

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590959

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎における核内受容体転写共役活性化因子PDIP1の役割

研究課題名(英文)The role of nuclear receptor coactivator PDIP1 in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

佐藤 賢 (Sato, Ken)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40396619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を生じさせるために確立された食餌性NASHモデルであるMCD diet(メチオニン・コリン欠乏食)負荷によってPPAR $\gamma$  DNA-binding domain-interacting protein1 (PDIP1)ノックアウトマウスでは、血清ALTや中性脂肪が、肝組織において、肝脂肪沈着、肝組織炎症、肝線維化が有意に軽度であった。また肝組織における脂質関連遺伝子の発現が変化し、炎症性サイトカイン及び肝線維原性遺伝子の発現が野生型マウスと比較してノックアウトマウスで有意に低下しており、PDIP1ノックアウトマウスでは、脂肪肝炎が軽快することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Methionine-choline-deficient diet (MCD diet) has been established to use to make an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. In PPAR $\gamma$  DNA-binding domain-interacting protein1 (PDIP1) knockout mice, serum ALT and TG, and hepatic fatty deposition, inflammation, and fibrosis were significantly reduced compared to wild type mice. Besides, the expressions of hepatic lipid-related genes have changed and hepatic inflammatory cytokines and fibrogenic genes were significantly reduced compared to wild type mice. Thus, we showed that non-alcoholic steatohepatitis was ameliorated in PDIP1 knockout mice.

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：脂質 病理学 発現制御 遺伝子 動物

1. 研究開始当初の背景

PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor, NR1C3)とは核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質であり、転写因子としても機能する。PPAR は、転写制御のために PGC-1 (peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1)などの転写共役制御因子を要する。連携協力者の佐藤哲郎らは、ヒト PPAR 2 の DNA-binding domain からヒンジ領域の一部に結合する Clone を HeLa cell cDNA library より yeast two hybrid 法でスクリーニングし、PPAR DNA-binding domain-interacting protein1 (PDIP1)を単離同定し、ATPase domain, RNase B domain 及び DNA/RNA helicase motif を有する巨大な分子で、培養細胞系で、PPAR family (PPAR、PPAR、PPAR)のみならず他の核内レセプター (thyroid hormone receptor, retinoid X receptor) の転写活性増強作用を確認した。続いてマウス PDIP1 を cloning し、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、肺、白色脂肪、褐色脂肪などの幅広い臓器での発現を確認した。また PPAR 刺激で、濃度依存的に PDIP1 の転写活性が亢進することを確認した。(Tomaru T, Satoh T, Yoshino S, et al. Endocrinology. 2006;147:377-88.)。また佐藤哲郎らは、PDIP1 機能を解析する目的で PDIP1 ノックアウトマウス (KO マウス) を樹立した。ゲノタイプは正常に出生し、KO マウスは明らかな解剖学的異常を認めず、標準餌下で摂食量や体重増加も野生型マウス (WT マウス) と同様であった。しかし KO マウスでは、空腹時血清中性脂肪の有意な低下を認めた。さらに高脂肪食負荷を行い、脂質代謝異常の病態解析を進めた。KO マウスは、WT マウスと比べ、明らかに肥満抵抗性及び脂肪肝抵抗性を示し、良好な耐糖能を示した。高脂肪食負荷でも KO マウスは、有意な低中性脂

肪血症を呈し、白色脂肪重量と大型白色脂肪細胞数の減少を認めた。高脂肪食負荷において WT マウス肝臓 PDIP1 mRNA 発現は増加し、KO マウス肝臓では、中性脂肪合成系酵素群の発現低下に加え、脂肪酸酸化に關する遺伝子群発現の増加を認め、AMP-activated protein kinase (AMPK)活性化と脂肪酸酸化亢進を認めた。一方、KO マウスの褐色脂肪組織における適応熱産生に關する遺伝子発現、及び骨格筋における AMPK 活性化は WT マウスと差を認めなかった。また CE-TOFMS を用いたメタボローム解析による肝臓代謝産物解析を行い、AMP/ATP 比の有意な上昇と acetylCoA 及び 3-hydroxybutyric acid の有意な上昇及び定量的 RT-PCR 法にて KO マウス肝臓 PGC-1 mRNA 及び NAD+依存性 deacetylase である sirt1/PGC-1 mRNA の有意な上昇を認めた。したがって KO マウスの高脂肪食誘導性脂肪肝抵抗性が、sirt1/PGC-1 経路活性化による脂肪酸酸化亢進が關与する可能性が示唆された。以上より、PDIP1 は、高脂肪食摂取による肥満増悪性転写共役因子として機能し、メタボリック症候群の新たな治療標的になる可能性が示唆された (佐藤哲郎ら。2010年10月、日本肥満学会発表。現在論文投稿中である。)

