

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861197

研究課題名(和文)非ウイルス性肝炎の発症・進展におけるSIRT1遺伝子の役割と革新的治療法の探索

研究課題名(英文)SIRT1 expression, activity and NAD⁺ regulation using noncancerous liver tissue specimens from hepatocellular carcinoma patients with non-B non-C hepatitis.

研究代表者

小西 秀幸 (Konishi, Hideyuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80634211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非B非C肝炎におけるSIRT1発現の意義を検討した。非B非C肝癌非腫瘍部において、SIRT1発現は健康肝と比して高値であった。しかし、補酵素NAD量、NAMPT遺伝子発現量低下、ヒストンアセチル化亢進が認められ、SIRT1活性低下が考えられた。肝癌細胞株・肝組織において、低酸素とSIRT1発現の関連が認められた。肝癌細胞株は低酸素・高グルコースによるNAD低下状態において、CXCL10、MCP-1発現を誘導した。低グルコース培養によるNAD量の回復、SIRT1活性化剤によって、それら誘導は抑制された。非B非C肝においてSIRT1活性の回復が、新たな治療となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate SIRT1 expression, activity and NAD⁺ regulation using noncancerous liver tissue specimens from hepatocellular carcinoma patients with non-B non-C (NBNC) hepatitis. SIRT1 expression levels were higher in NBNC patients than in healthy donors, while SIRT1 histone H3K9 deacetylation activity was suppressed. In the liver of hepatitis patients, decreased NAD⁺ amounts and its regulatory enzyme NAMPT expression levels were observed, and this led to inhibition of SIRT1. SIRT1 expression was associated with HIF1 protein accumulation in both the NBNC liver and liver cancer cell lines. In HepG2 cells, hypoxia induced inflammatory chemokines. These inductions were suppressed in rich NAD⁺ condition, and by SIRT1 activator treatment. In conclusion, hepatic SIRT1 activity was repressed in NBNC patients, and normalization of NAD⁺ amounts and activation of SIRT1 could improve the inflammatory condition in the liver of NBNC hepatitis patients.

研究分野：肝炎、免疫

キーワード：NASH SIRT1 肝炎 NAD代謝

1. 研究開始当初の背景

肝炎の成因はウイルス性、アルコール性、非アルコール性など様々であるが、本邦においてはC型肝炎ウイルス(HCV)感染に由来する肝炎の割合が大部分を占めてきた。近年、公衆衛生の向上に伴いC型肝炎の新たな感染者は減少し、治療薬の発展により治療法も確立されつつあるが、肝炎症、線維化の治療は今後も研究されるべき課題である。一方で、ウイルス性肝炎の減少に従って、非ウイルス性肝炎、特に非アルコール性脂肪性肝炎が問題視される様になりつつある。非アルコール性脂肪性肝炎による発癌の詳細な機序は未だ明らかではないが、病態の特徴として肝炎症や線維化が挙げられる。肝臓の線維化は肝細胞のみならず、炎症細胞の肝臓への浸潤や肝星状細胞による膠原線維の産生など複雑な機構により引き起こされる。これまでに非アルコール性脂肪性肝炎の有効な治療薬は見出されていないが、炎症、線維化の制御は非アルコール性脂肪性肝炎治療標的の候補として大きな注目を集めており、肝炎克服に向けて行政機関を含めて、優先的に取り組むべき課題である。また、非アルコール性脂肪性肝炎に限らず肝臓においては、慢性的な炎症から成る肝細胞壊死と肝細胞の再生の繰り返しにより、肝細胞癌発癌が引き起こされると考えられており、炎症制御は肝細胞癌発生の減少に寄与する事も期待できる。長寿関連遺伝子 SIRT1 はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)依存性ヒストン脱アセチル化酵素の一つであり、ヒストンに加えて、癌抑制遺伝子 p53、炎症関連転写因子 NF- κ B、肝線維化に關与する TGF- β のシグナルを伝達する転写因子 SMAD のアセチル化を調節して機能を制御している。近年、SIRT1 遺伝子欠失マウスでは肝脂肪化が著明に進行する事、SIRT1 を活性化させる薬剤がマウスにおける肝脂肪化を抑制することが報告されており、SIRT1 が脂肪肝さらには非ウイルス性の肝炎に対する防御機構として機能している可能性が示唆されている。一方で、ヒトの細胞株を用いた研究においては SIRT1 遺伝子が炎症を亢進させることも報告されているが、ヒトにおいては脂肪肝、或いは非アルコール性脂肪性肝炎など非 B 非 C 型の肝炎における SIRT1 の機能は明らかとされていない。

