

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4月11日現在

機関番号：11401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590823
 研究課題名（和文） イノシトールリン脂質による脂肪肝炎と肝癌制御機構の解明-新規治療薬の開発に向けて
 研究課題名（英文） Elucidation of the phosphatidylinositol metabolism to control steatohepatitis and hepatocellular carcinoma
 研究代表者
 堀江 泰夫（HORIE YASUO）
 秋田大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：30282164

研究成果の概要（和文）：Pten KO マウスの肝病変は、PI3 キナーゼのアイソザイム（p110 α 、p110 γ 、p110 δ ）によって制御されず、Ptenによって脱リン酸化をうけるイノシトールリン脂質PI(3,4,5)P₃と同じ機能を有するPI(3,4)P₂の脱リン酸化酵素 Inpp4 や Pten の下流分子である Akt2、PPAR γ がその制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Deletion of phosphatidylinositol 3 kinase isozymes such as p110 α , p110 γ , and p110 δ did not inhibit development of hepatic lesions in Pten KO mice. Inpp4 is a phosphatase which dephosphorylates PI(3,4)P₂ that is metabolite of PI(3,4,5)P₃ and has the same function as PI(3,4,5)P₃, a substrate of Pten. We made clear that Inpp4 or Akt2 and PPAR γ , downstream molecules of Pten, played a critical role in development of hepatic lesions in Pten KO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

申請者は、イノシトールリン脂質（phosphatidylinositol: PIs）の脱リン酸化酵素PTENの肝臓における機能解析を継続して行ってきた[Horie Y, et al: J Clin Invest 113:1774-83, 2004; Ueno T, Horie Y, et al:

Autophagy 4: 692-700, 2008; Qui W, Horie Y, et al: Hepatology 48: 1799-1809, 2008]。その中で、肝細胞特異的Pten欠損マウス（Alb-Cre Pten^{flox/flox}: Pten KO）マウスを用いて解析を行い、PTENが肝臓における脂肪化、炎症、発癌を制御し、PTENの欠失した肝臓で

はAktの活性化を介した核転写因子SREBP1c およびPPAR γ の発現増加に起因して脂肪肝、脂肪肝炎、肝細胞癌が発症することを世界に先駆けて明らかにした[Horie Y, et al: J Clin Invest 113: 1774-83, 2004]。また、このPten K0マウスの肝病変が、メタボリック症候群の肝病変として近年注目されているNASHと相同であり、Pten K0マウスがNASH(nonalcoholic steatohepatitis)の動物モデルとして有用であることを示した[Horie Y, et al: J Clin Invest 113: 1774-83, 2004]。

2. 研究の目的

今日の肥満、糖尿病、高脂血症の増加に伴う脂肪肝の著しい増加(成人の10~30%)を背景に、NASHは、成人の2~3%にのぼると推定される。NASHの10~20%が肝硬変から肝癌へと進行し、ウイルス性肝炎と同様に致死的事であることから、NASHは「21世紀の肝臓病」と呼ばれている。現時点におけるNASHの治療は、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧などの生活習慣病に対する食事療法と運動療法が中心である。しかし、生活習慣の改善だけでは肝病変の進行を抑えることができない症例が存在することから、NASHに対する効果的な薬物療法の確立が待たれている。一方、NASHの薬物治療にはエビデンスの高い報告はほとんどなく、治療法が確立していないのが現状である[Nugent C, et al: Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 4: 432-41, 2007]。そこで、申請者は、Pten K0マウスに種々の薬剤を投与し、その肝病変に対する効果と背景メカニズムを検討することによりNASHに対する有効薬剤のスクリーニングを行ってきた。その成果として、腸内細菌叢由来のエンドトキシンを制御する抗生剤や抗酸化剤N-acetyl cystein、多価不飽和脂肪酸 Eicosapentaenoic acid、利胆剤

Ursodeoxycholic acidがPten K0マウスの肝病変における炎症、脂肪化、発癌をさまざまな程度に抑制することを示し、これらの薬剤のNASHに対する有効性を報告した[Dohmen T, Horie Y, et al: Akita J Med 34: 55-9, 2007; Ishii H, Horie Y, et al: J Hepatol 50: 562-71, 2009]。しかし、これらの既知の薬剤では肝病変の完全な改善は得られていないことも明らかになり、新たな治療薬の必要性が示唆された。

近年、PIsの代謝を制御する細胞透過性の低分子量PI3キナーゼ阻害剤は、臨床応用に向けての研究が積極的に進められ、種々の癌、炎症性疾患および自己免疫疾患に対する新しい治療法として期待されている[Ruckle T, et al: Nature Reviews 5: 903-18, 2006]。申請者は、PIsやPIsの代謝を制御するClass IAおよびClass IB PI3キナーゼのPten K0マウスの肝病変における役割を明らかにし、NASHに対する新たな治療法としてのPI3キナーゼ阻害剤の有用性をPten K0マウスを用いて示したいと考えた。

3. 研究の方法

PI3キナーゼのアイソザイム(p110 α 、p110 γ 、p110 δ)遺伝子変異マウスをPten K0マウスと交配し、Ptenと各PI3キナーゼの二重遺伝子変異マウスを作製し、Pten K0マウスの肝病変の改善の有無を検討した。

上記の二重遺伝子変異マウスを作製したところ、PI3キナーゼの抑制によりPten K0マウスの肝病変を改善させることができなかったため、生体においてPtenによって脱リン酸化をうけるイノシトールリン脂質PI(3,4,5)P₃と同じ機能を有するPI(3,4)P₂の脱リン酸化酵素Inpp4とPtenの二重遺伝子変異マウスやPtenシグナルの下流に位置するAkt1、Akt2とPtenの二重遺伝子変異マウスを作製し、Pten K0マウスの肝病変の改善

の有無を検討した。

4. 研究成果

研究初年度に作製した3種類のPtenとClass IAおよびClass IBの二重変異マウスPten KO/p110 α +/-マウス、Pten KO/p110 δ -/-マウスおよびPten KO/p110 γ -/-マウスの肝重量、肝重量/体重比と肝組織像には、Pten KOマウスとの間に差はみられず、PI3キナーゼの制御によってPten KOマウスの肝病変を改善させることはできなかった。

そこで、生体においてPtenによって脱リン酸化をうけるイノシトールリン脂質PI(3,4,5)P₃と同じ機能を有するPI(3,4)P₂の脱リン酸化酵素Inpp4がPten KOマウスの肝病変の発症・進展を制御する可能性を検討するためにPten KO/Inpp4B-/-二重変異マウスを作製した。40週齢のPten KOマウスでは80%(5匹中1匹)に肉眼的に腫瘍性病変がみられるのに対して、Pten KO/Inpp4B-/-マウスでは14匹すべてに腫瘍性病変が認められた。また、これらの腫瘍性病変を組織学的に検討すると、Pten KOマウスでは1匹も癌化がみられないのに対して、Pten KO/Inpp4B-/-マウスでは14匹中4匹(29%)に癌化が認められ、Inpp4BはPten KOマウスでみられる肝腫瘍性病変の制御因子であることが示唆された。

さらに、Ptenのシグナル伝達経路からみたPten KOマウスの肝腫瘍性病変形成機序を明らかにするために、Ptenシグナルの下流に位置するAkt1とAkt2を欠損するAkt1-/-マウスおよびAkt2-/-とPten KOマウスの二重変異マウスPten KO/Akt1-/-マウスおよびPten KO/Akt2-/-マウスを作製した。Pten KO/Akt2-/-マウスでは、Pten KOマウスに比較して、肝腫瘍性病変および肝癌の発生頻度が有意に抑制された。さらに、Pten KO/Akt2-/-マウスにPioglitazoneを投与あるいはPPAR γ アデノウイルスを感染させAkt

シグナルの下流に位置するPPAR γ が肝腫瘍性病変の進展の関与することも明らかにした。以上の結果から、Pten \rightarrow Akt2 \rightarrow PPAR γ シグナル伝達経路の活性化が、Pten KOマウスの肝腫瘍性病変の進展に寄与していることが明らかになった。

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1件)

Panasyuki G, Horie Y (16人中5番目) et al, PPAR γ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver, Nature Communication, 査読有, Vol.3, 2012, 1-9

[学会発表] (計1件)

Yasuo Horie (6人中1番目) et al, Steatohepatitis and hepatocellular carcinoma developed in hepatocyte-specific Pten-deficient mice, The 9th JSH Single Topic Conference (日本肝臓学会)、Nov 2011, Tokyo

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 泰夫 (HORIE YASUO)
秋田大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30282164

(2) 研究分担者

大嶋 重敏 (OHSHIMA SHIGETOSHI)
秋田大学・医学部・講師
研究者番号：50375268

大西 洋英 (OHNISHI HIROHIDE)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00313023

(3) 連携研究者

佐々木 雄彦 (SASAKI TAKEHIKO)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50333365