore demonstrated that AGEs-RAGE signaling promotes not only the progression of hepatic fibrosis and the development liver cancer in NASH through activation of inflammasome and pyroptosis. Our study suggests that PEDF supplementation and the blockade of AGEs-RAGE system may be a novel therapeutic strategy for the treatment of NASH.

研究分野：内科学 消化器内科

キーワード：NASH 肝臓 PEDF AGEs インフラマソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス剤の発展によりウイルス性肝炎が減少する一方、非アルコール性肝炎(NASH:Non-alcoholic steatohepatitis)は増加傾向にあり、肝硬変、肝癌の主な原因となりつつある。しかしながら NASH に対する有効な治療法は確立されておらず解決すべき喫緊の課題である。NASH の発症には終末糖化産物(Advanced Glycation End products: AGEs)の蓄積などによる酸化ストレスが関与することが考えられていた。また、我々は、色素上皮由来因子 (PEDF:Pigment epithelial-derived factor) の生体内抗酸化因子としての役割を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では NASH と肝癌に対する生体内抗酸化因子 PEDF による治療効果の検証を目的とした。また、NASH と NASH 由来の肝癌における AGEs による酸化ストレスの役割とこれを標的とした治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス NASH モデルにおいて肝内の酸化ストレス、NADPH oxidase の発現を検討した。次にアデノウイルスベクターを用いて PEDF を投与することにより、マウス NASH 肝における酸化ストレス、NADPH oxidase の発現を確認し、組織学的な変化を検証する。

(2)(a) ヒト肝癌組織と非癌部における PEDF および PEDF 受容体(Laminin receptor、ATGL)、NADPH oxidase の発現を免疫染色にて評価し、肝癌の悪性度(分化度、血管新生、転移、浸潤の有無)や背景因子(ウイルス肝炎や NASH)、予後などの臨床データとの関連を検討する。(b) マウス NASH - 肝発癌モデルを用いて、NASH からの肝発癌過程における PEDF や PEDF 受容体、NADPH oxidase の発現、酸化ストレスの変化を明らかにしていく。さらに PEDF 受容体トランスジェニックマウスにおける NASH と NASH 由来肝癌を検討し、PEDF シグナルの及ぼす影響を検討する。

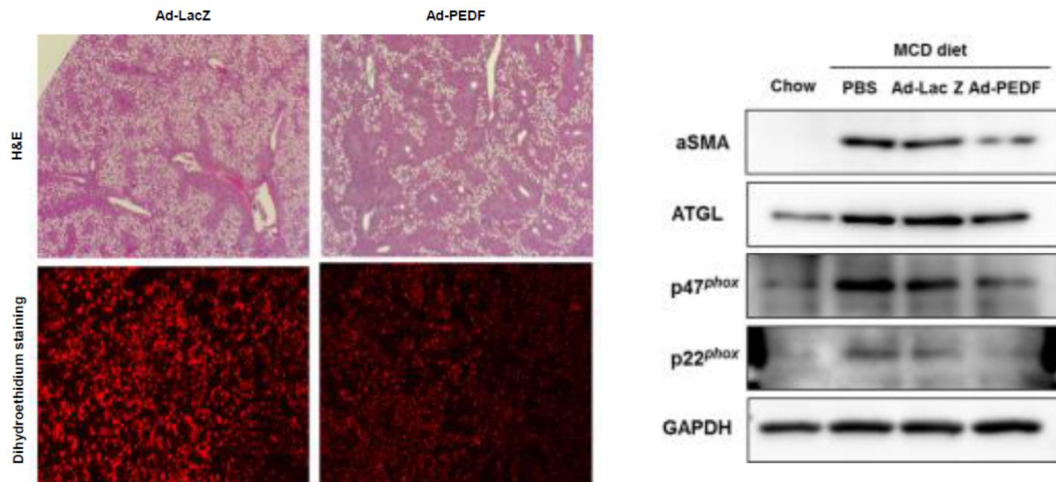
(3) マウス NASH-肝発癌モデルにおける AGEs の蓄積と AGEs 受容体、NADPH oxidase の発現を確認と AGEs 受容体に対する aptamer 投与による影響を解析する。また、aptamer 投与による肝線維化や肝発癌への効果を組織学的に解析し、そのメカニズムを生化学的に解析する。

