

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790246

研究課題名（和文）活性酸素による肝疾患重症化機構の解明と治療への応用

研究課題名（英文）The role of reactive oxygen species in aggravation of liver disease and application to medical care

研究代表者

松野 邦晴 (MATSUNO KUNIHARU)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50420708

研究成果の概要（和文）：新規活性酸素産生酵素 NOX1/NADPH oxidase の肝臓の線維化における役割を解明するため検討を行った。肝線維症の誘発により肝臓組織において NOX1 発現上昇と同時に、肝障害マーカーの上昇、肝線維化および活性化肝星細胞の増加が認められたが、これらの所見は NOX1 遺伝子欠損マウスにおいて抑制されていた。単離肝星細胞を用いた検討により、NOX1 由来 ROS は phosphatase and tensine homolog (PTEN) を酸化することによりその活性を抑制し、結果的に肝星細胞の増殖に促進的に作用していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Hepatic fibrosis is a important step for progression from basic hepatic disease to hepatic cirrhosis and cancer. In this process, hepatic stellate cells (HSCs) were thought to play a central role. Recently it was reported that the expression level of NOX1, a novel catalytic subunit of NADPH oxidase, was increased in HSCs with its activation. The aim of this study was to clarify the role of NOX1 in the development of liver fibrosis using Nox1-deficient mice (NOX1 KO).

After bile duct ligation (BDL), increased expression of NOX1, elevation of ALT and AST levels, progression of hepatic fibrosis and increasing of activated HSC in liver tissue were observed in WT but not NOX1 KO. In primary cultured HSCs, its activation was not affected by NOX1 deficiency. However, cell proliferation was significantly attenuated in HSCs isolated from NOX1 KO. In these cells, significant increase of p27<sup>Kip1</sup>, a cell cycle suppressor, significant reduction in phosphorylated forms of Akt and FOXO4 were confirmed. In addition, the level of oxidized inactivated form of phosphatase and tensine homolog (PTEN), a negative regulator of PI3K/Akt pathway, was significantly decreased in HSCs of NOX1 KO. These results showed that NOX1 derived ROS aggravate hepatic fibrosis by oxidation of PTEN, which followed by Akt/FOXO4/p27<sup>Kip1</sup> pathway dependent HSC proliferation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
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：境界医学・応用薬理学

キーワード：薬物治療学、慢性肝疾患

## 1. 研究開始当初の背景

日本における肝癌患者数は近年増加の一途をたどっており、その発症母体である肝硬変を中心とする慢性肝疾患による死亡者も併せるとその数は年間約 45,000 人にも達する。肝硬変は種々の肝疾患の終末像であるが、最近、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) がその新たな基礎疾患として注目されている。NASH はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型であるとされており、その患者数はアメリカでは人口の約 3% (850 万人)、日本でも約 100 万人と推測されている。

NASH は発症後 5 年で、その 5~20% が肝硬変に進行するとされており、今後肥満人口の増加に伴い NASH 患者が増加していけば、肝癌・肝硬変患者数はさらに増加していくものと考えられ、これらの疾患に対するより有効な治療法の確立が望まれる。種々の肝疾患が肝硬変や肝癌へ進行していく上では肝臓の線維化が重要なステップであり、その過程には肝星細胞 (Hepatic stellate cell: HSC) が中心的な役割を担っていると考えられている。肝臓に傷害や炎症が引き起こされると、肝星細胞は種々の刺激によりビタミン A 貯蔵型の静止期星細胞から活性型星細胞となり、細胞外マトリックスの産生促進・分解抑制等を介し肝線維化を引き起こす。そのため、その活性化は慢性肝炎から肝硬変への進展上重要なポイントであると考えられており、その活性化機構の解明が精力的に進められているものの未だに十分な知見は得られていない。

近年、肝星細胞において、活性酸素産生酵素 NADPH oxidase の新規触媒サブユニットとして近年同定された NOX1 の発現がその活性化に伴い上昇することが報告された。以前より慢性肝炎や肝線維症等の病態において活性酸素種 (ROS) の関与は示唆されてはいたが、その産生源は炎症性細胞や Kupper 細胞に発現している Nox2 であると考えられていた。そのため、肝星細胞と ROS の関係に関してはこれまでほとんど検討されていなかったが、上述の報告は NOX1 が肝星細胞の活性化を介して肝線維化の発症・進展に関与している可能性を強く示唆するものであると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は肝線維化における NOX1 由来 ROS の役割を解明することである。これまでに多くの薬物が肝線維化の治療薬として研究されてきたが、そのいずれも十分な効果を認められるには至っていない。本研究により、肝線維化における NOX1 由来の

