

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450405

研究課題名(和文)動物の肝機能評価に有望なparaoxonaseの基礎及び臨床応用に関する研究

研究課題名(英文)Basic and clinical studies on paraoxonases of animals to evaluate hepatic functions

研究代表者

堀井 洋一郎(Horii, Yoichiro)

宮崎大学・農学部・名誉教授

研究者番号：80173623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞由来酵素活性は多くの肝臓疾患で減少する。旋毛虫感染ラットでは、初期よりPON1活性が減少を続けた。その他の酵素活性も減少した。血清中の炎症性サイトカインは寄生虫の腸管内寄生期において顕著に上昇した。抗炎症性サイトカインであるIL-4やIL-10の上昇もみられた。肝臓内では炎症性細胞の浸潤や肝細胞の変性も亢進していた。肝臓内での各酵素のmRNA発現も著しく抑制されていた。旋毛虫感染はラット肝臓で炎症を誘導し、血清中の肝細胞由来酵素活性を低下させることが明らかになった。

一方、マウスで同様の感染実験を行うと、ラットと異なり抗炎症性サイトカインが感染初期から増加し、肝臓での障害が軽減された。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte-derived serum enzyme activities were decreased in some hepatic disorders. In the *Trichinella spiralis*-infected rats, PON1 activity was decreased in the course of infection and other enzyme activity was also decreased. On the other hand, serum inflammatory cytokines were significantly increased throughout the course of infection. IL-4 and IL-10 as anti-inflammatory cytokines were also increased. In the liver tissue, infiltrations with inflammatory cells (lymphocytes, neutrophils and eosinophils) and degeneration of hepatocytes were observed. Expressions of mRNA of various enzymes derived from hepatocytes were also significantly depressed. *T. spiralis* infection in rats induced inflammatory response in the liver and then decreased serum enzyme activities which are derived from hepatocytes.

On the contrary, same parasite infection in mice induced anti-inflammatory response in the early phase of infection and resulted rather mild injuries in the liver tissues of mice.

研究分野：農学

キーワード：paraoxonase-1 *Trichinella spiralis* 肝臓 ラット マウス サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

Paraoxonase (PON) 遺伝子ファミリーは、PON1、PON2、PON3 の3つの異なるメンバーから構成されており、抗酸化機能を有している。これらの酵素は血中で抗酸化作用を通して、動脈硬化などの炎症性病変防止などに協同している。最近、PON2 や PON3 の機能の理解に興味注がれているが、最も多くの研究がなされているのが PON1 酵素についてである<sup>1)</sup>。Paraoxonase-1 (PON1) は、355 個のアミノ酸で構成される糖タンパクで、肝細胞で合成され、血液中に放出される。血中では高密度リポ蛋白 (HDL) と結合している。PON1 は多くの酵素活性を有しており、organophosphate esterase、carboxyl esterase、lactonase、phospholipase A2 等の活性が含まれる<sup>2, 3)</sup>。PON1 (mRNA) の発現はほぼ肝臓に限定されているが、PON3 は肝臓と腎臓、PON2 は動脈壁の内皮細胞、平滑筋やマクロファージなど全身の臓器・細胞に広く発現される<sup>4)</sup>。我々のこれまでの研究で寄生虫感染時の免疫応答が引き金となり、血清中 PON1 活性が著しく減少することが分かっている<sup>5, 6)</sup>。

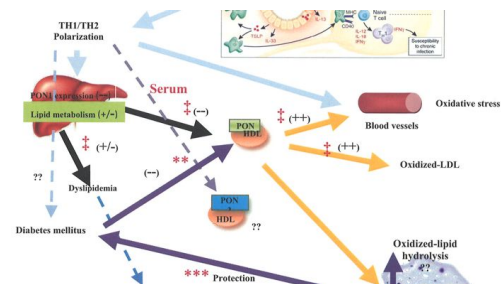
PON1 に関連する情報では、人と実験動物由来のものと比較して、獣医学領域の牛などの情報は遥かに少ない<sup>7, 8)</sup>。肝臓は血清中の PON1 の主たる産生場所なので、血清中 PON1 活性と肝機能や肝障害との間に相関があることは動物においても容易に推測される。獣医領域で現在使用されている肝障害の標準的な生化学検査は、その感度の上で不十分であり、肝生検による組織学的検査の裏付けが必要とされる例は少なくない。肉牛や乳牛で、乳頭糞線虫などの消化管内寄生線虫や、コクシジウムなどの寄生原虫が腸管内に炎症性病変を誘導することは良く知られているが、亜臨床型の寄生虫感染症であっても駆虫治療することで、増体率や乳量の増加、あるいは繁殖成績などが向上することが報告されている。これらの指標で示される、家畜の生産性と肝機能との間には相関があると推測されるが、それを鋭敏かつ正確に調べるパラメータが少ないことが、ネックになっている。そこで、高感受性を有し、低侵襲性の肝機能検査法を開発することは、寄生虫感染による栄養吸収障害やその他の影響を介した生産性の阻害をビジュアルライズすることにつながる。着目したのが血清中の PON1 活性の測定である。PON1 活性の測定自体は人医領域においては、既に注目されているところであるが、獣医領域で確立するには動物種ごとの測定法の調整や、実際の臨床例での汎用性の検討を行なう必要がある<sup>15)</sup>。既知の肝機能検査法と照合しながら、PON1 活性測定単独もしくはベストな組み合わせなどの検討も重要である。

