

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10130

研究課題名(和文) アセチル化制御によるアルコール肝障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Role of acetylation in alcoholic liver disease

研究代表者

西谷 陽子(Nishitani, Yoko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：30359997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは今まで初代培養肝細胞を用いたアルコールによる細胞内情報伝達系の変化を検討してきた。その中でアルコール脱水素酵素ADHで消費する補酵素NADに依存性の脱アセチル化を行うsirtuinは脂質代謝制御の異常や概日リズムへの影響も指摘されているがアルコールの影響は不明である。より生体に近い培養条件のためにコラーゲンサンドイッチ法による培養方法の検討を行った。細胞自体は、従来法に比較すると細胞の状況は良く1週間程度の長期の培養にも耐えうると判断した。しかし短時間の経時的なサンプル採取が困難であり概日リズム測定は困難となると判断した。通常の方法での概日リズムを同調を試み検討を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではコラーゲンサンドイッチ法による初代培養肝細胞の可能性を提示した。しかしながら、実際にmRNAを抽出したりタンパク質を抽出しての短期での変化を検討するには困難な手法であると判断した。培養細胞の概日リズム同期については検討中であるが、末梢臓器でしかも細胞単位での概日リズムは生体内では重要であるが注目はされずらく、今後検討を重ねる。

研究成果の概要(英文)：Ethanol affects the various intracellular signaling. Since ethanol metabolism via ADH (alcohol dehydrogenases) decreases NAD in hepatocyte, depletion of NAD may lead to insufficiency of sirtuins that work as NAD-related deacetylation. We tried to establish the collagen-sandwich methods of primary rat hepatocyte culture, that is expected reflected more biological condition. However, collagen-sandwich methods was not suitable to treat the short-time changing. We decided to try the synchronization of cultured hepatocyte via normal rat hepatocyte culture. The synchronization was performed using 50% serum exposure, or high-dose insulin or dexamethazone exposure and the samples were collect. We continue to analyze the mRNA expression.

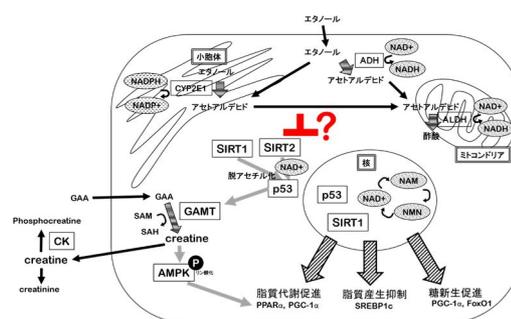
研究分野：法医学

キーワード：アルコール 初代培養肝細胞 細胞同調

1. 研究開始当初の背景

(1) 法医実務においてアルコールによる臓器障害をしばしば認める。アルコールによる肝障害のメカニズムについては、アルコール代謝による酸化ストレスや小胞体ストレス反応、腸管の透過性亢進によるエンドトキシンの影響などが指摘されているが未解明の部分も多い。長寿に関わる遺伝子として発見されたサーチュイン (SIRT) は補酵素 NAD 依存性の脱アセチル化に関与し、脂質代謝促進、脂質産生抑制、糖新生促進に関わる。アルコール代謝で特にアルコール脱水素酵素(ADH)とアルデヒド脱水素酵素(ALDH)は NAD を消費することから SIRT の活性を抑制する可能性が指摘されている(図1)。概日リズムは中枢と末梢に分かれて制御されているが、最近の研究で肝臓において SIRT1 を中心としたアセチル化タンパクが概日リズムに関与すると報告された (Sato et al, Cell, 2017)。SIRT1 と体内時計である PERIOD2 は互いに制御しているという報告もある。SIRT によるアセチル化制御機構は末梢概日リズムに強く影響されると考えられるが、アルコールやそれに伴う肝障害との関係は不明である。

私たちは、過去にアルコール等の濫用薬物がどのように恒常性の均衡を崩壊させるのかを明らかにするために、プロテインカイネースである JNK や Akt の活性化機構や小胞体シャペロン蛋白 GRP78 の mRNA 発現量の低下といった急性アルコールでの細胞内情報伝達系の変化について検討を行ってきた(Nishitani and Matsumoto, 2006)。また脂肪酸負荷実験を行い、肝臓における脂質の蓄積でその代謝への影響がある可能性を示した (Nishitani et al., 2007; Nishitani et al., 2008)。(2) 予備実験では、ラット初代培養肝細胞でアルコールによる培地中のクレアチニン濃度の減少、アセトン(ケトン体)濃度の減少と ADH 阻害剤によるその抑制を認めた(図2)。肝臓におけるクレアチン産生に関わるタンパク酵素 GAMT の上流域にある制御因子に SIRT1 が含まれていることから、SIRT1 とアルコール代謝の関係を NAD の関与を含めて明らかにする事は、アルコールによる肝障害を明らかにする上で重要であると考えた。



