

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590786

研究課題名（和文）プロテオミクスを用いた非アルコール性脂肪肝炎の診断マーカーの探索と検証

研究課題名（英文）Search and validation of diagnostic marker for nonalcoholic steatohepatitis using proteomics.

研究代表者

宇都 浩文 (UTO HIROFUMI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20347058

研究成果の概要(和文)：プロテオミクスにより肝細胞の酸化ストレスマーカーの探索を行い、同定した MnSOD の血清濃度は非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の診断や NASH の肝病態進展の評価に有用であることを明らかにした。また、動物モデルでの検討で、高フルクトース食の方が高脂肪食より脂肪肝の程度は軽度であるものの、肝切除後の肝再生率は低く、肝前癌病変は多数出現した。すなわち、肝再生や肝発癌は肝脂肪化の程度よりは脂肪肝の原因が重要と考えられ、合併する生活習慣病の違いにより NASH の病態やその進展は異なる可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：First of all, we explored the oxidative stress marker(s) using proteomics and identified that MnSOD may be a useful serum biomarker for distinguishing between simple steatosis (SS) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Second, in a rat experimental model, hepatic steatosis (HS) developed in the high fructose diet (H-fruc) group, but was less severe compared to the high fat diet (H-fat) group. In contrast, liver regeneration after 70% partial hepatectomy (PHx) was impaired in the H-fruc group compared to the H-fat and control groups. In addition, the H-fruc group developed a significantly higher incidence of GST-P-positive precancerous lesions compared to the H-fat group. These results indicate that impairment of liver regeneration after PHx and the incidence of precancerous lesions in HS are related to the cause, rather than the degree, of steatosis. Thus, our study demonstrates that serum MnSOD is potential novel marker for NAFLD, and that the pathophysiological condition and progression of NAFLD are potentially affected by different diets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：NASH、NAFLD、酸化ストレス、MnSOD、フルクトース、肝再生、肝発癌

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic Steatohepatitis:NASH) と単純性脂肪肝は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease:NAFLD) に含まれ、アルコール多飲がなく、主として肥満や糖尿病などの生活習慣病と関連する。NASH は NAFLD の約 10% を占め、一部は肝硬変や肝細胞癌へ進展する予後不良な疾患であり、単純性脂肪肝も NASH に進展する可能性がある。病的肥満が問題となっている米国などでは、人口の約 3% が NASH に罹患しているとも推測されており、本邦でも肥満人口の増加に伴い NASH 患者が増加することが危惧されている。しかし、臨床の場で有用かつ簡便に測定できる NAFLD や NASH の診断マーカーは無く、また、病態進展の分子機構は未だ解明されていないため、有効な治療法も確立されていない。

病態解明や診断・治療法の確立には、原因遺伝子から翻訳される蛋白質と、それに関連して変動する蛋白質群を解析する必要がある。また、病態進展、予後予測には翻訳後修飾情報を含めて詳細に解析し、系統的に整理するプロテオミクスを利用した網羅的蛋白解析が必要である。現在、プロテオミクスを用いたバイオマーカー探索が悪性疾患を中心に行われているが、解析装置、微量検体の前処理、データ解析には問題点も多く、必ずしも十分な結果は得られておらず、また、プロテオミクスを用いた NAFLD 患者血清の解析も皆無である。

NAFLD/NASH やその基本病態である高度肥満や糖尿病は肝再生不全や肝細胞癌の重要なリスクファクターと考えられ、今後、生活習慣病を基盤とした肝再生不全や肝細胞癌症例の増加も危惧されている。しかし、脂肪肝からの発癌機序や脂肪肝の原因の違いによる肝再生不全や肝細胞癌発生が異なるかは十分明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、プロテオミクスにより NASH の新しい診断マーカーを同定し、同定した診断マーカーの臨床的意義を検討することにより、NASH の病態解明とそれを基にした新しい治療法を創出する。また、脂肪肝の原因の違いにより肝再生や肝癌の前癌病変である GST-P 陽性肝細胞の出現の差異を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 酸化ストレスマーカーの探索

初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素もしくは PBS を添加し、24 時間培養後に 1% CHAPS

