

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390232

研究課題名（和文）サイトグロビンノックアウトマウスを用いた肝硬変・肝癌病態解析

研究課題名（英文）Analyses of the development of liver cancer and cirrhosis by using cytoglobin-deficient mice

研究代表者

河田 則文（KAWADA NORIFUMI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30271191

研究成果の概要（和文）：サイトグロビン（Cytoglobin, Cygb）の生体内機能を明らかにするため Cygb 欠損マウス（Cygb<sup>-/-</sup>）を作出した。ジエチルニトロサミン 25 ppm 投与での肝発癌実験で、Cygb<sup>-/-</sup>マウスでは 100%で肝腫瘍（肝癌や肝血管腫）生じることを確認した。肝臓にはコラーゲンの沈着が強く生じ、 $\alpha$ -fetoprotein, interleukin-1, transforming growth factor- $\beta$  の mRNA 発現が亢進していた。この様な現在までの知見から、Cygb 欠損は臓器の酸化ストレス制御を破綻させ、細胞の癌化に寄与し、Cygb が癌抑制遺伝子であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the molecular function of cytoglobin (Cygb) in vivo, we generated Cygb-deficient mice. Administration of diethylnitrosamine (25 ppm) induced the development of liver tumors (liver cancer and hemangioma) in all of the Cygb-deficient mice, which were accompanied by the accumulation of collagen and the increased mRNA expression of  $\alpha$ -fetoprotein, interleukin-1 $\beta$ , and transforming growth factor- $\beta$  in the liver. Based on these findings, we concluded that Cygb-deficiency triggers dysregulation of oxidative stress and accelerates tumorigenesis of the liver. Cygb is a novel tumor-suppressor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	9,300,000	2,790,000	12,090,000

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

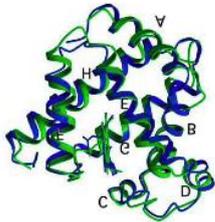
キーワード：サイトグロビン・肝硬変・肝癌・線維芽細胞・動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

（1）我々は肝線維化を分子細胞論的に評価し、最終的に肝線維化抑制法を開発するために、肝線維化に深く関わる肝星細胞の機能を解析してきた。即ち、ビタミン A 貯蔵型の静止期星細胞が、活性化して I 型コラーゲンを

過剰産生する筋線維芽様細胞へと細胞形質を変化させるメカニズムやその抑制法を主として研究してきた。1998 年以降は星細胞に発現する蛋白質群をプロテオミクスで網羅的に解析し (Hepatology 32, 268, 2000)、21 kDa の新蛋白を同定し、その遺伝子を *stap*

(stellate cell activation-associated protein) と命名した (J Biol Chem 276, 25318, 2001, Accession number AJ245663)。さらに第 17 番染色体上に存在するヒト *stap* 遺伝子も同定した (Biochim Biophys Acta. 1577,



471, 2002)。結晶化した本蛋白の立体構造はミオグロビン (myoglobin, Mb) と酷似しており (左図)、現在ではサイトグロビン

(cytoglobin, Cygb) と呼ばれ、ヘモグロビン (Hb)、ニューログロビン (Ngb) に並んで哺乳類第 4 番目のグロビンであることが判明している (J Mol Biol 339, 873, 2004)。Cygb はラット分離星細胞を用いた検討から、星細胞活性化過程で誘導されること、肝臓毒を用いたラット肝線維化モデルでは発現が増加すること、ヒトの肝星細胞に Cygb が発現することなどを見出し報告してきた (Lab Invest 84, 91, 2004)。

Cygb は他のグロビン同様、酸素、一酸化窒素、一酸化炭素などのガス分子と結合して生体内ガスのリザーバーとなり得ることを報告した (Biochemistry 42, 5133, 2003)。一方、Cygb はペルオキシダーゼ活性を持ち、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) を分解するため、 $H_2O_2$  依存性の細胞内酸化ストレス代謝を調節することも報告されている。しかしながら、Cygb のそれ以外の蛋白機能やビタミン A 貯蔵星細胞に発現する意義などについては現在不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究は以下の点に焦点を充てる。Cygb<sup>-/-</sup>マウスの表現型を詳細に検討する。Cygb<sup>+/+</sup>マウスと対応させながら生後一定期間ごとに、肝脾の遺伝子・蛋白発現変動を網羅的に検討し、Cygb の生理的意義付けを行なう。Cygb の生体内機能は現在までのところ全く不明であるため、Cygb を欠損させることで如何なる分子変動が生じるのか、その全体像を解析し、Cygb を中心とした分子マップの作製を試みる。