約 75% の肝臓流入血液は腸管の静脈や脾臓からのものであり<sup>10)</sup>、肝臓は門脈血や免疫源となる物質を全身循環に流入させる前のフ

ィルターとなっており、それ故に全身の免疫器官が過剰な免疫刺激に曝されることを防いでいる。門脈血には異物の混入が多く、ジヌソイドのレジデントマクロファージである Kupffer cell とそれら異物の相互作用により Kupffer cell の活性化が誘導される<sup>11)</sup>。これらの活性化した Kupffer cell からはスーパーオキシドや tumor necrosis factor (TNF)-、interleukin (IL)-1、IL-6 など分泌され、肝臓由来の炎症性メディエーターとそれぞれのターゲット細胞上のレセプターとの相互関係で肝臓障害が発生する<sup>12, 13)</sup>。そこで、私たちはこれまでの研究を大幅に進展すべく、特に消化管免疫と肝機能との関連についての基礎的研究を進めると同時に、これまでの研究から派生した PON1 活性の測定技術を基礎にした臨床応用を強く進めることが本研究の目的である。

2. 研究の目的

(1) 図は上から、腸管寄生線虫が消化管免疫応答 (TH1/TH2) に影響を及ぼす流れを表している。この免疫応答は肝臓での PON1 遺



伝子の発現や脂質代謝にも影響を及ぼしていると考えられる。また、免疫応答によって生じる酸化ストレスにより、血清中の PON1 活性の消費による減少をもたらす、脂質酸化を促進することにつながる可能性がある。しかし、消化管での免疫応答が PON2 や PON3 の活性にどのような影響を及ぼすかはわかっていないことから、これらの研究は基礎的な部分として重要である。また、消化管で惹起される免疫応答が酸化傷害の増悪に及ぼす影響も研究する予定である。

(2) 本研究の目的は腸管寄生虫感染が誘導する異なる免疫応答が PON1、PON2、PON3 活性にどのような影響を及ぼすかとおして、どのようなメカニズムでそれらの酵素活性を阻害するかを明らかにすることである。これらの酵素は、循環血液中の細胞および血管などの組織を酸化から防ぐための中心的な役割を有しており、人においては動脈硬化等の酸化傷害を主因とする疾病の防止に働いている。これまでの我々の示した結果から次のことが推測できる。寄生虫感染が PON1 活性を低下させるという実験結果は、寄生虫感染が人の慢性感染症の代表であることや、開発途上国での人の生活環境や家畜の飼養環境を考慮すると寄生虫感染そのものは、世界規模でも酸化傷害を引き起こす様々な疾患の重要要因の1つであると言える。感染

症と PONs との関連は我々のこれまでの研究成果も含む総説<sup>14</sup> (Farid & Horii) に詳細に述べているが、寄生虫感染時の PON1、PON2、PON3 活性の変化についてはさらに詳細な検討が必要である。

(3) 獣医学領域においても肝機能は家畜の生産性に非常に重要な役割を担っていると考えられる。軽微な肝機能の低下でも家畜の健康状態や繁殖能力の低下に結びつく可能性がある。したがって、高感度で特異性の高い肝機能検査の新たな指標を見いだすことは獣医臨床に非常に重要である。PON1 は主として肝臓で合成され、血中に放出されることから、PON1 の測定法を確立し、肝機能を非侵襲的に診断することができれば、家畜の肝疾患や肝機能の低下を早期にモニタリングする上で大きな貢献が期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) 寄生虫感染時の PON1、PON2、PON3 活性の変化：ラットおよびマウスを実験動物として使用する。 *Nippostrongylus brasiliensis* 4000L3 または *Trichinella spiralis* 3000L1 を感染させる。肝臓組織を経時的に採取し、PON1、PON2、PON3 の mRNA 発現を確認する。同時に炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカインの mRNA 発現も調べる。また肝臓の病理組織学的検索ならびに免疫組織化学的検索を行ない、クッパー細胞を始め肝臓内の炎症反応を確認する。経時的な採血により、TH1/TH2 サイトカインの測定をマルチプルサイトカインアッセイ法にて行なう。血清中の酸化傷害のパラメータと脂質の酸化を測定する。