含有 50 mM リン酸緩衝液を用いて細胞質タンパク質を抽出した。抽出した細胞層タンパク質 (PBS 処理群と過酸化水素処理群) を [12C]-NBS と [13C]-NBS でそれぞれ標識し、還元・アルキル化した後にトリプシン消化した。フェニルカラムで精製した NBS 標識ペプチドを試料として MALDI-TOF/MS 解析を行った。6 Da 差のペアピークの同定は MS/MS イオンサーチ法にて行った。

### (2) NASH 患者血清中の MnSOD 濃度の検討

NAFLD50 例 (NASH35 例、単純性脂肪肝 15 例)、健常者 20 例の血清 MnSOD 濃度を ELISA 法で測定し、臨床的意義を検討した。

### (3) 脂肪肝動物モデルにおける肝再生の検討

SD ラットに 2 種類の食餌 [高脂肪食 (H-Fat)、高フルクトース食 (H-Fruct)] を 4 週間投与後、肝脂肪化は Oil-Red O 染色後の画像処理による評価と肝中性脂肪含量で比較し、肝組織中の遺伝子発現は Real time PCR 法で検討した。さらに 70% 部分肝切除を行い、経時的に肝再生を評価し、再生肝組織における遺伝子及び蛋白発現と血清中サイトカイン濃度を比較検討した。

### (4) 脂肪肝動物モデルにおける肝発癌の検討

SD ラットに 2 種類の食餌 [脂肪食 (H-Fat)、高フルクトース食 (H-Fruct)] を 8 週間投与しながら、DEN を 50  $\mu$ g/L の濃度で飲水中に溶解し、投与した。安楽死後、血清・肝組織を採取した。GST-P 染色による肝腫瘍の評価は、Wang らの方法 (Int J Cancer 124: 540-546, 2009) に準じた。肝を左葉・右葉・中葉に分けて切片を作成し、1 つの切片でランダムに 15 視野を観察し、肝組織中の GST-P 陽性細胞数をカウントした。

## 4. 研究成果

### (1) 酸化ストレスマーカーの探索

MALDI-TOF/MS 解析では 1000 から 3000 m/z の範囲で、過酸化水素処理により肝細胞内で発現が変化する 73 個の蛋白ペアピークを見出した。このうち、44 個のペアピークは過酸化水素処理群で発現が増加し、2790-2796 m/z のピークは superoxide dismutase [Mn] mitochondrial precursor (以下、MnSOD) であることを明らかにした。

### (2) NASH 患者血清中の MnSOD 濃度の検討

単純性脂肪肝患者 (SS) および健常者よりも NASH 患者の血清 MnSOD 濃度は有意に高値であった (次頁の図 1)。また、血清 MnSOD 濃度は NASH の肝線維化 stage の進行に伴い上昇する傾向であった。

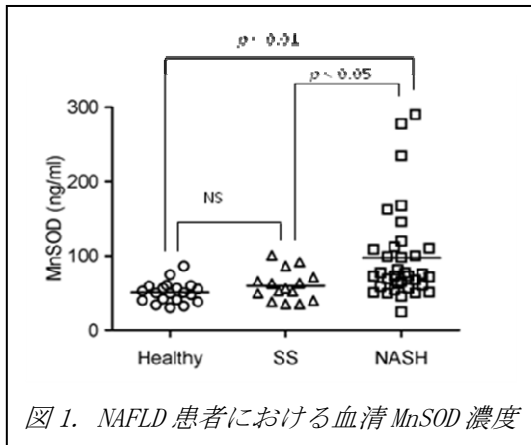


図 1. NAFLD 患者における血清 MnSOD 濃度

(3) 脂肪肝動物モデルにおける肝再生の検討  
H-Fruc 群は H-Fat 群と比較して肝脂肪化は軽度で、Fatty acid synthase (FAS) と Fructokinase (FK) の遺伝子発現は亢進し、PPAR- $\alpha$ 、AMPK、CPT-1、Cyp2E1 は低下していた。また、H-Fruc 群は H-Fat 群と比較して肝切除 24 時間後の JAK、ERK1/2 の蛋白発現が低く、肝切除 1 週間後の肝再生率と再生肝の PCNA 発現は H-Fat 群より H-Fruc 群が低下していた (図 2)。