一方で非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、肝臓におけるメタボリック症候群の表現型とされ、肝細胞への中性脂肪沈着 (脂肪肝) が起こり (1st hit)、さらに 2nd hit といわゆる肝細胞障害要因 (酸化ストレスやアディポサイトカインなど) によって形成される病態であり、病因としてインスリン抵抗性が重要であり、糖尿病との合併も多い疾患である。単なる脂肪肝と異なり、脂肪肝炎から肝線維化を介して肝硬変や肝癌を引き起こす病態であり、飽食の時代及び肝炎ウイルスによる進行性肝疾患の抗ウイルス剤による発生頻度の低下を反映し、今後肝疾患の主流と位置付けられる疾患の一つである。一方 NASH に

おける動物モデルとして食餌性に MCD diet (メチオニン・コリン欠乏食)をマウスに一定期間投与することによって NASH に類似した肝組織障害を作製することができる。

## 2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病態は未だ不明な点が多く、脂肪肝に種々の刺激が加わり発症するとされる後述の 2nd hit theory がメカニズムのモデルとして提唱されている。一方、転写共役因子は、核内受容体による転写調節機構において必須の役割を果たし、生体内エネルギー代謝調節系における metabolic switch または sensor としての機能が近年注目されている。連携研究者が単離した PPAR に結合する転写共役活性化因子 PDIP1 (PPAR DBD-interacting protein1) のノックアウトマウスが高脂肪食負荷により脂肪肝形成が著明に抑制された結果に基づき、実験的 NASH モデルを用いて、PDIP1 の NASH の病態形成における役割については、脂質代謝と肝線維化の病態の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### PDIP1 ノックアウトマウスとそのコントロールマウス (野生型マウス) の繁殖の確立

佐藤哲郎講師からご供与いただいた PDIP1KO マウスとそのコントロールマウスを繁殖させ、マウスの尾から RNA を抽出し、野生型と KO マウスのプライマーを用いて RT-PCR にてホモかヘテロか phenotype を確認し、確実に PDIP1KO マウスの繁殖を行う。

### 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデル作製

非アルコール性脂肪肝炎を生じさせるために確立された食餌性 NASH モデルである MCD diet (メチオニン・コリン欠乏食)を野生型マウスと PDIP1KO マウスに同時に投与して経時的に観察を行う。MCD diet に対するコント

ロール食を用いて2種類の食事に対する2群のマウスで計4群の比較を行う予定である。動物実験施設には毎日通い、マウスの状態や重量・餌の消費状態などを観察し、適切な環境調整を行う。

### マウス血清での評価

投与開始後 4、8、12、16、24、36 週において PDIP1KO マウスとコントロールマウスを同時に屠殺し、同時に採血して、肝逸脱酵素 (ALT、AST、ALP、 $\gamma$ -GTP など)、脂質 (LDL-cholesterol, triglyceride、インスリン抵抗性 (血糖、インスリン)、フェリチンを測定し比較検討する。個体差による実験のバラツキを減らし、再現性の確かな実験にするため、最低限各群 N=6-8 以上の個体数で行う。外れ値が出た場合には、スミルノフの棄却検定で外れ値を生かすべきかどうか検討し各群の適正な評価値を得る。

### マウス肝組織での評価

投与開始後 4、8、12、16、24、36 週において PDIP1KO マウスとそのコントロールマウスを同時に屠殺し、肝重量/全身体重比を測定する。肝組織で、PDIP1 の発現を real-time PCR で確認する。また組織標本として Hematoxylin-Eosin 染色、sirius red 染色または oil red O 染色の陽性面積計測や  $\alpha$ -smooth muscle actin 陽性細胞数のカウントで肝組織の脂肪沈着・炎症・線維化の程度を評価する。

各週数での肝組織や血清は凍結保存し、あるいは未染標本として保管し、以上の実験を反復し、各群の血清・肝組織での評価を各群個体数6-8以上で再現性が確立するまで反復する。予想される結果が得られない場合には、1) phenotype のスクリーニングミスはないか、2) 肝組織などの取り違いはないか、3) MCD diet の品質はどうか、4) 摂食状況は十分か、5) 餌の取り違いはないか、

