

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31日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790104

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪肝炎関連バイオマーカーの探索と分子病態解析

研究課題名（英文） Biomarker discovery in non-alcoholic steatohepatitis model mice

研究代表者

角田 慎一 (TSUNODA SHIN-ICHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90357533

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は近年、メタボリックシンドロームに頻発する肝疾患として認識され、肝硬変・肝癌発症リスクが極めて高い疾患であり、患者数も急増していることが明らかとなりつつある。そのため、NASH に対する有効な診断・治療法の必要性が高まっているものの、NASH の病態形成や、NASH から肝硬変・肝癌へと進展する過程の分子メカニズムについても未だ不明な点が多く、未充足の状態にある。そこで本研究では、NASH の分子病態解明のため、NASH 様病態を呈することが明らかとなった CDAA 食摂餌マウスや、TSOD マウスの肝組織をプロテオームレベルで解析することにより、NASH 関連バイオマーカーの探索を試みた。病態モデルマウス肝臓組織発現たんぱく質の二次元ディフュージョン電気泳動（2D-DIGE）解析を行い、画像解析により発現変動タンパク質スポットを見出し、質量分析装置によって含有たんぱく質を同定した。今後これら NASH 関連タンパク質の解析を進めることにより、NASH の発症・進展の分子メカニズムの解明、有効な診断法、治療法の開発に資するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is recently recognized as a metabolic syndrome-related disease and proved to be an important risk factor for liver cirrhosis and cancer. Number of patient with NASH is rapidly increasing in economically advanced countries. Since molecular pathogenesis of NASH has not been cleared, precise diagnosis and effective therapy for NASH has not been established yet. To overcome such a situation, we searched disease-related proteins by using NASH model mice, CDAA-fed mice or TSOD mice. Proteome of liver tissues of NASH model mice and normal mice were compared by 2-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE). Proteins of differential expression were recovered from the gel and then identified by mass spectrometer. Further analysis of these proteins would lead to elucidation of molecular mechanism of development of NASH and development of promising diagnosis and therapeutic methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学・プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

昨今の食生活の欧米化も相まって、肥満に糖尿病、高血圧、高脂血症等を伴う症候群、いわゆるメタボリックシンドロームの患者が本邦でも年々増加している。メタボリックシンドロームは、より重篤な疾病を患うリスクファクターとなることから、その予防・治療等の対策は急務である。メタボリックシンドローム患者に頻発する肝疾患として、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver diseases: NAFLD) がある。NAFLD は従来、単なる脂肪肝として軽視されてきたが、近年、NAFLD に線維化等を伴って重症化した症例では、肝硬変・肝癌発症リスクが極めて高いことが明らかとなり、このような病態は、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) という新しい疾患カテゴリーとして位置づけられるようになってきた。

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に関する最近の調査によると、一般人 (健診受診者) の約 25% が脂肪性肝障害を患っており、その約半数が NAFLD である。NAFLD 患者のうちの 1 割、一般人の 100 人に 1 人が線維化を伴う肝炎、すなわち NASH の状態にあり、我が国では 100 万人もの NASH 患者がいるものと考えられている。さらに NASH 患者の 50% は、肝硬変・肝癌へと急速に進行してしまうハイリスク患者である。近年、ウイルス性肝癌が減少傾向にあるのに対し、昨今のメタボリックシンドローム患者および NAFLD 患者の急速な増加は、NASH 予備軍の加速度的増加を意味しており、NASH は今、最も克服すべき疾患の一つといえる。

NASH はメタボリックシンドローム (主に肥満) を背景とすることは明らかであるものの、NASH の発症および悪化の機序は殆ど理解されておらず、有効な治療法もない。また、診断法も侵襲的肝生検および形態学的診断に頼らざるをえず、簡便かつ的確な診断法の開発が待望されている。

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究では、NASH モデルマウス (CDAA マウス、TSOD マウス) とプロテオーム解析技術を駆使することで、NASH 病態の肝臓で発現変動しているタンパク質の探索を試みる。これにより、NASH の分子病態の解明に有用な情報を収集することを目指す。将来的に、NASH の病態に関与するタンパク質の機能の詳細を明らかに

