

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10680

研究課題名(和文) Nogo-Bの非アルコール性脂肪肝炎進展における役割とメカニズムの解析

研究課題名(英文) The role of Nogo-B in Non-alcoholic Steatohepatitis

研究代表者

田代 圭太郎 (Tashiro, Keitaro)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20645527

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)：Nogo-Bは別名Reticulon4Bとして知られており、小胞体に存在する膜貫通型のタンパクである。肝臓においてNogo-Bは肝細胞ではなくクッパー細胞(マクロファージ)に強発現しており、脂肪肝炎への進展に関わっていることがこれまでの実験結果で示されている。本研究ではマクロファージ選択的Nogo-Bノックアウトマウスを使用して脂肪肝炎の進展が抑制される傾向にあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は肝硬変から肝癌に進行する原因不明の疾患であり、その治療法は確立されていない。肝臓でのクッパー細胞(マクロファージ)は肝星細胞(線維芽細胞)を刺激し肝硬変に関与することから、本研究ではマクロファージ内のNogo-B(Reticulon4B)に着目し、Nogo-B選択的ノックアウトマウスを使用して脂肪肝炎の進展に関与することを示した。Nogo-Bは肝マクロファージにおいて脂肪肝炎の進展に関与する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nogo-B is a member of the Nogo/Reticulon-4 family, and express especially in Kupffer cells of the Liver. It has been reported that Nogo-B in Kupffer cells of the Liver regulates the development of Steatohepatitis. In Kupffer cells specific Nogo-B knock out mouse, the progression of steatohepatitis was suppressed and the level of ALT in blood was improved. Nogo-B suppression in Kupffer cells also decreased the Liver fibrosis and the serum blood level of hydroxyproline and triglyceride. These results indicate that Nogo-B in Kupffer cells may have some role of fibrogenesis in NASH.

研究分野：肝線維化、アポトーシス、NASH

キーワード：Nogo-B Reticulon 4B NASH 非アルコール性脂肪肝炎 CDAHFD

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis ; NASH)は飲酒歴が少ないにも関わらず肝細胞に著明な中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が起こり、アルコール性肝障害に特徴とされる病理所見が認められることを特徴とする疾患である。従来、過剰飲酒を伴わない脂肪肝は可逆性変化として未治療でも良いとされていたが、NASH の一部が肝硬変に進行し、さらには肝癌まで進行することが明らかになった。これらの疾患は肥満や糖尿病、脂質異常症などを背景に持つことが多く、Metabolic Syndrome による合併症の一つとして注目されている。

Nogo-B(Reticulon 4B)は細胞内の小胞体に発現し、粗面小胞体構造の恒常性の維持やタンパクの膜輸送に関連する膜貫通タンパクである。現在まで動脈硬化、血管新生、動脈瘤、気管支喘息、肺高血圧、腎虚血再灌流障害等の疾患において Nogo-B の関与を示す論文がみられるが、その機序や他臓器における役割については未だ明らかになっていない。

我々は以前より肝臓における Nogo-B の役割に注目し、既に肝硬変マウスモデルにおいて Nogo-B ノックアウトマウスでは肝硬変の進展が抑制され肝再生に関与していることを明らかにしたが、NASH と Nogo-B に関する報告は殆ど無い。

Nogo-B ノックアウトマウスを用いた NASH モデルを解析することにより、NASH における Nogo-B の役割を解析することは、NASH 進展のメカニズムにおいて非常に重要である。

## 2. 研究の目的

- (1) Nogo-B ノックアウトマウスに高脂肪食を負荷することで NAFLD モデルを作成し、NAFLD における Nogo-B の役割を検討する。
- (2) 肝臓において Nogo-B は肝細胞ではなくクッパー細胞に強発現しており、脂肪肝炎への進展に関わっていることがこれまでの実験結果で示されている。クッパー細胞選択的 Nogo-B ノックアウトマウスを使用して比較検討することにより、Nogo-B の役割と機序を解析する。

## 3. 研究の方法

- (1) C57BL/6 マウスを使用して Nogo-B ノックアウトマウスを作成し、野生型(WT)と Nogo-B ノックアウトマウス(KO-NGB)に高脂肪食を付加して NAFLD モデルを作成する。WT マウスと KO-NGB マウスにおける NAFLD の程度を比較検討する。