などの検証を進める。各週における実験結果によっては、週数を変えて差が明瞭化する週数での上記血清・肝組織の検討を加える。次に非アルコール性脂肪肝炎の程度の差を引き起こすメカニズムを解明するために 1<sup>st</sup> hit 及び 2<sup>nd</sup> hit の解析を冷凍保存してある肝臓組織を用いて検討する。

即ち、1<sup>st</sup> hit である肝内中性脂肪を測定し脂肪肝の程度を比較し、肝組織標本での脂肪沈着の程度と正の相関があるかどうか確認し、1<sup>st</sup> hit での両群の差を検討する。次に 2<sup>nd</sup> Hit である酸化ストレスを評価するために、肝組織を用いて、活性酸素腫の産生系の評価として、CYP 2 E1、Acox 1、iNOS、p47phox、活性酸素腫の消去系の評価として、SOD1 や抗酸化作用を有する HO-1 の real-time PCR または Western blot を行う。炎症性サイトカインである TNF の real-time PCR、脂質過酸化物の評価として F2-isoprostane を、また組織の免疫染色を行って nitrotyrosine, 8-OhdG, 4HNE を評価する。脂質代謝を検討するために、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、SCD-1、CPT1、CYP4A10、SREBP-1 の発現を real-time PCR で検討する。線維化の程度を評価するために、上述の免疫染色の他に、肝組織を用いて TGF $\beta$ 1、Collagen 1 alpha、TIMP-1、MMP-13、PAI-1 を real-time PCR で測定し比較する。次に他の関連分子との関連を検討するために、GeneChip Expression 解析またはメタボローム解析を用いて MCD diet 負荷及びコントロール食負荷の、PDIP1K0 マウス及びコントロールマウスで様々な分子の発現の程度を評価し、他の代謝経路を含め発現の著しく亢進または低下する分子について real-time PCR や Western blot などにて検証を行い、詳細な分子間クロストークも検討する予定である。

#### 4. 研究成果

##### 1. PDIP1K0 マウスとそのコントロールマウス

##### (野生型マウス)の繁殖の確立

連携協力者の佐藤哲郎先生から供与いただいた PDIP1K0 マウスとそのコントロールマウス(野生型マウス)を繁殖させ、確実な PDIP1K0 マウスの繁殖を行い得た。

##### 2. 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデル作製

非アルコール性脂肪肝炎を生じさせるために確立された食餌性 NASH モデルである MCD diet (メチオニン・コリン欠乏食)を野生型マウスと PDIP1K0 マウスに同時に投与して経時的観察を行い、4、12 週目の解剖を行った。

##### 3. マウス血清での評価

MCD 食負荷 4 週目において血清の ALT と TG は、野生型マウスに比べて、K0 マウスで有意に減少していた。MCD 食負荷 12 週目においても血清の ALT は、野生型マウスに比べて、K0 マウスで有意に減少していた。

##### 4. マウス肝組織での評価

###### 肝脂肪沈着

MCD 食負荷 4 週目において Oil red 染色及び肝組織脂質定量において野生型マウスに比べて、K0 マウスで有意に減少していた。

###### 肝組織炎症

MCD 食負荷 12 週目において HE 染色において野生型マウスに比べて、K0 マウスで炎症細胞浸潤は有意に軽度であった。また MPO 染色でも、同様な結果であった。

###### 肝線維化

MCD 食負荷 12 週目において Sirius red 染色及び SMA 染色、また肝組織 Hydroxyproline 定量において野生型マウスに比べて、K0 マウスで肝線維化は有意に軽度であった。

##### 4. メカニズム解析

MCD 食負荷 4 週目において肝組織における PPAR などの発現が、野生型マウスに比べて、

KO マウスで、有意に亢進していた。また肝組織における炎症性サイトカインである TNF などの発現が、野生型マウスに比べて、KO マウスで有意に低下していた。また肝組織における酸化ストレスの指標である iNOS の発現が、野生型マウスに比べて、KO マウスで有意に低下していた。

MCD 食負荷 12 週目において肝組織における肝線維化の指標である COL1A1 などの発現が野生型マウスに比べて、KO マウスで有意に低下していた。また、炎症性サイトカインの指標である TNF などの発現は、やはり野生型マウスに比べて、KO マウスで有意に低下していた。肝組織における酸化ストレスの指標も野生型マウスに比べて、KO マウスで有意に低下していた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

本研究の成果でないが、関連性のある論文として 5 件を記載する。

1.Transforming growth factor- $\alpha$  activates pancreatic stellate cells and may be involved in matrix metalloproteinase-1 upregulation. Tahara H, Sato K, Yamazaki Y, Ohyama T, Horiguchi N, Hashizume H, Kakizaki S, Takagi H, Ozaki I, Arai H, Hirato J, Jesenofsky R, Masamune A, Mori M. Lab Invest. 2013 Jun;93(6):720-32.