できれば、有効な診断法や治療法の開発につながるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) NAFLD モデルマウスの作成

NASH モデルとして、CDAA マウス (choline-deficient 1-amino acid-defined diet 摂餌マウス)、および TSOD マウス (自然発症糖尿病性肥満マウス) を使用した。これらマウスは、ヒト NASH 類似の病態を呈することが明かとされている。CDAA マウスは、TSOD マウスに比べて激しい症状を呈するものの、正常マウスに 2 週間程度摂食させることによって、NASH 病態様症状を簡便に発症させることから、本研究では、CDAA マウスを中心に検討を行うこととした。CDAA マウスは、6 週齢雌の BALB/c マウス (日本 SLC) に CDAA 食 (チャールズリバー) を 1 週間摂食させ脂肪肝様症状を発症させた。TSOD マウスは (財) 動物繁殖研究所で維持されているものを用いた。これらマウスの肝組織を採取して凍結保存、あるいは病理標本とし、プロテオミクスの解析や組織学的解析に供した。組織学的解析には、常法により HE 染色およびオイルレッド染色を行った。

(2) 2D-DIGE による発現変動タンパク質の解析

マウスから採取した肝組織からタンパク質画分を得るため、可溶化 Buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 10mM Tris-HCl (pH 8.5)) 中でホモジナイズし、2D-Clean up kit (GE healthcare) にて精製回収した。各マウス肝組織タンパク質を cy3、cy5、あるいは cy2 で標識し、GE-healthcare の推奨プロトコルにて、解析用とタンパク質回収用のピック用ゲルの 2 次元電気泳動を行った。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare) を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (GE Healthcare) を使用した。

回収したゲル片に 100 μ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate/ 50% acetonitrile) を加え、10 分間脱色を行った。続いて 200 μ l の acetonitrile を加え、遠心濃縮器によって乾燥・脱水を行った。脱水したゲル片に 5 μ l の trypsin 溶液 (20 μ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、タンパク質を

ゲル内消化した。ゲル片に抽出液（1 回目は 50 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ l の 100% acetonitrile) を加えて消化ペプチドを抽出し、遠心濃縮器によって濃縮し、質量分析用のサンプルとした。各スポット由来のサンプルは ESI-Q-TOF MS (maXis, Bruker Daltonics) にてタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) NAFLD モデルマウスの作製と評価

6 週齢の BALB/c マウスにそれぞれ CDAA 食と通常食を 1 週間摂食させた後、開腹して状態観察を行ったところ、腹腔内の至る所に脂肪の沈着が認められた。また、CDAA マウスでは、肝臓の肥大が認められ、肝臓表面の色調も白く、脂肪肝様の病態を呈していた。そこで、脂肪の蓄積を詳細に検討するため、凍結組織切片のオイルレッド染色を試みた。その結果、CDAA 食を摂食させたマウスの肝臓組織では顕著な脂肪蓄積が観察され、本マウスは NAFLD となっているものと考えられた (図 1)。

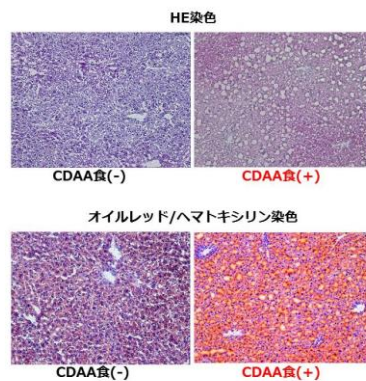


図1 CDAA マウス肝臓の組織学的解析

CDAA マウスの肝臓の凍結組織切片を HE 染色(上)およびオイルレッド染色(下)した。CDAA マウスでは、オイルレッドで染色される脂肪滴の蓄積が顕著である。