- ( 2 ) クッパー細胞(マクロファージ)選択的 Nogo-B ノックアウトマウスを作成し、メチオニン減量・コリン欠乏高脂肪食(CDAHFD)を負荷することで NASH モデルを作成する。WT マウスと KO-NGB マウスを比較し、NASH の進展についてクッパー細胞における Nogo-B の役割を解析する。

#### 4 . 研究成果

- ( 1 ) NAFLD モデルにおいて WT マウスと比較して KO-NGB マウスでは脂肪肝炎が顕著に軽減されることが示された。
- ( 2 ) Nogo-B は腸管上皮細胞にも発現しており、脂肪吸収に関わっている可能性を考え NAFLD モデルにおけるマウスの便を用いて gas chromatography で腸管の脂肪吸収を WT マウスと KO-NGB マウスで検討したが、有意差は認められなかった。
- ( 3 ) Nogo-B はクッパー細胞に強発現していることから、免疫応答・炎症への関与を考えた。マクロファージにおける LPS(リポポリサッカライド)に対する反応を比較したところ、KO-NGB マウスで有意に NF- $\kappa$ B のリン酸化が抑制され、同時に炎症性サイトカインの産生も抑制されていた。TLR4 シグナルの制御が脂肪肝炎進展への機序の一つと考えられた。Nogo-B は細胞膜にも一部発現していることから TLR4 の internalization の関与を考え、FACS を用いて LPS 刺激後の TLR4 の発現を比較したが、有意差は認められなかった。
- ( 4 ) Nogo-B は小胞体構造の維持に必要なタンパクであることが知られていることから、マクロファージにおける小胞体構造の違いを WT マウスと KO-NGB マウスで比較検討した。KO-NGB では小胞体における ER sheet の割合が有意に増加しており、同時に小胞体ストレス応答(UPR)が増大していた。UPR がマクロファージの極性変化に関わることが知られており、マクロファージにおける UPR と脂肪肝炎進展への関与が示唆された。
- ( 5 ) マクロファージ特異的 Nogo-B ノックアウトマウスに対して、メチオニン減量・コリン欠乏高脂肪食(CDAHFD)を与え NASH モデルを作成し比較したところ、KO-NGB マウスの肝炎が免疫染色で有意に抑制され、ALT も有意に低下を認めた。脂肪肝炎の程度や炎症マーカーに有意差は認めなかったが、KO-NGB マウスで TG、ヒドロキシプロリンおよび線維化の程度の改善を認め、マクロファージにおける Nogo-B が NASH における肝線維化の進展に関与していることが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Kawaguchi Nao, Tashiro Keitaro, Taniguchi Kohei, Kawai Masaru, Tanaka Keitaro, Okuda Junji, Hayashi Michihiro, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 1864
2. 論文標題 Nogo-B (Reticulon-4B) functions as a negative regulator of the apoptotic pathway through the interaction with c-FLIP in colorectal cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 2600 ~ 2609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2018.04.018	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 Miyaoaka Yuta, Jin Denan, Tashiro Keitaro, Masubuchi Shinsuke, Ozeki Maiko, Hirokawa Fumitoshi, Hayashi Michihiro, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 67
2. 論文標題 A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 239 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.17-0126	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 Kagota Shuji, Taniguchi Kohei, Lee Sang-Woong, Ito Yuko, Kuranaga Yuki, Hashiguchi Yasuyuki, Inomata Yosuke, Imai Yoshio, Tanaka Ryo, Tashiro Keitaro, Kawai Masaru, Akao Yukihiko, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 20
2. 論文標題 Analysis of Extracellular Vesicles in Gastric Juice from Gastric Cancer Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 953 ~ 953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20040953	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口 直、田代 圭太郎、谷口 高平、内山 和久
2. 発表標題 Nogo-B/RTN4-Bの大腸がんにおけるアポトーシスを中心とした機能解析
3. 学会等名 第26回日本cell death学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川口 直、田代 圭太郎、谷口 高平、内山 和久
2. 発表標題 大腸癌における新規癌遺伝子Nogo-B/RTN4-Bのアポトーシスを中心とした機能解析
3. 学会等名 日本消化器外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 革島悟史、谷口高平、田代圭太郎、内山和久
2. 発表標題 -H2AFXは直腸癌細胞における放射線感受性の潜在的指標となりうる
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	谷口 高平  (TANIGUCHI KOHEI)  (70779686)	大阪医科大学・医学部・助教   (34401)	
研究分担者	内山 和久  (UCHIYAMA KAZUHISA)  (80232867)	大阪医科大学・医学部・教授   (34401)	