【図1】肝細胞内でのエタノール代謝と補酵素 NAD、SIRT1 の関係についての模式図。

2. 研究の目的

アルコールによる補酵素 NAD を介し SIRT による脱アセチル化を抑制することで生体のアセチル化制御が崩れ、その結果、脂質代謝に影響を及ぼすという仮説のもとに本研究を行う。その一連の流れの中に末梢臓器の概日リズムが影響を及ぼしているのではないかと推定する。本研究ではアルコールによるアセチル化制御を介した肝障害メカニズムを明らかにするため、肝細胞において SIRT1 と体内時計の関係に着目し、その分子機構を解析することを目的とする。

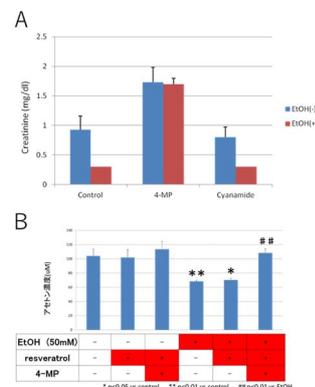
3. 研究の方法

(1) ラット初代培養肝細胞による負荷実験

既報 (Seglen, 1975; Matsumoto, 2002) に従ってラット初代肝細胞培養を行う。熊本大学動物実験倫理指針に従って、Wistar 系雄ラット (体重 250-300 g) の肝臓から、肝灌流システムを用いてコラゲナーゼ灌流を行い、肝細胞を分離精製する。コラゲンコートしたディッシュで培養をおこなった。培養細胞に 100mM エタノールを付加するとともに、アルコール脱水素酵素(ADH)阻害剤である 4-methylpyrazole (4-MP)1mM、sirtuin1 activator である resveratrol (40 μM) を負荷した。24 時間経過後に採取を行った。

(2) Sirtuin に関連する mRNA 発現評価

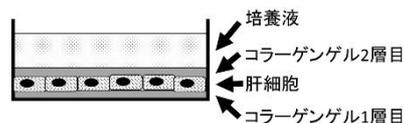
培養細胞より mRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR にてグループ毎の発現量の差異を検討した。利用した機器は TAKARA Thermal cycler ® Realtime System である。プライマーセットは house keeping として GAPDH、 β -actin を検討、ターゲットとして p53, CD38, GAMT, NAMPT, PPAR- α , Sirt2-7 を検討した。しかしながら、初代培養肝細胞の PCR 増幅が安定的に検出されかつ定量的に行うことができたものは GAPDH、 β -actin, p53, GAMT, NAMPT, PPAR- α であり、まずはこれらの発現量について検討を行った。Sirtuin1-7 については安定して検出できるプライマーを検討中である。



【図2】予備実験。(A)培地中クレアチニン濃度、(b)培地中アセトン(ケトン体)濃度。

(3) コラーゲンサンドイッチ法によるラット初代培養肝細胞 (図 3)

初代培養肝細胞をコラーゲンサンドイッチ法にて培養することで細胞間の接着をより生体に近い形とすることを目的とした。細胞培養用コラーゲン溶液を培養皿に分注し 37 °C 1 時間加温することでゲル化し、上記の肝細胞分散液をゲル上に播く。37 °C CO₂ インキュベーターで 4~24 時間培養をしたのちに培地を取り除き、2 層目の細胞培養用コラーゲン溶液を重層し 37 °C 1 時間加温することでゲル化する。その上に新しい培地を入れて培養を行う。培地は毎日交換をする。



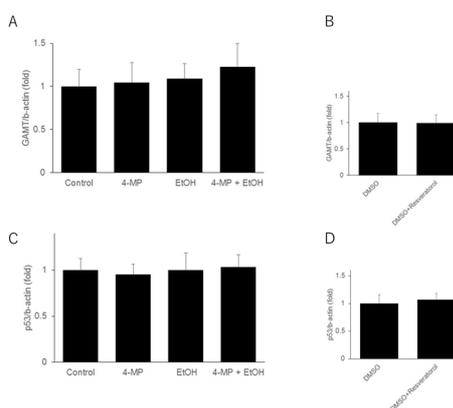
[図 3] コラーゲンサンドイッチ法模式図

(4) 初代培養肝細胞の概日リズム同期実験

研究成果にも記載するが当初は上記コラーゲンサンドイッチ法にて同期を行う予定であったが、サンプル採取法や取り扱いにおいて短時間で変更する細胞内の情報を保持したまま mRNA やタンパクの抽出を行うことが困難であったため、通常のコラーゲンコート法にて行うこととした。50%ウマ血清含有培地、デキサメタゾン高濃度負荷(100 nM)、インスリン高濃度負荷(0.2mM)を添加し 2 時間暴露に経時的に細胞採取を行う。細胞採取まで実施し、今後解析を進める予定である。