(1) 同時に、チオアセトアミド

(thioacetamide, TAA) やコリン・メチオニン欠乏食 (choline-methionine-deficient diet, MCD) 投与、あるいは胆管結紮により慢性肝障害をマウスに惹起させ、肝臓の炎症反応や線維化反応における Cygb<sup>-/-</sup>マウスと Cygb<sup>+/+</sup>マウスの相違を明らかにする。特に線維化との関係が深いコラーゲンやフィブロネクチン、サイトカイン (transforming growth factor  $\beta$ , monocyte chemotactic protein 1, platelet-derived growth factor, angiotensin-II, leptin) などの解析分子を抽出し、それらの変動を検討する。また、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) で誘導される肝癌が Cygb<sup>-/-</sup>マウスと Cygb<sup>+/+</sup>マウスで異なるかを検討し、Cygb の発癌への寄与を検討する。

(2) Cygb は鉄分子を含有するヘム蛋白であることから鉄代謝に関連する分子群 (heme oxygenase-1, ferritin, transferrin など) の発現に関しても、肝脾の両方で比較検討する。

(3) Cygb はビタミン A を貯蔵できる内臓系線維芽細胞にのみ特異的に発現する。Mb が筋細胞、Hb が赤血球、Ngb が神経細胞特異的に存在するように、Cygb がビタミン A 代謝において特有の役割を果たす可能性がある。本課題を検討するために、Cygb<sup>-/-</sup>マウスと Cygb<sup>+/+</sup>マウスの両者における、また、それぞれにビタミン A を過剰投与した場合の、肝臓におけるビタミン A およびその代謝産物 (レチノール、レチノイン酸など) の変動を検討する。

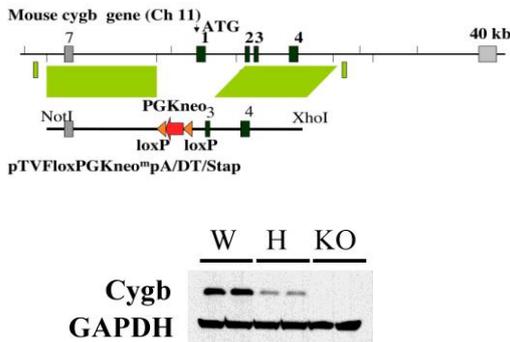
(4) ヒト病態における Cygb の関与を明らかにするため、種々の肝線維症患者肝における Cygb 発現を免疫組織学的に、あるいは、in situ hybridization を用いて調べる。同時に、患者肝組織から DNA を採取して Cygb 遺伝子変異やプロモーター領域メチル化を検討し、線維化進展度や肝発癌と Cygb 遺伝子の関連を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) Cygb<sup>-/-</sup>マウスの表現型の詳細な解析

図に示すようにマウス Cygb 遺伝子の Exon1, 2 を欠損するターゲティングベクターを作製した。Cygb 欠損 ES 細胞を得、マウス初期胚へ移植してキメラマウスを作製し、交配さ

せて  $Cygb^{-/-}$  マウスを作製し純化した。



#### 肝臓・脾臓の組織学的検討

予備的な観察で、生後 10 ヶ月齢の  $Cygb^{-/-}$  マウスでは肝脾腫を生じることが判明した。 $Cygb^{-/-}$  マウスと  $Cygb^{+/+}$  マウスを比較しながら、時間経過とともに詳細に組織学的観察を行なう。

(i) HE、シリウスレッド、アザン染色を用いて炎症や線維化の存在を明らかにする。細胞外マトリックスとして I, III, IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどを免疫組織化学を用いて明らかにする。

(ii)  $Cygb$  はヘム蛋白で鉄を含有するため鉄代謝が変動する可能性がある。ベルリン青染色を用い肝脾への鉄沈着を検討する。

(iii) 酸化ストレスマーカーとして 8-hydroxydeoxyguanosine, 4-hydroxynonenal (4-HNE) や heme oxygenase-1 などの酸化ストレスマーカーについても免疫組織学的に解析する。

#### 肝臓・脾臓の遺伝子・蛋白発現変化の網羅的解析

$Cygb$  の生体内機能は全く不明である。従って、 $Cygb^{-/-}$  マウスで肝脾腫が生じたことは  $Cygb$  自体の機能解析にとって極めて意義深い。臓器で生じる変化を網羅的に解析し、 $Cygb$  欠損によって生じる分子変動から  $Cygb$  の分子的意義づけをマップ化することは重要である。本目的のために、

