

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461011

研究課題名(和文) AGE-RAGE系とレニン・アンギオテンシン系を介したNASH肝線維化メカニズム

研究課題名(英文) The mechanisms for the progression of hepatic fibrosis through AGE-RAGE system and renin-angiotensin system

研究代表者

廣瀬 享 (HIROSE, Akira)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：30457395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：終末糖化産物(AGE)およびその受容体RAGEからのシグナル伝達は、NASH発症病態に極めて重要な活性酸素種(ROS)の産生に強く関わっている。本研究ではRASとRAGE-AGE系を介したNASHの線維化進展の制御について検討を行った。RASによるRAGE発現調整はPKC- $\alpha$  およびPKC- $\beta$  リン酸化を介し、TNF- $\alpha$  およびROSの発現を介してNASH発症に関わっている。さらに、RAGEノックアウトマウスを用いたNASH発症実験では、炎症、線維化が明らかに抑制されており、NASHにおける肝線維化進展においてAGE-RAGE系を介したメカニズムが重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The signal transduction from advanced glycation end-products (AGE) and the receptor for AGE (RAGE) involved the production of reactive oxygen species (ROS) which were important for the pathogenesis of NASH. Therefore, we investigated the control mechanisms of the hepatic fibrosis through RAS and RAGE-AGE system. It was clarified that the regulation of the expression of RAGE by RAS was depended on the regulation of phosphorylation of PKC- $\alpha$  and PKC- $\beta$ . The expression of RAGE in liver were regulated by the expression of TNF- $\alpha$  and ROS in NASH. Furthermore, hepatic inflammation and fibrosis were remarkably attenuated without decreased hepatic steatosis in NASH of RAGE knockout mice. Taken together, AGE-RAGE system are important for the development of hepatic fibrosis in the pathogenesis of NASH.

研究分野：NASH

キーワード：NASH レニン-アンギオテンシン系 終末糖化産物(AGE) RAGE 肝線維化

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病因・病態は未だ不明な点が多く、治療法についても確立したものがないのが現状である。これまで我々は、AT1 受容体阻害剤 (ARB) による NASH 肝線維化抑制作用を報告し (Hepatology. 2007 ;45 (6) :1375-81)、NASH の肝線維化進展に RAS が深く関わっていることを明らかにした。その後、多くの施設から同様の報告があるものの、RAS による肝線維化進展の詳細なメカニズムは未だに明らかになっていない。

AGE は、生体内においてグルコースあるいはその代謝中間体や分解物とタンパク質の総称であり、おもに糖尿病血管合併症、神経変性疾患、悪性黒色腫などの病態に関与する因子として重要であることが明らかとなっている。AGE の中でも生体内で特に生理活性を有するアルデヒド由来の Glycer-AGE は NASH の病態に深く関与することが報告されている。NASH 患者の血清中 Glycer-AGE は、正常対象者のみならず単純性脂肪肝患者と比べて明らかに高値であることが知られており、HOMA-IR を指標としたインスリン抵抗性と正の相関を示し、アディポネクチンとは負の相関を示すことの特徴も報告されている。Glycer-AGE は活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の産生にも深く関わっていることも示されており、NASH の病態に重要な影響を与えている。肝細胞や肝星細胞には AGE のレセプターである RAGE が発現していることが報告されており、肝臓内での AGE による ROS 産生には RAGE を介した作用が重要であることが明らかとなっている。

AGE-RAGE 系には、PKC- $\delta$  リン酸化抑制作用を介した ROS の産生低下および TGF- $\beta$ 1 産生低下シグナル伝達作用があることが報告されており、血管細胞の RAGE 発現は RAS 阻害によって抑制され、RAGE 刺激系は RAS と密接な関連を有している。しかし、ARB がどのような機序で RAGE 発現を抑制するのか？ ARB による作用機序と PKC- $\delta$  や PKC- $\beta$  リン酸化抑制作用との関連はどうか？ など不明な点が多い。

また、RAGE 活性化による NASH 発症や病状進展に及ぼす影響についても明らかになっていないため、今回の研究では AGE-RAGE 系を介した RAS による NASH の病態への関与を明らかにすることが目的である。

### 2. 研究の目的

ARB は RAGE 発現抑制作用と PKC- $\delta$  および PKC- $\beta$  リン酸化抑制作用を持つことが明らかになっているが、PKC- $\delta$  や PKC- $\beta$  が RAGE 発現に影響を与えているのか、それとも、PKC- $\delta$  や PKC- $\beta$  が RAGE のシグナル伝達因子

の一つなのかは明らかになっていない。さらに、糖尿病性腎症においては、AGE-RAGE 系における ERK および Smad3, 4 の関与の重要性が指摘されているが、肝の線維化進展においてはこの系はまだ明らかになっていない。そこで、肝の線維化進展においても同様の機序が働いていることが想定されるため、本研究期間内に PKC- $\delta$  や PKC- $\beta$ 、ERK および Smad3, 4 を含めた AGE-RAGE 系および RAS のシグナル伝達の解明を行うことが本研究の目的である。

さらに、NASH 肝では RAGE の発現が亢進しており、AGE-RAGE 系の活性化が肝線維化進展に重要な役割を果たしていることが想定されているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。このため、肝線維化進展 NASH モデルマウスおよび、既に手に入れている RAGE ノックアウトマウスを用いることで、AGE-RAGE 系の NASH の病状進展における役割について明らかにすることが目的である。RAGE ノックアウトマウスで想定される肝線維化抑制状態 NASH において、PKC- $\delta$  や PKC- $\beta$ 、ERK および Smad3, 4 などの線維化活性化関連因子がどのような働きをしているのか明らかにするとともに、RAS から AGE-RAGE 系を介した ROS 産生および肝線維化進展へのシグナル伝達路の詳細な解明も行うことが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

これまで、NASH の肝線維化進展に RAS が深く関わっていることを報告してきたが、その詳細なメカニズムは充分には明らかにされていない。NASH 患者の血清中 Glycer-AGE は、正常対象者のみならず単純性脂肪肝患者と比べて明らかに高値であることが知られており、NASH の病状進展に AGE-RAGE 系が重要な役割を果たしている事が明らかとなっている。

糖尿病性腎症においては、AGE-RAGE 系における ERK および Smad3, 4 の関与の重要性が指摘されていることから、NASH の肝線維化進展にも同様のメカニズムが働いている可能性が高いと想定されるため、NASH 肝において ERK および Smad3, 4 の活性化状態の検討および、ARB を用いた肝線維化抑制による ERK および Smad3, 4 の活性化抑制の状態を検討する。angiotensin II を持続投与し RAS を活性化することにより NASH 肝の線維化は増悪を来することが明らかとなっているが、osmotic pump をマウス皮下に埋め、そこからの持続的な angiotensin II にて RAS の活性化を来すことで、ERK および Smad3, 4 の活性化、および PKC- $\delta$ 、PKC- $\beta$  のリン酸化が惹起されるかどうかを検討する。

NASH 肝では RAGE の発現が亢進しており、AGE-RAGE 系の活性化が肝線維化進展に重要な役割を果たすとともに、ARB により抑制されることが明らかとなっている。このことから、ARB による NASH 肝の線維化抑制作用は AGE-RAGE 系を介した作用であると考えられるため、RAGE KO を用いて肝線維化抑制実験を行った。その結果、予想通りに NASH の肝線維化が抑制されることが明らかになった。このため、本研究ではその肝線維化抑制作用において、PKC- $\delta$  や PKC- $\beta$ 、ERK および Smad3, 4 などの線維化活性化関連因子の発現状態を検討するとともに、ARB 投与による NASH 線維化抑制を行った個体と比較検討を行うことで、シグナル伝達路の詳細な解明を行う。現時点では RAS から AGE-RAGE 系を介した ROS 産生および肝線維化進展へのシグナル伝達路が拮定されるため、詳細について解明を行う。

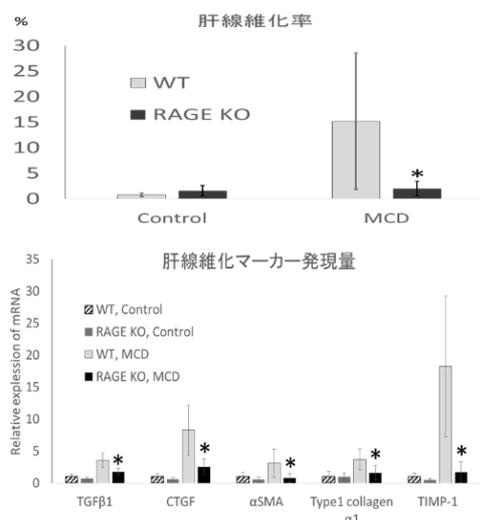
NASH 肝線維化進展および抑制の検討を行うために、メチオニン・コリン欠乏食 (MCD) 誘発 NASH モデルを用いることで肝線維化に関する実験を行う。また、既に手に入れている RAGE ノックアウトマウスを用いることで、AGE-RAGE 系の NASH の病状進展における役割について明らかにする。また、糖尿病による動脈硬化モデルでは RAGE KO マウスにおいては糖代謝・脂質代謝に影響することなく動脈硬化が抑制されることが示されており、NASH においても同様の状態が予想されるため、糖代謝・脂質代謝への影響を介した作用かどうかを明らかにする目的で血液生化学的な検討も用いて評価を行う。

#### 4. 研究成果

これまで我々は、レニン-アンギオテンシン系 (RAS) の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) における肝線維化への役割について報告してきた。近年、終末糖化産物 (AGE) およびその受容体である RAGE からのシグナル伝達は、NASH の病態に極めて重要な活性酸素種 (ROS) の産生に強く関わっていることが明らかとなっているため、本研究では RAS と RAGE-AGE 系を介した NASH の線維化進展の制御について検討を行った。RAS からの RAGE 発現調整は PKC- $\delta$  および PKC- $\beta$  リン酸化を介した作用で調整を行っていることが明らかになった。さらに、NASH における AGE-RAGE 系に対する RAS からの発症調整作用は、相加作用ではなく RAGE 発現の調整作用だけであることが明らかとなった。RAGE 発現は肝細胞では少なく肝星細胞での発現が多く、NASH 発症においては重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、RAGE 発現の抑制は TNF- $\alpha$  および ROS の発現抑制を介して NASH 発症の調整を担っていることも明らかとなった。

さらに、RAGE ノックアウトマウスを用いた NASH 発症実験では、肝脂肪化の抑制は軽度にも関わらず、炎症、線維化が明らかに抑制されており (図)、NASH における肝線維化進展

において AGE-RAGE 系を介したメカニズムが重要であることが示された。



#### 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 12 件)

- ①Amano A, Ono M, Saibara T, Ishigami A. (他 12 名): Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. Arch Biochem Biophys. 622: 47-58, 2017 査読有 doi:10.1016/j.abb.2017.03.007
- ②Ochi T, Ono M, Oben JA, Saibara T. (他 6 名): Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through X-box binding protein 1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. Hepatol Res. 46: 584-92. 2016 査読有 doi:10.1111/hepr.12587
- ③Tokushige K, Ono M, Saibara T, Hashimoto E. (他 33 名): Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease: multicenter survey. J Gastroenterol. 51: 586-96. 2016 査読有 doi:10.1007/s00535-015-1129-1
- ④Toda K, Hayashi Y, Ono M, Saibara T. Characterization of Ovarian Responses to Equine Chorionic Gonadotropin of Aromatase-Deficient Mice With or Without 17 $\beta$ -Estradiol Supplementation. Endocrinology. 157: 2093-103, 2016 査読有 doi:10.1210/en.2015-1701
- ⑤Masuda K, Ono M, Saibara T. (他 5 名):

High fasting insulin concentrations may be a pivotal predictor for the severity of hepatic fibrosis beyond the glycemic status in non-alcoholic fatty liver disease patients before development of diabetes mellitus. *Hepatol Res.* 2016 査読有 doi: 10.1111/hepr.12832.

- ⑥ Takahashi H, Ono M, Saibara T, Eguchi Y. (他 8 名): Biphasic effect of alcohol intake on the development of fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 50: 1114-23. 2015 査読有 doi:10.1007/s00535-015-1058-z
- ⑦ Toda K, Hayashi Y, Ono M, Saibara T. : Co-administration of insulin with a gonadotropin partly improves ovulatory responses of estrogen-deficient mice. *Mol Cell Endocrinol.* 411:177-86. 2015 査読有 doi:10.1016/j.mce.2015.04.027
- ⑧ Kamada Y, Ono M, Saibara T, (他 17 名): A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis using two glycobiomarkers. *Hepatology.* 62: 1433-43. 2015 査読有 doi:10.1002/hep-28002
- ⑨ Toda K, Ono M, Saibara T. (他 3 名) : Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. *Transgenic Res.* 23: 293-302, 2014 査読有 doi:10.1007/s11248-013-9771-y
- ⑩ Nakahara T, Ono M, Saibara T, Okanoue T. (他 16 名); Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. *J Gastroenterol.* 49: 1477-84. 2014 査読有 doi:10.1007/s00535-013-0911-1
- ⑪ Kessoku T, Ono M, Saibara T, Nakajima A, (他 17 名); Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 20: 10108-10114. 2014 査読有 doi:10.3748/wjg.v20.i29.10108
- ⑫ Tanaka K, Hyogo H, Ono M, Saibara T, Eguchi Y (他 7 名); Upper limit of normal serum alanine aminotransferase levels in Japanese subjects. *Hepatol Res.* 44: 1196-207. 2014 査読有 doi:10.1111/hepr.12293

[学会発表] (計 27 件)

【国際学会】

- ① Munegage K, Ono M, Ochi T, Saibara T. (他 4 名): INVOLVEMENT OF AGE-RAGE SYSTEM FOR THE DEVELOPMENT OF HEPATIC FIBROSIS IN NASH. UEGWEEK 2016 (24TH

UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY WEEK). POSTER, VIENNA (AUSTRIA), 2016. 10. 15-19.

- ② Yano Y, Mizuta H, Ono M, Saibara T. (他 6 名): POTASSIUM-COMPETITIVE ACID BLOCKER-BASED THIRD-LINE TRIPLE THERAPY IN HELICOBACTER PY-LORI ERADICATION AND STUDY OF THE DIVERSITY OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES. Uegweek 2016 (24TH UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY WEEK). POSTER, VIENNA (AUSTRIA), 2016. 10. 15-19.
- ③ Ono M, Ochi T, Oben J, Saibara T. (他 6 名): PNPLA3 IS INVOLVED IN HEPATIC LIPIDS METABOLISM THROUGH XBP1 AND MODULATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN MICE. EASL (51TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER). POSTER, BARCELONA (SPAIN), 2016. 4. 13-17.
- ④ Kessoku T, Ono M, Egushi, Nakajima A. (他 13 名): EFFICACY OF GLUTATHIONE FOR THE TREATMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: AN OPEN-LABEL, MULTICENTER, PROSPECTIVE STUDY. EASL (51TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER). POSTER, BARCELONA (SPAIN), 2016. 4. 13-17.
- ⑤ Kamada Y, Ono M, Saibara T, Takehara T, Miyoshi E. (他 15 名): A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) using two glycobiomarkers. AASLD The Liver Meeting. Poster, Sanfrancisco (USA) 2015. 11. 13-17.
- ⑥ Kogiso T, Ono M, Tokushige K. (他 13 名): Risk factors for hepatocellular carcinoma recurrence in patients with nonalcoholic and alcoholic fatty liver disease: A Japanese multicenter survey. ASLD The Liver Meeting. Poster, Sanfrancisco (USA) 2015. 11. 13-17.
- ⑦ Eguchi Y, Kitajima Y, Ono M, Anzai K (他 8 名): Insulin secretory function and HbA1c are related to liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. EASL (49th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver). London (UK) 2014. 4. 9-13.

【国内学会】

- ⑧ 川口巧, 小野正文, 鳥村拓司: 非B非C 肝がんの発症・予後とアルブミンの関連: Random Forest 分析. 第 20 回日本肝臓学会大会 (JDDW). パネルディスカッション 3 「肝炎ウイルス制御下時代の肝癌診療」, 神戸コンベンションセンター (兵庫県・神戸市), 2016. 11. 3-11. 6.
- ⑨ 宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: NASH の

肝線維化進展における AGE-RAGE 系の関与について. 第 52 回日本肝臓学会総会. ワークショップ 5 「NASH・NAFLD 研究の新展開」, ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市), 2016. 5. 19-20.

- ⑩宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: NAFLD 患者の肝線維化進展抑制には早期からの高インスリン血症, 血糖変動, DM 発症抑制への対策が重要である. 第 102 回日本消化器病学会総会. ワークショップ 3 「NAFLD/NASH 研究の新知見から臨床への新たな戦略」, 京王プラザホテル (東京都・新宿区), 2016. 4. 21-23.
- ⑪小野正文, 江口有一郎, 西原利治: 高知県における佐賀県方式肝炎対策導入の問題点とそれを補う本県独自の取り組みの効果について. 第 41 回日本肝臓学会西部会. ワークショップ「ウィルス性肝炎患者の受検・受療率の向上を目指して」, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 2015. 12. 3-4.
- ⑫宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: 高インスリン血症は糖尿病未発症 NAFLD 患者の肝線維化進展に重要な因子である. 第 41 回日本肝臓学会西部会. パネルディスカッション「NAFLD の病態と治療」, 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市), 2015. 12. 3-4.
- ⑬小笠原光成, 越智経浩, 廣瀬享, 岩崎信二, 西原利治: non-fibered IDC ball を使用した B-RT0 による肝性脳症の治療. 第 22 回日本門脈圧亢進症学会総会. パネルディスカッション「門脈圧亢進症に対する IVR 治療の現状と今後の展望」, パシフィコ横浜アネックスホール (神奈川県・横浜市), 2015. 9. 10-11.
- ⑭越智経浩, 小野正文, 西原利治: C 型慢性肝炎患者と NAFLD 患者の血糖日中変動に影響を及ぼす要因についての比較検討. パネルディスカッション「生活習慣病・メタボリックシンドロームと消化器疾患: 病態と治療」. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2015. 4. 23-25.
- ⑮越智経浩, 宗景玄祐, 小野正文: PNPLA3 遺伝子は ER stress を介した apoptosis に関与する. シンポジウム「NAFLD/NASH の病態解明と治療の新展開」. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター (宮城県・仙台市), 2015. 4. 23-25.
- ⑯越智経浩, 小野正文, 西原利治: PNPLA3 遺伝子は小胞体ストレスによる肝脂肪酸代謝による. 第 56 回日本消化器病学会大会. シンポジウム「NAFLD/NASH の病態解析と新規治療」, 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市), 2014. 10. 23-26.
- ⑰廣瀬享, 越智経浩, 岩崎信二: 門脈圧亢進症に対するダナパロイドナトリウムの有用性についての検討. 第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会. パネルディスカッション「門脈血栓症」, 京王プラザホテル (東京都・新宿区), 2014. 9. 12-13.

⑱小野正文, 越智経浩, 西原利治: 75gOGTT および CGMS から見た NAFLD の耐糖能異常の特徴について. 第 50 回日本肝臓学会総会. パネルディスカッション, ホテルニューオータニ (東京都・千代田区), 2014. 5. 29-30.

⑲小野正文, 川口巧, 西原利治: CGMS からみた NAFLD と C 型慢性肝炎の耐糖能異常の特徴と比較検討. 第 100 回日本消化器病学会総会. ワークショップ 9 「NAFLD/NASH における新知見と治療法の進歩」, 東京国際フォーラム (東京都・千代田区), 2014. 4. 23-26.

他 8 件

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.kochilnai.jp/home/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

廣瀬 享 (HIROSE, Akira)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学  
部門・助教  
研究者番号: 22790650

### (2) 研究分担者

小野 正文 (ONO, Masafumi)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学  
部門・准教授  
研究者番号: 70304681

西原 利治 (SAIBARA, Toshiji)  
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学  
部門・教授  
研究者番号: 60145125