ROS の重要性が証明されれば、種々の肝疾患から肝硬変・肝癌への進行を抑制しうる NOX1 をターゲットとした新たな治療薬の開発につながる可能性が期待できる。

## 3. 研究の方法

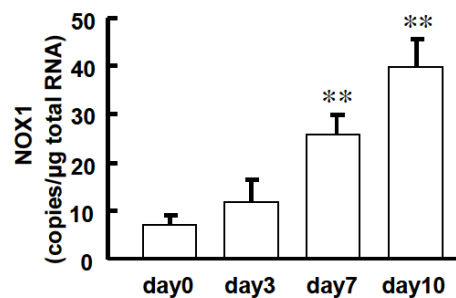
NOX1 遺伝子欠損マウス (NOX1 KO) および野生型マウス (WT) に、胆管結紮 (Bile duct ligation: BDL) により肝線維症を誘発し、その表現系を分子生物学的・病理学的手法を用いて比較・検討する。

またマウスより肝星細胞を単離培養し、その活性化および増殖における NOX1 の役割も併せて検討する。

## 4. 研究成果

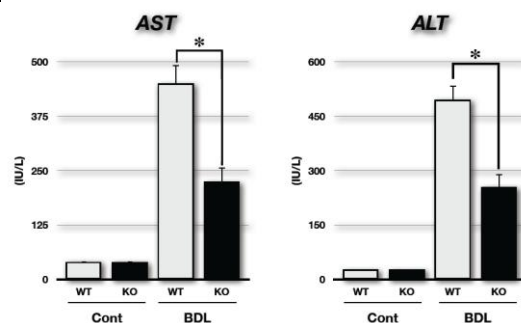
### (1) NOX1 mRNA 発現

BDL により肝線維化を誘発したマウスの肝臓組織における NOX1 mRNA 発現を検討した結果、経日的な発現上昇が認められた。



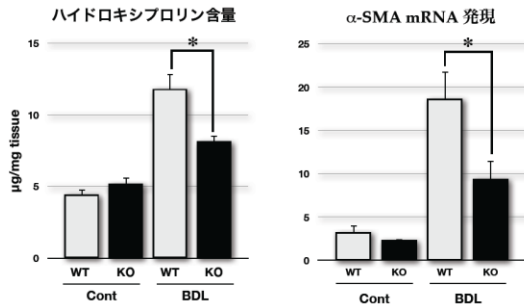
### (2) 肝組織傷害

肝障害を評価するため血清中 ALT, AST 値を測定した結果、NOX1 KO では BDL 後の肝障害が顕著に抑制されていた。



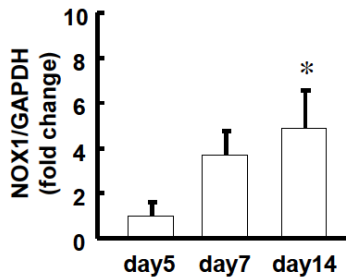
(3) 肝線維化および肝星細胞の活性化

肝臓組織の線維化をコラーゲンの構成成分であるヒドロキシプロリンの組織含量を指標に、肝星細胞の活性化をその活性化マーカーである $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の発現を指標に検討した結果、NOX1 KOではBDL後においてそれらの上昇が有意に抑制されていた。



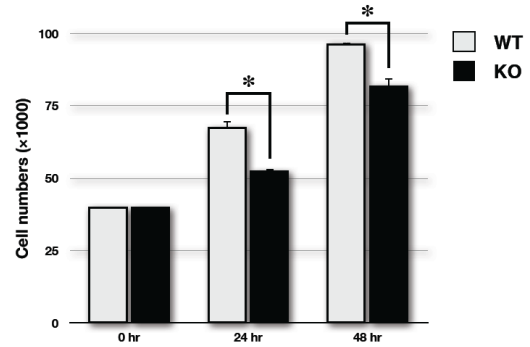
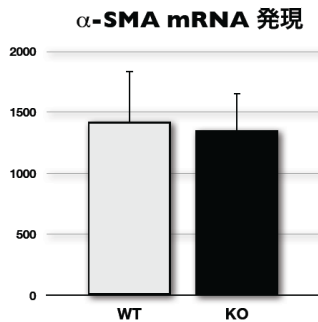
(4) HSCsの活性化およびNOX1 mRNA発現

NOX1 KOで認められたBDL後の活性化星細胞数の抑制が、どのような機序によるものかを検討するためマウスより単離したHSCsを用いHSCsの活性化・増殖におけるNOX1の役割を検討した。HSCsは培養に伴い活性化することが知られている。培養後の活性化およびNOX1の発現変化を検討した結果、HSCsの活性化に伴いNOX1 mRNAの発現上昇が認められた。