4 . 研究成果

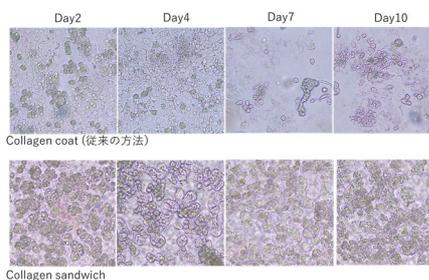
(1) 初代培養肝細胞におけるエタノール、4-MP(ADH 阻害剤)、resveratrol(Sirtuin1 activator)を付加し細胞を採取後に細胞を採取し mRNA 発現を検討した。Sirtuin 下流域にある p53, GAMT, NAMPT, PPAR- α について検討をおこなったが、NAMPT, PPAR- α については発現量が少なく検出されないサンプルが多く定量は困難であった。定量的リアルタイム PCR 検査にて、p53 および GAMT ではエタノール群、4-MP 負荷群、resveratrol 負荷群で明らかな発現の差は認められなかった (図 3)



[図 4] mRNA 発現量。(A)GAMT 発現量、100 mM エタノール負荷および 1mM 4-MP(ADH 阻害剤) 負荷。(B) GAMT 発現量、40 μ M resveratrol 負荷。(C,D)p53 発現量。いずれも 24 時間負荷。

(2) コラーゲンサンドイッチ法によるラット初代培養肝細胞培養では従来のコラーゲンコート法に比べると細胞間の接着が多く観察され、さらに今までは 3 日を超えると急激に細胞死が見られていたのに対し、10 日程度経過しても残存する細胞が多く見られ、長期培養に適した培養方法であると判断した(図 4)。しかしながら、実際にコラーゲンサンドイッチ法では培養ゲルの厚みがかなりあり、その後の細胞採取やリアルタイムの細胞の評価が困難であることが判明した。特にゲル中のエタノール濃度の維持が困難であることから本手法を用いての概日リズム同期を断念した。

(3) 培養細胞の概日リズム同期については、当初は上記コラーゲンサンドイッチ法にて同期を行う予定であったが、通常のコラーゲンコート法にて行うこととした。50%ウマ血清含有培地、デキサメタゾン高濃度負荷(100 nM)、インスリン高濃度負荷(0.2mM)を添加し 2 時間暴露に経時的に細胞採取した。まずは短時間で 4 時間、8 時間、12 時間で細胞採取を行った。12 時間までで明らかな細胞死にいたる群は認めなかった。細胞採取まで実施し、今後解析を進める予定である。



[図 5] 従来のコラーゲンコート法 (上段) とコラーゲンサンドイッチ法 (下段) で培養したラット初代培養肝細胞。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Furukawa S, Sasao A, Yonemitsu K, Ohtsu Y, Tsutsumi H, Taguchi K, Otagiri M, Nishitani Y.	4. 巻 31
2. 論文標題 Effects of arterial hemorrhage speed on the blood coagulation/fibrinolysis system and hemodynamics in rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Coagul Fibrinolysis.	6. 最初と最後の頁 198-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MBC.0000000000000899	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 Tsutsumi Hiroshi, Yonemitsu Kosei, Sasao Ako, Ohtsu Yuki, Furukawa Shota, Nishitani Yoko	4. 巻 30
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid neurotransmitter levels and central nervous system depression in a rat drug overdose model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology Mechanisms and Methods	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15376516.2019.1672122	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 西谷陽子, 木村聡子, 高木友理子, 大津由紀, 堤博志, 古川翔太, 笹尾亜子.	4. 巻 62
2. 論文標題 法医学解剖事例における死後血清プロカルシトニンの検討: 中毒事例および窒息事例で血清プロカルシトニンは上昇する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 法医学の実際と研究	6. 最初と最後の頁 151 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Sasao A, Takaki M, Jeong HJ, Yonemitsu K, Ohtsu Y, Tsutsumi H, Furukawa S, Morioka H, Ueda H, Nishitani Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of a fluvoxamine detection system using a Quenchbody, a novel fluorescent biosensor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Test Anal	6. 最初と最後の頁 601-609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dta.2520	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 0件）

1. 発表者名 西谷陽子
2. 発表標題 アルコール・薬物の検出の実態と検出方法：オーバービュー
3. 学会等名 2019年度日本アルコール・アディクション医学会
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
研究協力者	米満 孝聖 (Yonemitsu Kosei)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医） (17401)	
研究協力者	笹尾 亜子 (Sasao Aka)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	
研究協力者	大津 由紀 (Ohtsu Yuki)	熊本大学・技術部・技術専門職員 (17401)	
研究協力者	堤 博志 (Tsutsumi Hiroshi)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	
研究協力者	古川 翔太 (Furukawa Shota)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------