2.Azelnidipine is a calcium blocker that attenuates liver fibrosis and may increase antioxidant defence.

Ohyama T, Sato K, Kishimoto K, Yamazaki Y, Horiguchi N, Ichikawa T, Kakizaki S, Takagi H, Izumi T, Mori M.Br J Pharmacol. 2012 Feb;165(4b):1173-87.

3.Transforming growth factor- $\alpha$  attenuates hepatic fibrosis: possible involvement of matrix metalloproteinase-1.Ohyama T, Yamazaki Y,

Sato K, Horiguchi N, Ichikawa T, Kakizaki S, Takagi H, Mori M.Liver Int. 2011 Apr;31(4):572-84.

4. A prospective study of long-term outcomes in female patients with nonalcoholic steatohepatitis using age- and body mass index-matched cohorts. Hashizume H, Sato K, Yamazaki Y, Horiguchi N, Kakizaki S, Mori M. Acta Med Okayama. 2013;67(1):45-53.

5.Hepatocyte growth factor overexpression ameliorates liver inflammation and fibrosis in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. Tojima H, Kakizaki S, Kosone T, Horiguchi N, Yamazaki Y, Sato K, Takagi H, Mori M. Hepatol Int. 2011 Aug 5.

〔学会発表〕(計 10 件)

本研究の成果でないが、関連性のある学会発表として 10 件を記載する。

国際学会発表

1. APASL2013 2014 年 3 月 ブリスベン  
Hashizume H, Sato K, et al. Comparison of Clinical Characteristics and Survival between Patients with HCC from NASH and Those from Non-B, Non-C and Non-NASH after Curative Resection for HCC.

2. APASL2013 2013 年 6 月 シンガポール  
Hashizume H, Sato K, et al. Werner syndrome and NASH.

3. DDW2013 2013 年 5 月 オランダ  
Ohyama T, Sato K, et al. Amelioration of hepatic steatosis in obese mice by MK-0626, a selective  $\alpha$ -amino amide dipeptidyl peptidase-4 inhibitor.

4. EASL 2012 年 10 月 アムステルダム  
Tahara H, Sato K, et al. Pancreatic stellate cell activation by transforming growth factor- $\alpha$  : possible involvement of matrix metalloproteinase-1 upregulation.

5. DDW2011 シカゴ

Ohyama T; Sato K, et al.

TGF- $\alpha$  Attenuates Hepatic Fibrosis:  
Possible Involvement of Matrix  
Metalloproteinase-1

国内学会発表

1. 堀口昇男、佐藤 賢、山崎勇一ら。

マウスアルコール脂肪肝炎モデルにおける  
細胞特異的なSTAT3の役割 2013年1月 ア  
ルコール医学生物学研究会学術集会

2. 大山達也、佐藤 賢、山崎勇一、堀口昇  
男ら。

臓器線維化(肝・膵を中心)研究・診療の最前線  
抗酸化作用を有するCa拮抗薬アゼルニジピン  
の肝線維化抑制効果とそのメカニズム 臨床  
応用の可能性 2012年4月 日本消化器病学  
会

3. 橋爪洋明、佐藤 賢、山崎勇一、堀口昇  
男ら。

NASH/NAFLDの病因・病態と予後 NASHの肝線維  
化進行度別予後とNASH-HCC症例の予後(共同  
演者) 2010年5月 日本肝臓学会

4. 大山達也、佐藤 賢、山崎勇一、堀口昇  
男ら。

肝線維化の病態解明と治療への展開 カルシ  
ウム拮抗薬アゼルニジピンによる肝線維化抑  
制 臨床応用への展望(共同演者) 2012年  
6月 日本肝臓学会

5. 堀口昇男、佐藤 賢、山崎勇一、ら。

MIF(マクロファージ遊走阻止因子)は高脂肪  
食による肝障害、脂質沈着  
(Steatosis)、および肝線維化を抑制する  
2012年6月 日本肝臓学会

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 賢(SATO, ken)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 40396619

(2)研究分担者

山崎勇一(YAMAZAKI, yuichi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00582404

堀口昇男(HORIGUCHI, norio)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10550022

(3)連携研究者

佐藤哲郎(SATO, tetsurou)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 40302484