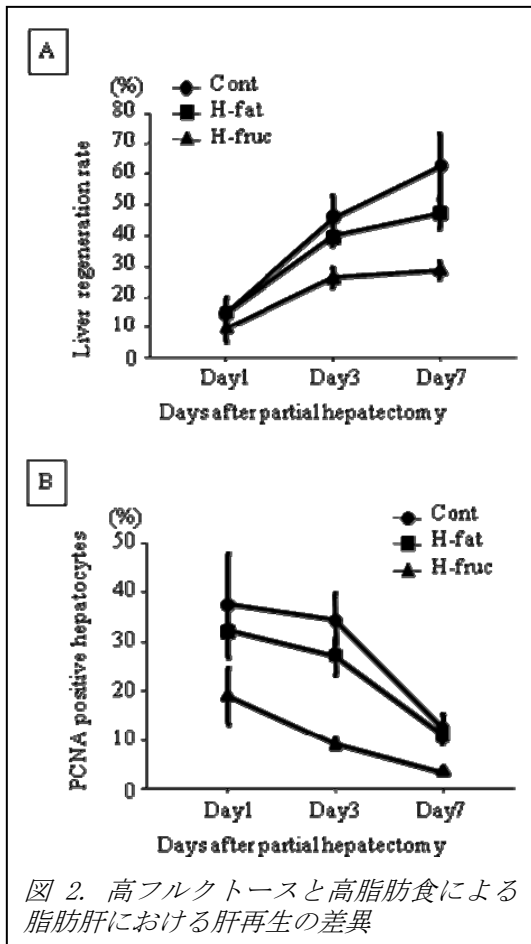


図 2. 高フルクトースと高脂肪食による脂肪肝における肝再生の差異

一方、血清中の TNF $\alpha$ 、IL-6、HGF、TGF $\beta$

濃度は両群で明らかな差はなかった。しかし、H-Fat 群では肝切除後に TGF $\beta$  濃度が一旦低下し、再上昇するのに対し、H-Fruc 群では TGF $\beta$  は経時的な変化がなかった。

(4) 脂肪肝動物モデルにおける肝発癌の検討

8 週間後の空腹時血糖は H-Fruc 群がコントロール食群と H-Fat 群に比べて高値で、肝重量と ALT 値は H-Fruc 群と H-Fat 群がコントロール食群より高値であった。また、脂肪肝の程度は H-Fat 群の方が H-Fruc 群よりも高度であった。一方、GST-P 染色による肝腫瘍の評価では、肝組織の GST-P 陽性肝細胞のあるスライド切片数、および GST-P 陽性切片中の GST-P 陽性細胞数は、H-Fruc 食群が最も多く、次に H-Fat 群で多く、コントロール食群では GST-P 陽性肝細胞はごく少数であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- 1) Hamabe A, Uto H, Imamura Y, Kusano K, Mawatari S, Kumagai K, Kure T, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Impact of cigarette smoking on onset of nonalcoholic fatty liver disease over a 10-year period. J Gastroenterol 2011 [in press] (査読有)
- 2) Hiramane Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and the risk of fatty liver in Japanese men. J Gastroenterol 2011 [in press] (査読有)
- 3) Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Arima S, Hashimoto S, Nasu Y, Takami Y, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat. Biochem Biophys Res Commun 407: 163-8, 2011. (査読有)
- 4) Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. Proteome Sci 8: 70, 2010. (査読有)
- 5) Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker

- for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol Res* 40: 438-45, 2010. (査読有)
- 6) Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45: 459-67, 2010. (査読有)
  - 7) Takami Y, Uto H, Takeshita M, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 40: 337-45, 2010. (査読有)
  - 8) Takeshita M, Ishida Y, Akamatsu E, Ohmori Y, Sudoh M, Uto H, Tsubouchi H, Kataoka H. Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J Biol Chem* 284: 21165-76, 2009. (査読有)
  - 9) Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology* 50: 393-9, 2009. (査読有)
  - 10) Imamura Y, Uto H, Oketani M, Hiramine Y, Hosoyamada K, Sho Y, Hiwaki T, Baba Y, Tahara K, Kubozono O, Kusano K, Tsubouchi H. Association between changes in body composition and the increasing prevalence of fatty liver in Japanese men. *Hepatol Res* 38: 1083-1086, 2008. (査読有)
  - 11) Takahama Y, Uto H, Kanmura S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata N, Hayashi K, Stuver S, Okayama A, Tsubouchi H: Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterol* 43: 942-50, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計 21 件)
- 1) Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Arima S, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Liver regeneration after partial hepatectomy was more impaired in liver steatosis induced by dietary fructose than by Dietary fat. The 9th JSH Single Topic Conference "NASH 2010". 2010 Nov 18; Tokyo, Japan
  - 2) Hiramine Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and risk of fatty liver in Japanese men. 61<sup>th</sup> annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010 Nov 2; Boston, USA
  - 3) Kumamoto R, Uto H, Tanoue S, Arima S, Kure T, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Dietary fructose rather than dietary fat affects liver tumor incidence by diethylnitrosamine administration in rats. 61<sup>th</sup> annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010 Nov 1; Boston, USA
  - 4) Hamabe A, Uto H, Imamura Y, Mawatari S, Oda K, Saisyoji A, Hashiguchi M, Kure T, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Impact of cigarette smoking on the onset of nonalcoholic fatty liver disease: A 10-year longitudinal study. 61<sup>th</sup> annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2010 Oct 30; Boston, USA
  - 5) Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Hashimoto S, Nasu Y, Sasaki H, Hunakawa K, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. A high-fructose diet impairs liver regeneration more than a high-fat diet after partial hepatectomy in a rat fatty liver model. 60<sup>th</sup> annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2009 Nov 1; Boston, USA
  - 6) Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Moriuchi A, Funakawa K, Sakiyama T,

Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. The serum levels of manganese superoxide dismutase (MnSOD) are elevated in patient with non-alcoholic steatohepatitis (NASH). 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2009 Nov 1; Boston, USA

- 7) Uto H, Sato Y, Tanoue S, Ishida Y, Tamai T, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. A fragment of high molecular weight kininogen is upregulated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease (AASLD). 2008 Nov 2; San Francisco, USA.
- 8) Takami Y, Uto H, Takahama Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the [ <sup>13</sup>C ] -2-nitrobenzenesulfonyl stable isotope labeling method. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease (AASLD). 2008 Nov 2; San Francisco, USA

[図書] (計3件)

- 1) 宇都浩文、上村修司、坪内博仁. 消化器疾患におけるプロテオーム解析. 戸田剛太郎, 沖田極(編). 肝臓フォーラム'08 記録集. 医事出版社. 2009. p129-139
- 2) 今村也寸志、桶谷真、宇都浩文、坪内博仁. 脂肪肝は内臓脂肪の指標になりえるか. 飯田三雄(編). 消化器病学の進歩—原点から未来への情報発信—日本消化器病学会. 2009. p23-26
- 3) 宇都浩文、上村修二、坪内博仁. 肝疾患の血清プロテオミクスを用いた診断. 林紀夫、日比紀文、上西紀夫、下瀬川徹(編). Annual Review 消化器 2009. 中外医学社.

2009. p200-208

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宇都 浩文 (UTO HIROFUMI)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師  
研究者番号：20347058

### (2) 研究分担者

森内 昭博 (MORIUCHI AKIHIRO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：40359823

### (4-1) 研究協力者

佐藤 悠子 (Sato Yuko)  
宮崎県産業支援財団・研究員

### (4-2) 研究協力者

田ノ上 史郎 (Tanoue Shiro)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

### (4-3) 研究協力者

隈元 亮 (Kumamoto Ryo)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

### (4-4) 研究協力者

有馬 志穂 (Arima Shiho)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

### (4-5) 研究協力者

濱邊 絢香 (Hamabe Ayaka)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生

### (4-6) 研究協力者

指宿 りえ (Ibusuki Rie)  
鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院生