(i) 生後 2, 6, 12, 18 ヶ月後の各時期で  $Cygb^{-/-}$  マウスと  $Cygb^{+/+}$  マウスの肝臓と脾臓から mRNA を抽出し、cDNA に変換後、DNA microarray (OpArray Mouse v4.0, 35,852 プローブ) を用いて網羅的遺伝発現を検討し、 $Cygb$  欠損により変動する遺伝子群をクラスター解析する。その結果、変動する遺伝子に

方向性がある場合、個々の遺伝子につき今度はリアルタイム PCR を用いて経時的、定量的に変化を観察する。

(ii) 同時進行で、2D SDS-PAGE、さらには高速液体クロマトグラフィーとのコンビネーションで Q-TOF タンデムマスペクトロメトリーを用いて発現蛋白質を網羅的解析する。発現量の変動のみならず、タンデムマスペクトロメトリー法で蛋白質のリン酸化や糖付加などの翻訳後修飾の検出も試みる。以上の、遺伝子・蛋白変動をグローバルに解析して、 $Cygb$  に関連する分子マップを作製する。

#### 肝臓における遺伝子発現変化の解析

網羅的解析を行なう傍らで、 $Cygb^{-/-}$  マウスの肝炎・線維化に関連する分子変動をこれまでの多くの報告に基づき順次リアルタイム PCR を用いて解析し、 $Cygb^{-/-}$  マウス肝で起こる遺伝子変動を解析する。

(i) 細胞外マトリックス関連: collagen I, III, IV, laminin, fibronectin など。

(ii) コラーゲン代謝に関連: transforming growth factor- $\beta$ , connective-tissue growth factor, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 & 2, matrix metalloproteinase-2, 9, 13 など。

(iii) サイトカイン関連: platelet-derived growth factor-BB, monocyte chemotactic proein-1, interleukin-1, 6, 8, 10, 12, 18, tumor necrosis factor- $\alpha$ , leptin, angiotensin-II などとそれらの受容体。

(iv) 脂質代謝関連: PPAR $\alpha$ ,  $\gamma$  や RXR など。

(v) 鉄代謝関連: hemeoxygenase-1, ferritin, transferrin, hepcidin, haptoglobin, ferroportin-1 など。

(2)  $Cygb^{-/-}$  マウスに慢性肝炎や発癌刺激を与え、線維化や肝癌発症における  $Cygb$  の役割りを検討

(i) マウスに既報の如くチオアセトアミド (thioacetamide, TAA) やメチオニン・コリン欠乏食 (methionine-choline-deficient diet, MCD) を 12 週間投与して肝硬変を誘導、あるいは 20 日間の総胆管結紮により慢性肝障害をマウスに惹起させ、肝臓の炎症反応や線維化反応における  $Cygb^{-/-}$  マウスと  $Cygb^{+/+}$  マ

ウスの相違を明らかにする。特に線維化との関係が深い collagen I, III, IV, laminin, fibronectin など、サイトカイン (transforming growth factor  $\beta$ , monocyte chemotactic protein 1, platelet-derived growth factor, angiotensin-II, leptin) などや鉄代謝関連分子 (hemoxygenase-1, ferritin, transferrin, hepcidin, haptoglobin, ferroportin-1) などの分子発現を real-time PCR 法にて検討する。

(ii) 一方、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) で誘導される肝癌が  $Cygb^{-/-}$  マウスと  $Cygb^{+/+}$  マウスで異なるかを検討し、 $Cygb$  の発癌への寄与を検討する。生後 15 日目の  $Cygb^{-/-}$  マウスと  $Cygb^{+/+}$  マウスに 25mg/kg の DEN を腹腔内投与後、3, 6, 9 ヶ月後の肝臓採取し、肝癌の発生頻度、ならびに細胞の異型性を検討する。変化に応じて、酸化ストレス、炎症、線維化に関連する上記分子、さらに cell cycle に関連する nuclear factor  $\kappa B$  など転写因子や細胞内シグナル伝達の相違を検討する。