(2) 寄生虫感染による PON1、PON2、PON3 の変化が脂質の酸化や動脈硬化に及ぼす影響：*Trichinella spiralis* L1 を感染させる。感染後5週目に動脈と肝臓を採取し、病理組織学的に検索する。血液中(血清)の酸化傷害のパラメータと脂質の酸化を測定する。動脈硬化の程度を寄生虫感染群と対照群間で比較する。以下の腹腔内マクロファージの酸化の指標を調べる。過酸化脂質、グルタチオン、酸化 LDL、酸化 LDL のアップテイク、過酸化水素産生能など。動脈硬化発症マウスと非発症マウスでの寄生虫感染に対する免疫応答の比較、特に IL10 の産生能や、Th17 の誘導能などに差があるかは組織傷害性に重大な関連があると考えている。

(3) 家畜の肝機能の測定における PON1 の有用性の検討：飼養環境や感染症あるいは代謝生疾患の異なるウシから血清サンプルを採取する。例えば、消化管寄生線虫症、コクシジウム症、細菌感染症、乳熱、ケトージス、肥満症、第4胃変異など。PON1、レシチン、コレステロール、アシルトランスフェラーゼ(LCAT)、AST、GGT、血清総タンパク、アルブミン、総コレステロール、遊離コレステロール、BHBA、NEFA、トリグリセリド、電解質、ミネラルを測定する。肝組織を採取

し、組織検査を行なう。各疾病と PON1 活性とを統計的に解析し、感度と特異性の点からパラメータとして利用できる範囲を特定し、診断としての応用可能範囲を確認する

### 4. 研究成果

(1) ラット腸管および筋肉内から回収された虫体数の計数による旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) 感染状況のモニタリング：オスのウィスターラットに旋毛虫幼虫(L1)を2500匹経口感染させ、腸管寄生期の虫体数をカウントすると4~7日目に減少し始め、2~3週目には大幅に減少し、5週目には完全に排除された。一方、筋肉内幼虫は、消化法により回収したが、感染2週目から検出でき、3週目、5週目と増加し、その後9週目まで平衡を保った。感染の経過に沿って体重の減少がみられ、4日目から7日目までは有意な減少が見られた。

(2) 血清中の酵素活性：旋毛虫感染ラットと非感染対照ラットとの間で、paraoxon を基質とした PON1 の酵素活性を比較した。感染群では、感染2日、2日、7日、2週、3週、5週、7週にそれぞれ、23、32、56、47、40、46、22%と対照群に比して有意な活性の減少を示した。ラクトナーゼ活性においても同様の経過において、17、29、54、42、33、40、17%の減少を示した。アリルエステラーゼ活性は7週目を除いて、8、18、44、25、19、25%の減少を示した。もう一つの肝臓で合成される酵素であるブチルコリンエステラーゼの活性は、4日、7日、2週目にそれぞれ20、27、28%減少した。

(3) 肝臓における PON1、ブチルコリンエステラーゼ、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、MIP-1、TGF- $\beta$ 1、IL-4、IL-10 の mRNA 発現量の感染経過による変動：ラットにおける旋毛虫感染による標記のパラメータの変動を対照ラットと比較して算定した。PON1 の mRNA 発現レベルは感染4日目に1.5倍減少し、7日、2週目には5倍程度まで減少したが、その後有意差は認められなかった。ブチルコリンエステラーゼの mRNA 発現量は2日、4日、7日目にそれぞれ1.8、2.2、2.8倍と有意に減少した。IL-1 mRNA は7日目に一過性に上昇(8倍)した。IL-6 mRNA は4日、7日にそれぞれ40、38倍と急激な上昇を示した。TNF- $\alpha$  mRNA は7日目に6倍、MCP-1 mRNA は4日、7日、2週目にそれぞれ7、9、9倍、MIP-1 mRNA は4日、7日目にそれぞれ2.5、11倍といずれも上昇を示した。同じく、TGF- $\beta$ 1 mRNA も2日、4日、7日、2週目に2、2.2、3、2.8倍と上昇を示した。IL-4 mRNA は4日、7日、2週目にそれぞれ4、382、2.5倍の上昇を示した。IL-10 mRNA は7週目に発現量が上昇し、9週目には減少に転じた。