4. 研究成果

(1) NASH に対する PEDF (Pigment epithelial-derived factor) の治療効果

メチオニンコリン欠乏食によるマウス NASH モデルを用いて、NASH に対する PEDF の治療効果を検討した。マウス NASH モデル肝臓ではコントロール群に比べて酸化ストレスの亢進と同時に PEDF の発現が増加していた。この NASH モデルマウスにアデノウイルスベクターを用いて PEDF を投与すると、肝臓内での酸化ストレスおよび NADPH oxidase コンポーネントである P47、P22 遺伝子発現の抑制が確認された(下図左下、右)。組織学的に解析を行ったところ、PEDF 投与群では炎症細胞浸潤、肝線維化が有意に抑制されていた。興味深いことに、肝内の脂肪蓄積量もまた PEDF 投与によって抑制されていた(下図左上)。PEDF の受容体の一つとして ATGL (adipose triglyceride lipase) が同定されており、この ATGL は lipase 活性を有し細胞内脂質量の調節に働くことが解っている。ATGL の発現量は NASH モデルにおいて増加していたが、PEDF 投与による有意な変化は認められなかった。

これらの結果から、PEDF は NADPH oxidase の活性化を抑制し、酸化ストレスを抑制し肝炎、肝線維化を防ぐだけでなく、ATGL の活性化作用により肝内脂肪蓄積を抑制することが示唆された。(Yoshida T., et al. Dig Dis Sci. 2017 Jun;62(6):1527-1536)。



(2) NASH、肝癌における PEDF-Laminin receptor シグナルの役割に関する検討

a) ヒト肝癌と背景肝組織における PEDF、Laminin receptor (Laminin R) の組織学的検討

151 例の肝切除例を対象に PEDF と PEDF の受容体の一つである Laminin receptor (Laminin R) の発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的な因子 (性別、腫瘍径、分化度、肝内転移、肉眼系、門脈侵襲、etiology、予後) との相関を検討した。PEDF と Laminin R の発現を発現強度に応じて Score 0~3 とし、Score 0-2 を発現弱群、Score 3 を発現強群で分類し評価した。

癌部での PEDF の発現は 135 例 (89%) に認められた。癌部での PEDF の発現強度と肝癌の分化度との関連は認められなかったが、癌部での PEDF 発現低下は、癌の門脈侵襲のと統計学的に有意に相関していた (PEDF の発現が高いと門脈侵襲が少ない)。また、統計学的に有意ではないものの癌部での PEDF 発現亢進は、low histological grade ($p=0.0508$)、肝内転移の認められない群 ($p=0.0761$) と関連していた。

癌部での Laminin R の発現は全症例で認め、Laminin R と PEDF の発現の間に統計学的に有意な逆相関が見られた ($p=0.0016$)。癌部での Laminin R 発現が亢進した症例は、統計学的に有意に high histological grade と相関していた (低分化症例が多い)。興味深いことに非癌部の Laminin R の発現亢進は血清アルブミン値低値と関連し、非癌部での Laminin R の発現亢進が認められた群では有意に予後不良であった。

b) Laminin R トランスジェニックマウスを用いた、NASH、肝癌における PEDF-Laminin receptor シグナルの役割に関する検討。

Laminin R 発現が NASH と NASH 由来肝癌にどのように影響するか Laminin R トランスジェニックマウスを用いて NASH モデル (Steilic Animal Model) を作成した。Laminin R トランスジェニックマウスでは、コントロール群と比べて NASH による肝線維化が亢進することが確認された。また、Laminin R トランスジェニックマウスでは NASH 関連の肝発癌の頻度が増加することが解った。現在そのメカニズムの解析を行いつつ論文化を行っている。