(3) ヒト肝病態における  $Cygb$  の関与を明らかにする。

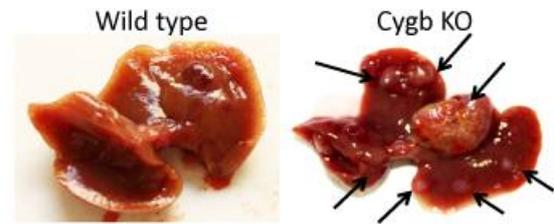
$Cygb^{-/-}$  マウスで得られる情報を臨床病態でも確認するため、種々の肝患者肝における  $Cygb$  発現を既に作製済みの抗  $Cygb$  モノクローナル抗体 (Biochim Biophys Acta. 1577, 471, 2002) を用いて免疫組織学的に、あるいは、in situ hybridization を用いて  $Cygb$  mRNA 発現レベルで病因による差があるかどうかについて検討する。

また最近、 $Cygb$  遺伝子が発癌抑制と関連する可能性が報告された (Cancer Res. 68, 7448, 2008) ため、DNA レベルで肝発癌と  $Cygb$  遺伝子の変異を調べるのが急務である。上図に示すように  $Cygb$  はヒト 17 番染色体上、sthm と FLJ22342 遺伝子の間に存在し、4 exon で構成される (8,965 bp)。この上流の転写調節領域も含めて PCR シークエンスし、 $Cygb$  遺伝子の変異、 $Cygb$  転写調節領域のメチル化、あるいは、SNP が肝線維症患者や肝癌患者で見られるか検討する。可能な限り多数のサンプルを解析するため、PCR サーマルサイクラーならびに DNA アナライザーは独自に確保す

る。

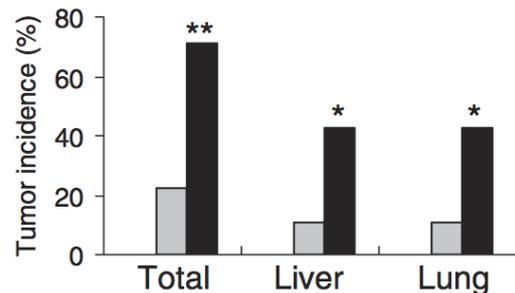
#### 4. 研究成果

(1)  $Cygb^{-/-}$  マウスは易発がん性を示す: マウス



25 ppmのDENを25週間飲水投与したところ野生型では40%であったのに対してCygbノックアウトマウス100%で肝癌が生じた。

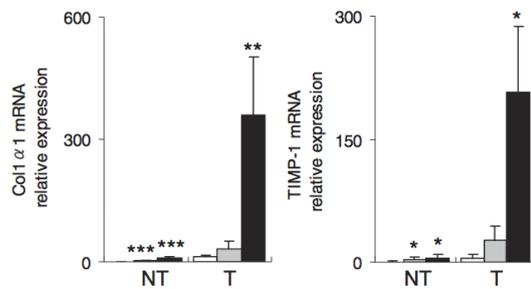
に 25 ppm の DEN を飲水に混ぜて投与したのち 25 週目に屠殺して肝臓を観察したところ、100%の  $Cygb^{-/-}$  マウスで腫瘍が形成され、腫瘍数も野生型に比較して多数であった。同様の結果は 0.05 ppm という低容量の DEN を投与した場合でより顕著となり、36 週間後において野生型では全く腫瘍が生じていなかったのに対して、この濃度でも 40%の  $Cygb^{-/-}$  マウスで腫瘍形成が確認された。



以上の結果から  $Cygb$  欠損はマウスを易発がん性にさせることが明らかとなった。

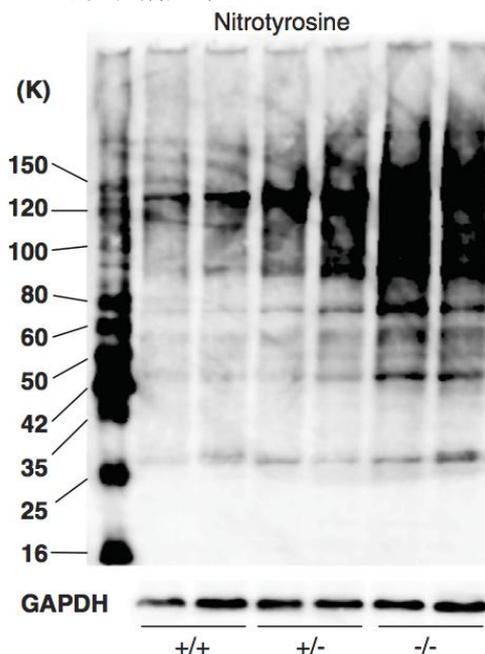
(2)  $Cygb^{-/-}$  マウスでは星細胞の活性化が生じる: ヒトの肝癌は C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎、それらに基づく肝硬変を背景として生じる。このことから、 $Cygb^{-/-}$  マウスにおける発がん性の亢進は肝線維化と関係することが想定された。 $Cygb^{-/-}$  マウスの肝臓を観察すると、CRBP-1 は傍類洞に発現しているため星細胞自身は存在することが確認できた。一方、星細胞活性化マーカーである  $\alpha$  平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) の発現は  $Cygb^{-/-}$  マウスでは亢進することが判明した。同様に、星細胞マーカーであるデスミンの発現も  $Cygb^{-/-}$  マウスでは亢進していた。