2. 研究の目的

C型肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎など各種の肝炎の問題点として、肝臓の炎症が繰り返され、肝線維化、肝硬変へと進展し、肝機能が低下することが挙げられる。また、肝硬変は肝癌発症の大きな成因の一つでもある。肝炎由来発癌の病態の制御を目的として、ヒストン脱アセチル化酵素の一つである SIRT1 遺伝子の肝炎における役割の究明を行う。特に、本研究では、肝炎病態時における SIRT1 遺伝子発現の評価、並びにヒトの

肝臓における SIRT1 遺伝子の役割の究明を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

非 B 非 C 肝細胞癌非腫瘍部組織を用いて、RT-PCR 法によって SIRT1 遺伝子発現量を、免疫組織化学染色によって、SIRT1 陽性細胞の検討を、それぞれ行った。SIRT1 活性の指標として補酵素 NAD 量を ELISA 法によって、また、細胞内の NAD 量を調節する酵素である NAMPT, NMNAT1 遺伝子発現量を RT-PCR 法によって、肝組織内のヒストンアセチル化の程度を ELISA 法によって、それぞれ検討した。また臨床組織切片を用いた免疫染色、並びに肝癌細胞株 HepG2、Hep3B を用いて、Western blot 法、RT-PCR 法によって、SIRT1 発現誘導機構を、特に低酸素に焦点を置いて検討した。さらに細胞株 HepG2 において、SIRT1 の炎症性ケモカイン CXCL10、MCP-1 発現に与える影響を検討した。また、非アルコール性脂肪性肝炎モデルである STAM マウス肝組織を解析することにより、病態の進展と SIRT1、NAMPT 発現量の関連を検討した。

4. 研究成果

はじめに、ウイルス性肝炎患者と非 B 非 C 肝炎患者の臨床的背景を比較検討した結果、非 B 非 C 肝炎患者は有意に BMI が高く、また、糖尿病合併率も高く、非アルコール性脂肪性肝炎由来の発癌組織が含まれていることが考えられた。

非 B 非 C 肝癌非腫瘍部において、SIRT1 発現は健常肝、及び HCV 患者由来肝組織と比して顕著に高値であった。

最近になって、HCV 複製により SIRT1 発現が抑制されることが報告されており、本研究における HCV 肝内の SIRT1 発現低下は HCV 複製によるものである可能性が考えられる。

また脈管周囲の肝実質細胞が染色陽性であったことから、肝炎病態における主な SIRT1 発現細胞は実質細胞であることが考えられた。このため、非 B 非 C 肝において SIRT1 機能が亢進していることが予測された。

実際に SIRT1 機能を肝組織内において、肝組織内のヒストンアセチル化の程度を指標に検討したところ、アセチル化は亢進しており、つまり、発現上昇とは反対に SIRT1 活性の低下が考えられた。

この活性低下の原因を明らかとするため、SIRT1 の補酵素 NAD 量、NAMPT、NMNAT1 遺伝子発現量を検討したところ、NMNAT1 発現量については差を認めなかったが、健常肝と比して補酵素 NAD 量、NAMPT 遺伝子発現量は低下しており、SIRT1 活性が抑制されている原因の一つであることが示唆された。NAMPT 酵素は、NAM を NAD に変換する活性を有しているため、NAMPT 発現の低下により NAM の蓄積が考えられる。NAM は SIRT1 の阻害活性を有していることがよく知られている。NAD の低下