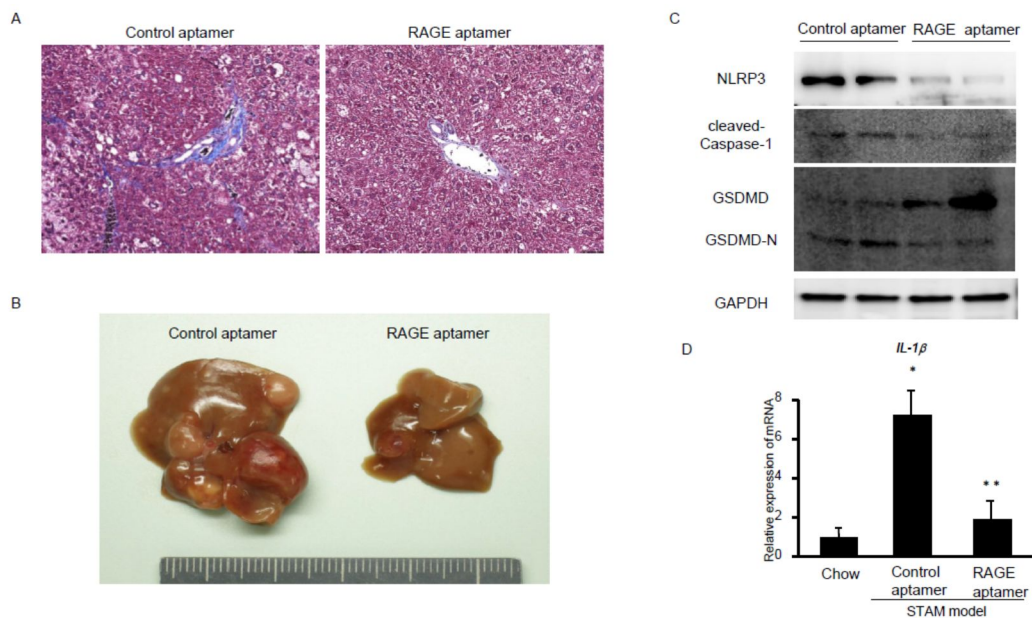


(3) NASH と NASH 由来肝癌に対する RAGE aptamer の治療効果

終末糖化産物(Advanced Glycation End products: AGEs)は、細胞膜に存在する受容体 Receptor for AGEs (RAGE)を介して酸化ストレスを惹起し、炎症や組織線維化を促進する。NASH 患者では AGEs の蓄積が示されており、AGEs による酸化ストレスが NASH の発症に関与している可能性が考えられる。したがって、マウス NASH モデルにおける AGEs の動態と、RAGE aptamer による治療効果の検討を行った。マウス NASH モデル(Stelic Animal Model)肝臓では、コントロール群に比して AGEs の蓄積と、RAGE の発現亢進が認められた。また、肝内含有 ROS および NADPH oxidase コンポーネント蛋白の発現が Control aptamer 投与群に比して RAGE aptamer 投与群で優位に減少していた。次に、RAGE aptamer の腹腔内投与を行った際の治療効果を組織学的に解析したところ、RAGE aptamer 投与群では、Control aptamer 投与群に比べて有意に炎症細胞浸潤と肝線維化が抑制されていた。さらに、NASH モデルにおける肝発癌も RAGE aptamer 投与によって抑制できることが解った(Fig. A, B)。

これまで NASH における肝細胞死の機序は明らかとなっていない、そこでマウス NASH モデル肝臓での細胞死のメカニズムの検討を行った。マウス NASH モデル肝臓においてインフラマソーム複合体の必須コンポーネントである NLRP3 蛋白の発現が亢進しており、この NLRP3 蛋白の発現亢進は RAGE aptamer 投与によって抑制されていた(Fig. C)。また、インフラマソーム活性化によって起きる Caspase-1 の活性化(cleaved-Caspase-1)および IL-1 の産生も RAGE aptamer により抑制されていた(Fig. D)。さらに、活性化 Caspase-1(cleaved-Caspase-1)によって起きる Pyroptosis のイニシエーターである GSDMD の活性化(GSDMD-N)が、RAGE aptamer によって抑制された。

以上の結果から、NASH において AGEs-RAGE シグナルはインフラマソームの活性化と、Pyroptosis による肝細胞障害を促進していることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Takafumi, Akiba Jun, Matsui Takanori, Nakamura Kazuo, Hisamoto Takao, Abe Mitsuhiro, Ikezono Yu, Wada Fumitaka, Iwamoto Hideki, Nakamura Toru, Koga Hironori, Yamagishi Sho-ichi, Torimura Takuji	4. 巻 62
2. 論文標題 Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Prevents Hepatic Fat Storage, Inflammation, and Fibrosis in Dietary Steatohepatitis of Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1527 ~ 1536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-017-4550-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Mitsuhiro, Yoshida Takafumi, Akiba Jun, Ikezono Yu, Wada Fumitaka, Masuda Atsutaka, Sakaue Takahiko, Tanaka Toshimitsu, Iwamoto Hideki, Nakamura Toru, Sata Michio, Koga Hironori, Yoshimura Akihiko, Torimura Takuji	4. 巻 23
2. 論文標題 STAT3 deficiency prevents hepatocarcinogenesis and promotes biliary proliferation in thioacetamide-induced liver injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 6833 ~ 6844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v23.i37.6833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikezono Yu, Koga Hironori, Akiba Jun, Abe Mitsuhiro, Yoshida Takafumi, Wada Fumitaka, Nakamura Toru, Iwamoto Hideki, Masuda Atsutaka, Sakaue Takahiko, Yano Hirohisa, Tsuruta Osamu, Torimura Takuji	4. 巻 15
2. 論文標題 Pancreatic Neuroendocrine Tumors and EMT Behavior Are Driven by the CSC Marker DCLK1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 744 ~ 752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-16-0285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takafumi Yoshida
2. 発表標題 PEDF prevents hepatic fat storage, inflammation and fibrosis
3. 学会等名 JDDW2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米大学先端癌治療研究センター肝癌部門研究活動 http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秋葉 純 (Akiba Jun) (00341305)	久留米大学・大学病院・教授 (37104)	