

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659376

研究課題名(和文)生理的酸化ストレスに起因する肝線維化と発癌の特異的検出・評価系の構築

研究課題名(英文)Direct Contribution of Mitochondrial Oxidative Stress to Hepatic Fibrogenesis

研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI, Yutaka)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：80193548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝疾患の進展には酸化ストレスの関与が指摘されているが、活性酸素は肝細胞傷害や炎症によって発生するため、酸化ストレスが単独で肝線維化進展に与える影響を評価することは困難であった。今回、ミトコンドリア由来の活性酸素を惹起可能なマウス(Tet-mev-1)から肝細胞を分離したところ、ミトコンドリア膜電位の変化が観察された。また、Tet-mev-1マウスに対する高脂肪・高ショ糖食の給餌は肝組織におけるCCリガンドの発現を増強させたが、線維化所見は認められなかった。酸化ストレスと高脂肪食の負荷により肝組織中のKupffer細胞数は激減しており、線維化進展におけるKupffer細胞の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is considered to play a key role in the progression of chronic liver diseases. However, since production of oxidative stress may merely represent the consequences of cell damage and subsequent inflammation, it is virtually unknown whether oxidative stress is linked directly to fibrogenesis. Hepatocytes isolated from Tet-mev-1 mouse, in which mitochondrial reactive oxygen species can be induced, exhibited decreased mitochondrial membrane potential. Tet-mev-1 mice were fed high fat/high sucrose (HFHS) diet, and microarray analyses indicated that CC chemokine expression was remarkably elevated in the liver tissue. However, the number of F4/80-positive cells was substantially decreased, and there was no apparent liver fibrosis observed in Tet-mev-1 mice fed HFHS diet. These results suggested the important role of macrophages in the progression of liver fibrosis.

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：酸化ストレス 肝線維化 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国では、B型ならびにC型肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進展が大きな社会問題となっている。加えて近年では、飲酒をせず、肝炎ウイルス感染や自己免疫性疾患がない脂肪肝症例の一部で、肝実質に壊死・炎症・線維化が起こり、肝硬変や肝癌へと進行する非アルコール性脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)の患者数が増加しており、メタボリック症候群の肝臓表現型としてその対策が重要視されている。したがって、肝線維化進展の抑制とともに再生促進と発癌抑止を図ることは、基礎的・臨床的に重要な研究課題であると同時に社会的にも急務と言える。

(2) 酸化ストレスが NASH やウイルス性慢性肝炎の進展に関わることは広く認識されているが、肝細胞の壊死やアポトーシスに伴う炎症反応などの2次的影響が大きく、酸化ストレスが直接的に肝線維化を促進させるかや、その機序も不明であった。また、肝線維化進展に及ぼす酸化ストレスの影響を、直接的かつ特異的に検出・評価しうるモデル動物も存在しなかった。

2. 研究の目的

(1) コハク酸脱水素酵素 (Succinate dehydrogenase, SDHC) は、ミトコンドリアの電子伝達系を司る複合体 II の構成酵素である。変異型 SDHC 遺伝子を保持し、ミトコンドリア活性酸素をテトラサイクリン依存的に任意に惹起可能なトランスジェニックマウス(*Tet-mev-1*)を用いて、NASH two hit 仮説を検証する世界で初めての動物モデルの作出を試みた。

(2) また、この *Tet-mev-1* マウスを用いて、ミトコンドリア由来の活性酸素による肝線維化の進展機序を、他因子の2次的影響を排除した実験系で明らかにし、酸化ストレスによる肝線維化病態の形成機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 初代培養肝細胞における酸化ストレスの評価:

Tet-mev-1 マウスと対照の野生型マウスから肝細胞を分離し、初代培養上清中に異なる濃度のドキシサイクリンを添加した。ドキシサイクリンの肝細胞傷害性を MTT アッセイで評価した上で、DCFDA アッセイにより細胞内活性酸素種の産生を、また TMRM アッセイによりミトコンドリアの膜電位の変化を検討した。

(2) 初代培養肝細胞における遺伝子発現と星細胞の I 型コラーゲン遺伝子転写に対する影響:

胎生期から母体を介してドキシサイクリン含有水を自由摂取させた野生型または *Tet-mev-1* マウスから分離した肝細胞の RNA を抽出し、リアルタイム PCR により遺伝子発現の相違を定量解析した。また、I 型コラーゲンのレポーターマウス (COL1A2/LUC) 由来の星細胞と共培養し、肝細胞の酸化ストレスが星細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。

(3) 酸化ストレス誘導マウスの肝臓における遺伝子発現解析:

ドキシサイクリンを飲水投与した野生型および *Tet-mev-1* マウスに、通常食または高脂肪・高シヨ糖食を 28 週間にわたって給餌した。得られた肝組織から RNA を抽出し、マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的解析を行った上で、各群間で発現の相違が認められた遺伝子についてリアルタイム PCR を用いて定量解析した。