に加えて、NAM の蓄積も SIRT1 機能の抑制に寄与している可能性が考えられた。

次に、なぜ SIRT1 発現が亢進しているかを明らかとするため、in vitro において細胞株 HepG2, Hep3B 細胞を用いて評価を行った。非 B 非 C 肝炎で想定される種々の刺激を細胞株に対して加えた結果、低酸素状態が SIRT1 発現を誘導することが明らかとなった。

また、この誘導は HIF1 タンパクの上昇の後に起こっており、HIF1 との関連性が考えられた。同一組織の連続切片を用いて、免疫染色によって、肝組織内の HIF1 と SIRT1 の発現分布を比較したところ、同一の脈管周囲の実質細胞が陽性となり、低酸素と SIRT1 発現の関連は非 B 非 C 肝内においても認められた。アルコール性肝炎肝や非アルコール性肝炎肝においては、臓器内の微小環境が障害され、その結果、酸素循環が障害される可能性が示唆されている。我々の結果からも、非 B 非 C 肝は低酸素状態にあることが考えられたため、HepG2 細胞を低酸素条件下において、さらに高グルコース含有培地を用いて NAD 低下状態に誘導した結果、非 B 非 C 肝、或いは、病態マウスにおいて発現上昇が認められる炎症性ケモカイン CXCL10、MCP-1 発現を誘導した。低グルコース培養による NAD 量の回復することにより、低酸素によるケモカイン誘導が抑制された。さらに SIRT1 活性化剤の添加によって、それらケモカイン発現誘導は著しく抑制された。

SIRT1 の発現レベルの上昇とは反対に SIRT1 の活性低下が認められ、また、in vitro において SIRT1 の活性の回復が炎症性ケモカイン発現誘導を抑制することが明らかとなり、SIRT1 の活性低下が非 B 非 C 肝炎の炎症増悪に関与していることが考えられた。

また、ヒト組織での検討に加えて、非アルコール性肝炎モデルマウスであるステリックマウスモデルでの SIRT1、NAMPT 発現量を検討したが、ヒト組織での結果とは異なり、SIRT1 発現の有意な亢進は認められなかった。このことから、非 B 非 C 肝炎における SIRT1 の役割を in vivo で評価するためには、異なる病態モデルが必要であることが考えられた。

一方で、マウス組織内においても NAMPT 発現量は低下しており、病態の進展により NAD 量が低下する可能性が示唆された。

反対に、SIRT1 発現が誘導される低酸素状態において NAMPT の低下は認められておらず、SIRT1 発現の上昇と、NAMPT 発現の低下による SIRT1 活性の抑制には別の機構が働いていると考えられた。

SIRT1 発現上昇は B 型肝炎ウイルス感染患者においても認められており、B 型肝炎と非 B 非 C 肝炎における発癌機構が一部重複している可能性も考えられた。B 型肝炎における SIRT1 発現の意義も明らかとなっていない点が多く、今後の研究課題であると考えられる。非 B 非 C 肝において NAD 量の調節によって

SIRT1 の活性を回復させることが、新たな治療となる可能性が考えられた。

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 1 件)

Konishi H, Shirabe K, Nakagawara H, Harimoto N, Yamashita YI, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Oda Y, Maehara Y.

Suppression of silent information regulator 1 activity in noncancerous tissues of hepatocellular carcinoma: Possible association with non-B non-C hepatitis pathogenesis. *Cancer Sci.*, Volume 106, Issue 5, pages 542-549, May 2015, doi: 10.1111/cas.12653.

[学会発表](計 1 件)

小西秀幸

非 B 非 C 肝細胞癌発癌における SIRT1 発現の意義

JDDW2013 (2013,10,9-12,東京)

[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：
出願年月日：
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

小西秀幸 (KONISHI HIDEYUKI)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80634211

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし