

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460989

研究課題名(和文) PARK7 の非アルコール性脂肪肝炎における役割と診断的応用

研究課題名(英文) Role of PARK7 in nonalcoholic steatohepatitis and its application for diagnosis

研究代表者

高村 昌昭 (Takamura, Masaaki)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20422602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)におけるPARK7の役割やバイオマーカーとしての有用性の検討を行った。PARK7の発現は、正常肝では肝細胞の細胞質にその局在がみられるのに対し、NASHになると肝細胞の核に局在が変化し、NASHで有意に上昇を認めた($p<0.001$)。NASHにおける肝細胞核内発現は、炎症の程度の進行に伴い有意な上昇を認めた($p=0.018$)。一方、ELISAでの血清PARK7測定値はNASHで有意に低下した($p<0.001$)。NASHにおける肝細胞核内発現は本疾患の病態に関与している可能性が、血清PARK7測定はNASH診断の有用なマーカーになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of PARK7 in nonalcoholic steatohepatitis (NASH). PARK7 immunoreactivity was present mainly in the hepatocyte nucleus in patients with NAFLD. There was a stepwise increase in the percentage of hepatocyte nuclei positive for PARK7 from control to NAFL to NASH ($p<0.001$). Also, the grade of inflammation correlated positively with the percentage of hepatocyte nuclei positive for PARK7 ($p=0.018$). Conversely, there was a stepwise decrement in serum PARK7 levels from control to NAFL to NASH ($p<0.001$). Expression and nuclear accumulation of PARK7 may partly contribute to the pathogenesis of NASH. The level of PARK7 in serum may be a promising biomarker for NASH.

研究分野：消化器内科学

キーワード：PARK7 NASH NAFLD

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の重症型で、NAFLD の約 10% (約 100-200 万人) 存在すると推定されている。NASH は炎症の持続から線維化が惹起され、肝硬変、肝細胞癌まで進展しうる病態である。肥満人口の増加とともに、今後 NASH 由来の肝硬変・肝細胞癌が増加することが予想されている。現在、NASH の診断および進行度の評価には、肝生検による組織学的診断が必須であるが、出血などの合併症やサンプリングエラー等の問題がある。また NASH の病態もいまだ不明な点が多く、新たな治療・診断法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究は、NASH の発症・診断に関与する候補タンパク質の探索を目的に NASH モデルマウスの肝組織を用いてプロテオーム解析を行った。候補タンパク質の中から、NASH モデルマウスの肝組織で発現が上昇する PARK7 に着目した。PARK7 の発現および局在に関してヒトでの少数例の検討を行った。興味深いことに、正常肝では細胞質のみに弱陽性、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) では細胞質およびごく一部の核に弱陽性、NASH では核優位に強陽性となり、発現と局在がダイナミックに変化することが判明した。本研究は、NASH の病態における役割やバイオマーカーとしての有用性の検討が目的である。

3. 研究の方法

- (1) 研究対象とする症例の選定、肝組織と血清の採取、臨床病理学的データのまとめ
より多くの症例での解析を行うために、症例の集積は年度を通して継続して行った。症例は当科および当科関連施設だけでなく、本学消化器外科とも連携し集積した。なお症例からの生体試料 (手術・生検材料、末梢血) の採取の際は、生命倫理・安全対策等に関する留意事項

に十分配慮し、研究の目的、副作用の有無、提供者が受ける不利益の有無、プライバシー保護等に関する十分なインフォームドコンセントを行った後、文書による同意を得た。NASH の重症度は Brunt 分類を用いた。NASH の炎症や線維化の評価に迷った場合は、本学第一病理学教室に協力を依頼し分類を進めた (新潟大学医学部倫理委員会 承認番号 1699)。

- (2) ヒト正常肝・NAFL・NASH 症例肝組織を用いた、PARK7 および関連分子の発現・局在と臨床病理学的意義の検討

PARK7 の発現や局在を、免疫染色法にて解析した。PARK7 免疫染色評価は肝細胞を最低 1000 個計数し、染色された核の割合を PARK7 labeling index [PARK7 LI(%)] として求めた。結果は臨床病理学的因子との関連を検討した。

- (3) ヒト正常肝・NAFL・NASH 症例血清中 PARK7 を検出する ELISA の構築と測定値の臨床病理学的意義の検討

PARK7 に対するエピトープの異なる 2 種類のマウスモノクローナル抗体作製を行い、ELISA の構築をする。条件検討は PARK7 発現培養細胞株 (MDA-MB-231) の培養上清を用いて行う。血清 PARK7 測定値は、臨床病理学的因子との関連を検討する。

4. 研究成果

- (1) 症例の選定、肝組織と血清の採取、臨床データのまとめ

計画当初、症例数の確保が困難と予想された正常肝および NAFL 症例の組織と血清の採取は、年度を通して継続することにより症例数の確保ができた。また血液生化学検査を含む臨床データの集積を進め、以下の解析に利用した。

(2) ヒト正常肝・NAFL・NASH 症例肝組織を用いた、PARK7 および関連分子の発現・局在と臨床病理学的意義の検討

正常肝では細胞質のみに弱陽性、NAFLでは細胞質およびごく一部の核に弱陽性、NASH では核優位に強陽性となり(図1)、発現と局在がダイナミックに変化することが判明した。PARK7 LI(%)の中央値はコントロール0、NAFL 4.3、NASH 38.3と NASH で有意に上昇した ($P < 0.001$)。PARK7 LI は Brunt 分類の grading の進行に伴い有意な上昇を認めた ($P = 0.018$)。多変量解析により、PARK7 LI が NASH の独立した予測因子として抽出された。また ROC 解析により NAFL と NASH を判別する AUC は 0.969 で、同定された PARK7 LI のカットオフ値(20%)から PARK7 LI の感度/特異度は 88.3%/91.7%であった(図2)。

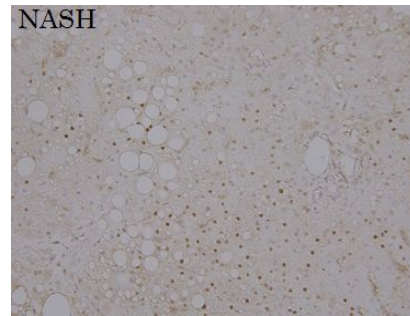
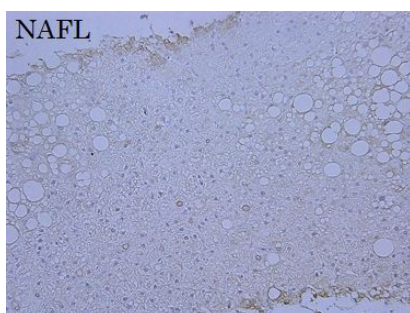
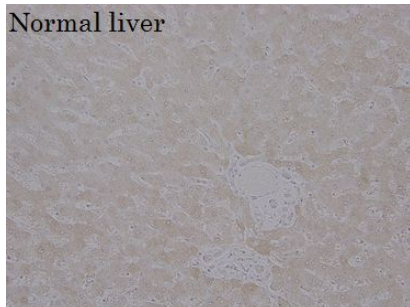


図1. 正常肝、NAFL、NASH における PARK7 の発現

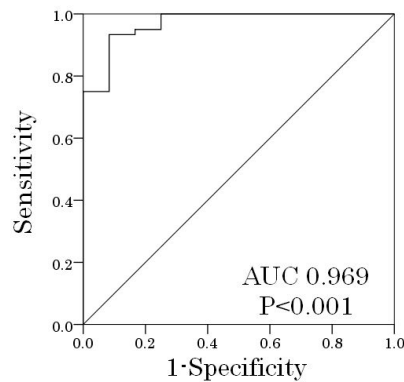


図2. PARK7 LI の ROC 曲線(NAFL と NASH の識別能)

(3) ヒト正常肝・NAFL・NASH 症例血清中 PARK7 を検出する ELISA の構築と測定値の臨床病理学的意義の検討

ELISA の構築を行い条件検討を行ったが、安定した結果が得られなかったため、市販の ELISA による検討に変更した。健常人 16 例、NAFL 7 例、NASH 31 例における血清 PARK7 値 (ng/ml) の中央値は、健常人 13.9、NAFL 12.7、NASH 3.6 と NASH で有意に低下した ($P < 0.001$)(図3)。また、Brunt 分類の grading/staging の進行に伴い有意な変化を認めなかった。ROC 解析により NAFL と NASH を判別する AUC は 0.751 で、同定された PARK7 LI のカットオフ値(6.98mg/ml)から PARK7 LI の感度/特異度は 71.4%/74.2%であった (図4)。

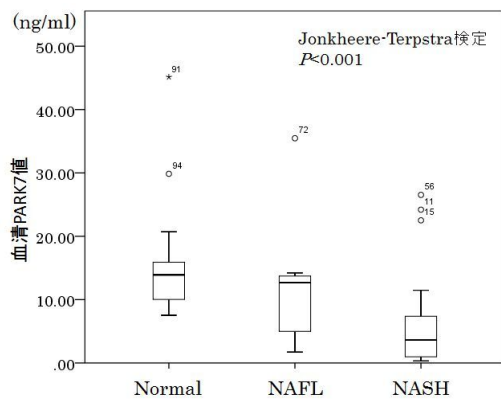


図 3. 正常肝、NAFL、NASH 症例における血清 PARK7 値

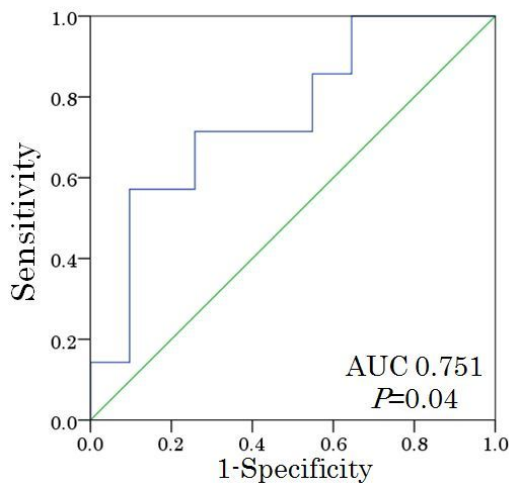


図 4. 血清 PARK7 値の ROC 曲線 (NAFL と NASH の識別能)

(4) 考察と今後の展望

本研究は、NASH マウスモデル肝組織のプロテオミクス解析より得られた PARK7 のヒト NASH における役割とその臨床的意義を見出すことを目的とした。park7 は新規癌遺伝子として初めて報告され (Nagakubo et al. BBRC 1997)、その後家族性パーキンソン病の原因遺伝子として同定された (Bonifati et al. Science 2003)。抗酸化ストレス機能・転写調節機能・ミトコンドリア調節機能をはじめとする多機能タンパク質であり、これまでに NASH における報告はない (Ariga et al. Oxid Med Cell Longev 2013)。本研究は NASH における PARK7 の核内発現に注目し、PARK7 LI を定義し、NASH の活動度を反映する組織学的バイ

オマーカーとして有用である可能性を見出した。今後 NASH における PARK7 の発現ダイナミズムがなぜ起こるのか、分子生物学的アプローチで明らかにしていきたい。

PARK7 は血中にも分泌されることが報告されていることから、ELISA での測定を検討した。血清 PARK7 濃度測定により、炎症や線維化の程度 (重症度) との関連はみられなかったが、NAFL と NASH を鑑別する血清バイオマーカーとして有用であることが示唆された。本検討は、組織学的裏付けのある NAFL の症例数が十分でなかったこともあるため、今後症例数を増やし検討を継続することが必要であると考えられた。

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2件)

Yamagiwa S, Ishikawa T, Waguri N, Sugitani S, Kamimura K, Tsuchiya A, Takamura M, Kawai H, Terai S. Increase of soluble programmed cell death ligand 1 in patients with chronic hepatitis C. Int J Med Sci. (査読有) 2017, 14(5):403-411. DOI: 10.7150/ijms.18784

Kanefuji T, Takano T, Suda T, Akazawa K, Yokoo T, Kamimura H, Kamimura K, Tsuchiya A, Takamura M, Kawai H, Yamagiwa S, Aoyama H, Nomoto M, Terai S. Factors predicting aggressiveness of non-hypervascular hepatic nodules detected on hepatobiliary phase of gadolinium ethoxybenzyl diethylene-triamine-pentaacetic-acid

d magnetic resonance imaging. World J
GAstroenterol. (査読有)2015,
21(15):4583-91. DOI:
10.3748/wjg.v21.i15.4583

〔学会発表〕(計4件)

高村昌昭、山際訓、他. NASHモデルマウスの病初期における肝組織のプロテオーム解析. 第37回日本肥満学会. 2016年10月8日. 東京ファッションタウン(東京都江東区)

Takamura M, Yamagiwa S, et al. DJ-1 labeling index is a novel diagnostic biomarker for predicting progression of nonalcoholic steatohepatitis. 2015年11月13日. Moscone West Convention Center (California, USA)

高村昌昭、山際訓、他. NASHにおけるDJ-1発現および血清DJ-1濃度測定の有用性とその意義. 第2回肝臓と糖尿病・代謝研究会. 2015年5月23日. シーモールパレス(山口県下関市)

高村昌昭、山際訓、他. 非アルコール性脂肪肝炎におけるDJ-1核内発現および血清DJ-1濃度測定の有用性. 第51回日本肝臓学会総会. 2015年5月21日. 同仁堂(熊本県熊本市)

〔その他〕

新潟大学医歯学総合研究科 消化器内科学
分野ホームページ:
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/in3/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高村 昌昭 (TAKAMURA, Masaaki)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 20422602

(2)研究分担者

山際 訓 (YAMAGIWA, Satoshi)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 10419327