(4) 酸化ストレス誘導マウス肝の組織学的評価:

上記マウスの肝組織を用いて、HE ならびに Sirius red 染色を行い、肝細胞の脂肪化と炎症細胞浸潤、さらに線維化の程度を比較検討した。また、4HNE 染色により脂質酸化の評価を、F4/80 ならびに α SMA 染色により Kupffer 細胞と活性化星細胞の挙動を検討し、両群間で比較検討した。

4. 研究成果

(1) *Tet-mev-1* マウス肝細胞における酸化ストレスの誘導

MTT アッセイでは、初代培養肝細胞を 10 μ g/mL までのドキシサイクリンで 72 時間刺激しても細胞傷害性は確認されなかった。次いで、*Tet-mev-1* マウス由来の肝細胞を 1 ないし 10 μ g/mL のドキシサイクリンで刺激すると、用量依存的に DCFDA の蛍光強度が増加し、活性酸素種の産生が確認された (図 1)。

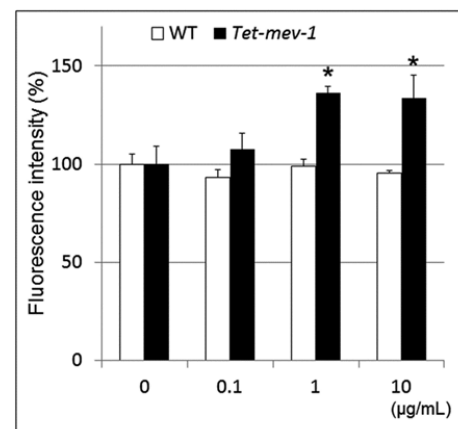


図 1. 初代培養肝細胞の DCFDA アッセイ

また、同様に用量依存的に初代培養肝細胞の TMRM 蛍光が減弱し、ミトコンドリアの膜電位の変化が認められた。

(2) ドキシサイクリンを胎生期から長期にわたって飲水投与した *Tet-mev-1* マウスから回収した肝細胞では、CCL3, CCL4, CCL8, CCL12 などの CC ケモカインの発現が、野生型マウス由来の肝細胞と比較して 20 倍ないし 400 倍と著しく増加していた (図 2)。

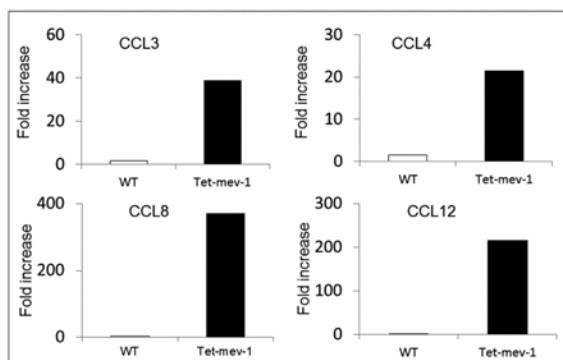


図 2 . 初代培養肝細胞における CC ケモカインの発現

これらの肝細胞と COL1A2/LUC マウス由来の星細胞とを共培養したところ、星細胞の I 型コラーゲン遺伝子のプロモーター活性は約 1.5 倍に上昇した。しかしながら、野生型マウスと *Tet-mev-1* マウスとの間に有意の差は認められず、後者において発現が著増した CC ケモカインは星細胞の活性化には直接的には関わっていないことが示唆された。

(3) *Tet-mev-1* マウスに対するドキシサイクリン投与 (酸化ストレスの誘導) と高脂肪・高シヨ糖食の給餌は、それぞれ単独では肝組織における CC ケモカインや線維化関連遺伝子の発現に明らかな影響を及ぼさなかった。しかしながら、ドキシサイクリンを胎生期から長期にわたって飲水投与された *Tet-mev-1* マウスに高脂肪・高シヨ糖食を給餌すると、初代培養肝細胞と同様に CC ケモカイン (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL12) の発現が 3 ないし 6 倍に増加した。また、TGF- β 1 や TIMP1 の遺伝子発現も相乗的に誘導した。

(4) HE 染色では、野生型マウス、*Tet-mev-1* マウスともに高脂肪・高シヨ糖食給餌により同等の脂肪化が認められた。また、4HNE 染色では、後者のマウスにおいて肝細胞に加えて非実質細胞における脂質酸化の亢進も確認された。しかしながら、Sirius red 染色では高脂肪・高シヨ糖食を給餌された *Tet-mev-1* マウスにおいても線維化所見はほとんど認められなかった。その原因を明らかにするため、肝組織の F4/80 染色を行ったところ、肝組織内の Kupffer 細胞数は脂肪肝および酸化ストレスの共存下で顕著に減少していた (図 3)。

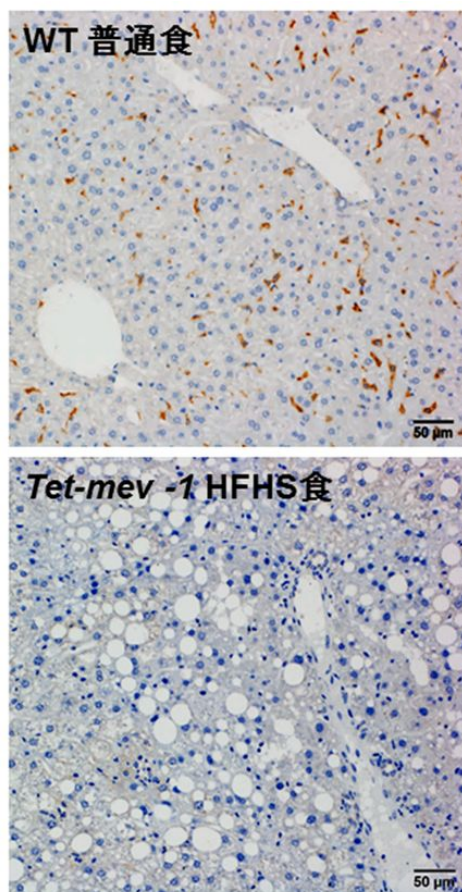


図 3 . 高脂肪・高シヨ糖食給餌を行った野生型 (上段) ならびに *Tet-mev-1* マウス (下段) 肝組織の F4/80 免疫染色

一方で、ドキシサイクリンの長期投与を行った野生型マウス、*Tet-mev-1* マウスに四塩化炭素の単回投与を行うと、両マウスにおいて同等の星細胞の活性化が認められたことから、酸化ストレスの負荷は星細胞の機能には明らかな影響を及ぼさないことが示された。

(5) 以上の実験結果より、*Tet-mev-1* マウスは臓器傷害や炎症による二次的影響を排除した条件下で、酸化ストレスが線維化進展に及ぼす影響とその機序を解明する有用な手段となりうると考えられた。また、脂肪肝と酸化ストレスによる肝線維化の進展には、Kupffer 細胞の存在が重要であることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, Hernández-Nazara Z, Rincón-Sánchez AR, Inagaki Y, Rojkind M, and Lakshman MR: Mechanisms of action of acetaldehyde in the up regulation of the human α 2(I) collagen gene in hepatic stellate cells-key roles of Ski, SMAD3, SMAD4 and SMAD7. Am J Pathol 2014 (in press) 査読有

DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.01.020
Yamaoka H, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Minakawa K, Sumida K, Saito K, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A, and Inagaki Y: A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice. *J Dermatol Sci* 2014 (in press) 査読有

DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.03.002
Okazaki I, Noro T, Tsutsui N, Yamanouchi E, Kuroda H, Nakano M, Yokomori H, and Inagaki Y: Fibrogenesis and carcinogenesis in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs). *Cancers* 2014 (in press) 査読有

Kamiya A and Inagaki Y: Stem and Progenitor Cell Systems in Liver Development and Regeneration. *Hepatol Res* 2014 (in press) 査読有

Li X, Bian Y, Takizawa Y, Hashimoto T, Ikoma T, Tanaka J, Kitamura N, Inagaki Y, Komada M, and Tanaka T. ERK-dependent downregulation of Skp2 reduces Myc activity with HGF, leading to inhibition of cell proliferation through a decrease in Id1 expression. *Molecular Cancer Res* 11: 1437-1447, 2013 査読有

DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0718

Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FHW, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, and Matsushima K: Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 183: 758-773, 2013 査読有

DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.06.005

Okazaki I and Inagaki Y: Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 12: 753-763, 2012 査読有

Inagaki Y and Higashiyama R: Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 42: 543-548, 2012 査読有

Inagaki Y, Higashiyama R, and Higashi K: Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: Molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 27: 85-88, 2012 査読有

[学会発表](計19件)

Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, and Inagaki Y:

Direct contribution of mitochondrial oxidative stress to hepatic fibrogenesis. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2013. 11. 3, Washington DC

Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, and Inagaki Y: Mitochondrial oxidative stress exacerbates inflammation and subsequent fibrogenesis in high fat diet-induced murine hepatic steatosis. 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2013.9.25, Osaka, Japan

茂呂 忠、中尾祥絵、住吉秀明、宮沢正樹、石井恭正、石井直明、稲垣 豊: ミトコンドリア由来活性酸素惹起モデルマウスを用いた酸化ストレスによる肝線維化促進機序の解明. 第45回日本結合組織学会学術大会・第60回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013年6月28日、和歌山

稲垣 豊: 線維肝の再生における骨髄と肝臓の臓器相関. 第11回日本再生医療学会総会、シンポジウム5「臓器再生の名脇役達 - 血管再生と炎症・間質組織の生理学的および病理学的役割 -」、2012年6月14日、横浜

[図書](計0件)

[産業財産権](計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/pdf/inagaki_yutaka_2014_04_01.pdf

<http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/web/matrix.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI, Yutaka)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 80193548

(2) 研究分担者

石井 直明 (ISHII, Naoaki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 60096196

(3) 連携研究者

なし