

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 5月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659188

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪肝炎における肝細胞死と Bcl-2 ネットワーク

研究課題名（英文）Bcl-2 network and regulation of cell death in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

竹原 徹郎 (TAKEHARA, TETSUO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

研究成果の概要（和文）：アポトーシスは非アルコール性脂肪肝炎を特徴づける肝臓の実質細胞の変化である。肝細胞におけるアポトーシスの意義とその制御機構を解明することは、細胞死を標的とした脂肪肝炎の治療法の開発に繋がる。本研究により、肝細胞の生と死は Bcl-2 ネットワークによる精緻なバランスにより制御されており、その破綻による過剰なアポトーシスの持続は肝発癌に直結するイベントであることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Apoptosis is a characteristic feature for hepatocyte cell death in non-alcoholic steatohepatitis. The aim of this study is to examine the significance and regulation of hepatocyte apoptosis, using several kinds of knockout mice targeting the Bcl-2 family genes. The study revealed that hepatocyte apoptosis is regulated by a fine balance between anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family and that excessive apoptosis is directly linked to hepatocarcinogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	300,000	3,300,000

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：アポトーシス、Bcl-2、肝細胞、Bcl-xL、Mcl-1、Bak、NASH、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は肝細胞死の持続と線維化の進行により、通常の脂肪肝と峻別される。長期の経過の後、end-stageの肝硬変や肝癌の発生に至ることが問題であり、今後増加が懸念される深刻な疾患である。NASHにおける細胞死の特徴はアポトーシスであることが明らかにされている（Feldstein AE, et al. Gastroenterology

2003）。また、患者血清中のアポトーシスマーカーは線維化と相関があることが報告されている（Wieckowska A, et al. Hepatology 2006）。このような事実は肝細胞アポトーシスと NASH 病態進展との間の密接な関連を示唆している。しかし、アポトーシスが真に肝疾患の進展や発癌に直結するイベントであるか否かは証明されていない。

2. 研究の目的

細胞死を標的とした脂肪肝炎の進行抑制に向けた新規治療法の開発を目指して、肝細胞アポトーシスの制御機構とその病態形成における意義を解明する

3. 研究の方法

Bcl-2 関連分子のなかで Bcl-xL, Mcl-1, Bak, Bax のノックアウトマウスを用いて、肝細胞アポトーシス、発癌について検討する。

Bcl-xL あるいは Mcl-1 の欠損は胎生致死であるため、アルブミン遺伝子プロモーター制御下に Cre 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを用いて、肝細胞特異的なノックアウトを行う。また、Bak/Bax の欠損は胎生期に個体形成異常を起こす頻度が高いことから、Bax については適宜肝細胞特異的なノックアウトを行う。

4. 研究成果

肝細胞特異的 Bcl-xL ノックアウトマウスあるいは同 Mcl-1 ノックアウトマウスは持続的な肝細胞アポトーシスを生じるが、これらのアポトーシスは Bax および Bak の欠損により消失した (Hikita H, Takehara T, et al. Hepatology 2009)。また、Bak/Bax のダブルノックアウトマウスでは、Fas 抗体の投与により引き起こされる重症肝障害がアポトーシスの抑制により軽減された (Hikita H, Takehara T, et al. Hepatology 2011)。肝細胞特異的 Mcl-1 ノックアウトマウスの肝臓では、組織学的な炎症細胞浸潤は認めなかったが、TNF- α 等の炎症性サイトカイン発現亢進や酸化ストレス応答を認め、月齢依存的に線維化が進行した。さらに、1.5 年齢において 100% の個体で肝細胞癌を発症した (Hikita H, Takehara T, et al. J Hepatol 2012)。

Mcl-1 KOマウスにおける肝発癌



Age	Mcl-1 -/-	Mcl-1 +/+
1- 1.5 years	9/15 (60%)	0/20 (0%)
1.5 - 2 years	16/16 (100%)	0/22 (0%)

以上より、肝細胞の生と死は Bcl-2 ファミリーの精緻なバランスにより制御されており、その破綻による過剰なアポトーシスの持続が肝癌発生の十分条件になっていることが明らかになった。このことは、慢性肝炎に

おける肝細胞アポトーシスが疾患進行の抑止を目指した治療標的になることを示唆している。

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 9 件)

- 1) Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol, in press, 2012.** 査読有
- 2) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer, in press, 2012.** 査読有
- 3) Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. **J Clin Invest 121: 3343-3356, 2011.** 査読有
- 4) Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. **Hepatology 54: 240-251, 2011.** 査読有
- 5) Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hayashi N. BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in

- platelets. **J Biol Chem** 286: 13905-13913, 2011. 査読有
- 6) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology** 52: 1310-1321, 2010. 査読有
- 7) Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Wei Li, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology** 138: 2487-2498, 2010. 査読有
- 8) Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hennighausen L, Yin XM, Hayashi N. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. **Hepatology** 50: 1972-1980, 2009. 査読有
- 9) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hennighausen L, Tatsumi T, Hayashi N. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. **Hepatology** 50: 1217-1226, 2009. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. **The 62nd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease** Nov 4~Nov 8, 2011, **San Francisco, USA**
Requirement of BH3-only activator proteins Bid and Bim for apoptosis by genetic ablation of Bcl-xL is completely different between hepatocytes and platelets. *Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Satoshi Shimizu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara*
2. **The 62nd Annual Meeting of the**

American Association for the study of Liver Disease Nov 4~Nov 8, 2011, **San Francisco, USA**

Continuous hepatocyte apoptosis is sufficient for liver cancer development. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Satoshi Tanaka, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara*

3. **Digestive Disease Week 2011** May 7~May 10, 2011, **Chicago, USA**

A crucial role of hepatocyte p53 in liver fibrogenesis. *Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Minoru Shigekawa, Hinako Tsunematsu, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Hisashi Ishida, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi*

4. **Digestive Disease Week 2011** May 7~May 10, 2011, **Chicago, USA**

Delayed onset of caspase-dependent liver failure induced by Fas stimulation in Bak and Bax double knockout mice. *Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Atsushi Hosui, Takuya Miyagi, Hisashi Ishida, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Norio Hayashi, Tetsuo Takehara.*

5. **The 61st Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease**

Oct 29~Nov 2, 2010, **Boston, USA**
ABT-737, a Bcl-2 mimetic Bcl-xL inhibitor, enhances the anti-tumor effect of sorafenib against hepatocellular carcinoma. *H. Hikita; T. Takehara; S. Shimizu; T. Kodama; W. Li; M. Shigekawa; A. Hosui; T. Miyagi; H. Ishida; T. Tatsumi; T. Kanto; N. Hiramatsu; N. Hayashi*

6. **The 60th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Oct 30-Nov 3, 2009, Boston, USA**

Thrombocytopenia deteriorates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N.*

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原 徹郎 (TAKEHARA TETSUO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

(2) 研究分担者

巽 智秀 (TATSUMI TOMOHIDE)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20397699

(3) 連携研究者

なし