(3) *Cygb*<sup>-/-</sup>マウスでは肝線維化が亢進する：これらの結果から、肝臓の線維化自体をシリウスレッド染色で観察すると肝細胞の周囲にコラーゲンが強度に沈着することが観察された。この結果を支持するように、collagen 1 $\alpha$ 1やTIMP-1のmRNA発現が*Cygb*<sup>-/-</sup>マウスでは有意に増加することが判明した。



(4) *Cygb*<sup>-/-</sup>マウスでは酸化ストレス応答が亢進する：*Cygb*はヘム蛋白であるが、ヘム蛋白の一般的性質としてペルオキシダーゼ活性や脂質過酸化反応を抑制する効果が知られている。DEN誘導性の肝癌発症が炎症反応や線維化反応の亢進に加えて酸化ストレスの亢進が関与するかどうかについて一酸化窒素とスーパーオキシドとの生成産物であるONOO<sup>-</sup>を検出するニトロチロシンについて検討した。その結果、*Cygb*<sup>-/-</sup>マウスではニトロチロシンの産生が顕著に増加していることが判明した。

## 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 12 件)

①. Antifibrotic role of macrophage migration inhibitory factor: discovery of an unexpected function. Thuy le TT, Kawada N. *Hepatology*. 2012;55:1295-7.

②. Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. Fujii H, Kawada N. *J Gastroenterol*. 2012;47:215-25.

③. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- $\beta$  response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. Kamada Y, Mori K, Matsumoto H, Kiso S, Yoshida Y, Shinzaki S, Hiramatsu N, Ishii M, Moriwaki K, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. *Glycobiology*. 2012;22:778-87.

④. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *Gut*. 2012, in press.

⑤. Fascin, a novel marker of human hepatic stellate cells, may regulate their proliferation, migration, and collagen gene expression through the FAK-PI3K-Akt pathway. Uyama N, Iimuro Y, Kawada N, Reynaert H, Suzumura K, Hirano T, Kuroda N, Fujimoto J. *Lab Invest*. 2012;92:57-71.

⑥. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *J Cell Physiol*. 2011;226:2535-42.

⑦. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Am J Pathol. 2011;179:1050-60.

⑧. Cytoglobin expression of rectal subepithelial myofibroblasts: significant alterations of cytoglobin+ stromal cells in long-standing ulcerative colitis.

Okayasu I, Mikami T, Yoshida T, Hana K, Yokozawa M, Sada M, Fujiwara M, Kawada N. Histol Histopathol. 2011;26:679-88.

⑨. Evolution of hepatic fibrosis research. Kawada N. Hepatol Res. 2011;41:199-208.

⑩. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Am J Pathol. 2011;178:128-39.

⑪. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. Am J Pathol. 2010;177:153-65.

⑫. Inhibition of pancreatic stellate cell activation by halofuginone prevents pancreatic xenograft tumor development. Spector I, Honig H, Kawada N, Nagler A, Genin O, Pines M. Pancreas. 2010;39:1008-15.

[学会発表] (計 2 件)

①. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. 16<sup>th</sup> International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2011 年 9 月 23 日、イタリア、フロレ

ンス、口頭発表

②. Cytoglobin as a novel tumor suppressor in the liver. Kawada N, Le TT. AASLD, 2011 年11月4日、サンフランシスコ、USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: サイトグロビン遺伝子ノックアウト非ヒト癌モデル動物

発明者: 河田 則文

権利者: 河田 則文

種類: 特願

番号: 2010-052244

出願年月日: 平成 22 年 3 月 9 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/hepatology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河田 則文 (KAWADA NORIFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30271191

### (2) 研究分担者

森田 隆 (MORITA TAKASHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 70150349

田守昭博

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30291595

榎本 大 (ENOMOTO MASARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 20423874

### (3) 連携研究者

なし