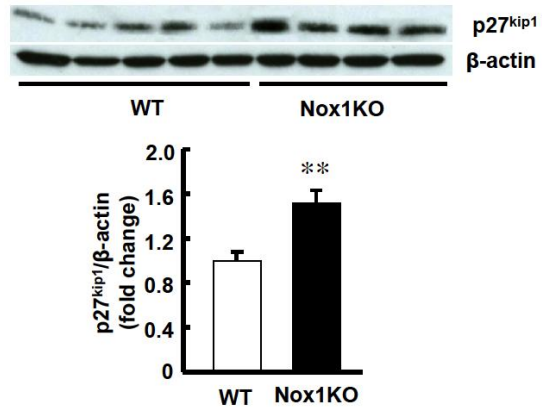
(5) HSCsの活性化および増殖

WTおよびNOX1KO由来HSCsの活性化および増殖を比較した結果、NOX1はHSCsの活性化ではなく増殖に関与していることが明らかとなった。



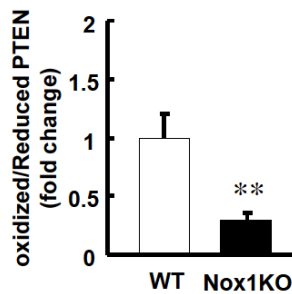
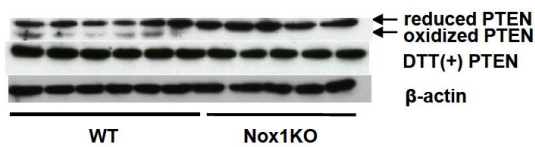
(6) p27<sup>kip1</sup>の活性化

HSCs増殖におけるNOX1の役割を解明するため、細胞周期の重要な調節因子であるp27<sup>kip1</sup>の発現量を検討した。その結果、NOX1 KO由来の細胞ではその発現が有意に上昇していることが明らかとなった。



(7) phosphatase and tensine homolog (PTEN)

代表的なホスファターゼであるPTENはPI3K/Akt経路を負に制御することによりp27<sup>kip1</sup>の発現上昇を介した細胞増殖の抑制に関与していることが知られている。また、PTENの活性は、その酸化還元状態によって制御されており、酸化により活性が抑制されることが知られている。そこで、PTENの酸化還元状態を検討してみた結果、酸化型PTENの割合がNOX1 KO由来の細胞では顕著に低下していた。



以上の結果より、NOX1由来のROSはPTENを酸化することでp27<sup>kip1</sup>の発現を抑制し、肝星細胞の増殖に促進的に作用することにより肝線維化の増悪に関与していることが明らかとなった。

#### 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6件)

1) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) oxidase NOX1 promotes proliferation of stellate cells and aggravates liver fibrosis induced by bile duct ligation. Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Matsumoto M, Zhang J, Zhu K, Katsuyama M, Torok NJ and Yabe-Nishimura C. *Hepatology* in press. 査読有

2) Physiological Roles of NOX/NADPH Oxidase, the Superoxide-generating Enzyme. Katsuyama M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. *J Clin Biochem Nutr* in press. 査読有

3) Sp3 transcription factor is crucial for transcriptional activation of the human NOX4 gene. Katsuyama M, Hirai H, Iwata K, Ibi M, Matsuno K, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C. *FEBS Journal* 278: 964-972, 2011. 査読有

4) Differential expression of NADPH oxidases in megakaryocytes and their role in polyploidy. McCrann DJ, Eliades A, Makitalo M, Matsuno K, Ravid K. *Blood* 114:1243-1249, 2009. 査読有

5) NADPH oxidase isoforms and anti-hypertensive effects of atorvastatin demonstrated in two animal models. Cui W, Matsuno K, Iwata K, Ibi M, Katsuyama M, Kakehi T, Sasaki M, Ikami K, Zhu K, Yabe-Nishimura C. *J Pharmacol Sci* 111:260-268, 2009. 査読有

6) Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Rokutan K. *Free Radic Biol Med* 47: 189-199, 2009. 査読有

[学会発表] (計2件)

1) Wenhao Cui, Kuniharu Matsuno, Chihiro Yabe. Nox1-deficiency attenuates liver injury and ensuing fibrosis in bile duct-ligated mice. 第83回日本薬理学会総会、大阪、2010.

2) Kuniharu Matsuno, Kazumi Iwata, Wenhao Cui, Chihiro Yabe-Nishimura. NOX1-derived Reactive Oxygen Species Promote Cardiomyocyte Apoptosis and Aggravate Cardiac Dysfunction in sepsis. The 10th US-Japan-Asia Dialogue on Cardiovascular Diseases and Young Investigator Competition. Tokyo, 2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松野 邦晴 (MATSUNO KUNIHARU)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：50420708

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：