(4) 肝臓の病理組織学的所見：旋毛虫感染ラット肝機能や肝臓内での免疫応答と血清中の PON1 やブチルコリンエステラーゼの関連を調べるため、肝組織を定法通り処理し、

HE および Congo red 染色にて鏡検した。感染後の肝組織には、2日、4日、7日、2週、3週、5週目にリンパ球、好中球、好酸球などの炎症細胞の浸潤がみられ、とりわけ肝門脈血管周囲には顕著であった。肝細胞は、5週目には核濃縮が、7週目には液化変性が見られたが、9週目にはそれらは正常化した。肝臓内の血管周囲には、2日、4日、7日、2週目にアミロイドの沈着が顕著に認められた。また、4日、7日、2週、3週目には肝細胞のアポトーシスも見られた。

(5) マウスにおける旋毛虫感染と免疫応答: 消化管寄生線虫の感染では Th2 タイプの T 細胞から分泌されるサイトカインによる免疫応答を誘導することが知られている。旋毛虫感染では、宿主の種類によって免疫応答が異なることが報告されている。そこで、ラットの代わりにマウスに旋毛虫を感染させ、PON1 活性やサイトカインの変動を通してマウスの免疫応答を調べた。その結果、ラットとは異なる PON1 の変化が見られ、それらの変化には様々なサイトカイン (IL-2、IL-4、IL-10、IL-12(p70)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子) の上昇を伴った。一方、IL-5 インターフェロンは感染期間を通して上昇した。また、マウスでの旋毛虫感染では、肝組織での炎症性細胞の浸潤が少なかった。

< 引用文献 >

**(ボールドは代表者らの研究成果)**

- 1) Precourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E: The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis* 2011, 214(1):20-36.
- 2) Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN: Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005, 46(6):1239-1247.
- 3) Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE: Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003, 54:371-392.
- 4) Seo D, Goldschmidt-Clermont P: The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2009, 11(3):182-187.
- 5) Farid AS, Mido S, Linh BK, Hayashi T & Horii Y (2010): An atherogenic lipid profile with low serum paraoxonase-1 activity during nematode infection in rat. *Eur J Clin Invest*, 40: 984-993.
- 6) Mido S, Fath EM, Farid AS, Nonaka N, Oku Y & Horii Y (2012): *Trichinella spiralis*: Infection changes serum paraoxonase-1 levels, lipid profile, and oxidative status in rats. *Exp Parasitol*, 131: 190-194.
- 7) Turk R, Juretic D, Geres D, Svetina A, Turk N,

Flegar-Mestric Z: Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2008, 108(1-2):98-106.

8) Miyamoto T, Takahashi Y, Oohashi T, Sato K, Oikawa S: Bovine paraoxonase 1 activities in serum and distribution in lipoproteins. *J Vet Med Sci* 2005, 67(3):243-248.

9) Bobe G, Young JW, Beitz DC: Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *J Dairy Sci* 2004, 87(10):3105-3124.

10) Ansell J, Widrich W, Johnson W, Fine J: Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 1977, 73(5):1190.

11) Racanelli V, Rehmann B: The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2006, 43(2 Suppl 1):S54-62.

12) Wheeler MD: Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003, 27(4):300-306.

13) Dobrovolskaia MA, Vogel SN: Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2002, 4(9):903-914.

14) Farid AS, Horii Y: Modulation of paraoxonases during infectious diseases and its potential impact on atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 2012, 23(11):92.

15) Farid AS, Honkawa K, Fath EM, Nonaka N, Horii Y: Serum paraoxonase-1 as biomarker for improved diagnosis of fatty liver in dairy cows. *BMC Vet Res* 2013, 9:73.

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)

- 1) Farid AS, Fath EM, Mido S, Nonaka N, Horii Y: Paraoxonase-1 activity is related to *Trichinella spiralis* induced hepatitis in rats. *Eur J Clin Invest*, 査読有, 2017, 47:250-261.  
DOI: 10.1111/eci.12731

[学会発表](計 0件)

[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  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

堀井 洋一郎 (HORII, Yoichiro)  
宮崎大学・農学部・名誉教授  
研究者番号：80173623

##### (2)研究分担者

野中 成晃 (NONAKA, Nariaki)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：50281853

##### (3)連携研究者

桐野 有美 (KIRINO, Yumi)  
宮崎大学・農学部・助教  
研究者番号：70630523

北原 豪 (KITAHARA, Go)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号：90523415

##### (4)研究協力者

( なし )