(2) 2D-DIGE による発現変動タンパク質の解析

NAFLD に関連するタンパク質を見出すため、コントロールマウスと NAFLD モデルマウスの肝試料を 2D-DIGE により解析した (図 2)。その結果、コントロールマウスに比べ、CDAA マウスの肝臓で 2 倍以上発現変動していたスポットを 15 個、2 倍以上発現減少していたスポットを 18 個みいだすことができた(図 3)。これらのタンパク質を質量分析で解析したところ、8 種類のタンパク質を同定することに成功している (data not shown)。今後は、これらタンパク質の発現を各種モデルマウスの肝臓やヒト NAFLD/NASH の肝臓で評価するとともに、NAFLD/NASH の病態との関連・機

能を解析していく予定である。本研究が NASH の分子病態の解明、並びに新規診断法・治療法の開発に資することを期待している。

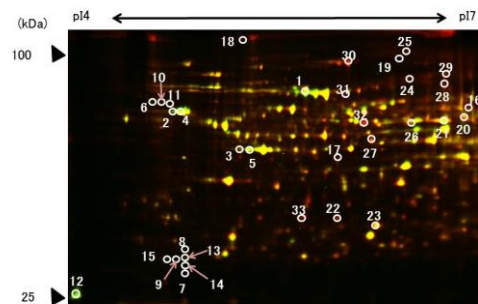


図2 CDAA マウスと正常マウスの肝臓プロテオームの比較解析 (2D-DIGE)

CDAAマウスで発現上昇

Spot No.	ratio (NAFLD/normal)	Spot No.	ratio (NAFLD/normal)	Spot No.	ratio (NAFLD/normal)
1	2.09 ↑	6	2.33 ↑	11	3.08 ↑
2	2.10 ↑	7	2.69 ↑	12	3.52 ↑
3	2.14 ↑	8	3.03 ↑	13	3.58 ↑
4	2.17 ↑	9	3.03 ↑	14	3.60 ↑
5	2.18 ↑	10	3.04 ↑	15	4.42 ↑

CDAAマウスで発現減少

Spot No.	ratio (normal/NAFLD)	Spot No.	ratio (normal/NAFLD)	Spot No.	ratio (normal/NAFLD)
16	2.00 ↓	22	2.16 ↓	28	2.95 ↓
17	2.01 ↓	23	2.32 ↓	29	3.06 ↓
18	2.04 ↓	24	2.32 ↓	30	3.29 ↓
19	2.07 ↓	25	2.40 ↓	31	3.47 ↓
20	2.09 ↓	26	2.50 ↓	32	4.22 ↓
21	2.12 ↓	27	2.86 ↓	33	4.36 ↓

図3 2D-DIGE 解析で見出した CDAA マウス肝臓で発現変動しているタンパク質スポット

2 倍以上の変動率のスポットをリストアップした。(上表) CDAA マウスで発現上昇しているタンパク質 (下表) CDAA マウスで発現低下しているタンパク質

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 3 件)

- ① Yoshida Y, Yamashita T, Nagano K, Imai S, Nabeshi H, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Abe Y, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Limited expression of reticulocalbin-1 in lymphatic endothelial cells in lung tumor but not in normal lung. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 405, 2011, 610-614. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.01.077
- ② Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related

biomarker proteins. Biomaterials, 査読有, 32, 2011, 162-169.

DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.09.030

- ③ Abe Y, Yoshikawa T, Inoue M, Nomura T, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Nabeshi H, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning. Biomaterials, 査読有, 32, 2011, 5498-5504.
DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.04.018

[学会発表] (計2件)

- ① Watanabe T., Yamashita T., Nagano K., Kanasaki S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. Proteomics-based analysis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. HUP02010 World Congress, 2010.9.20, Sydney.
- ② 角田慎一、抗体プロテオミクス技術による創薬ターゲットタンパク質の効率的探索、生物化学的測定研究会第16回学術集会、2011.6.3、大阪。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 慎一 (TSUNODA SHIN-ICHI)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・プロジェクトリーダー

研究者番号：90357533

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：