

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670385

研究課題名(和文) アポトーシス抑制因子 AIM の慢性肝疾患における病態への関与

研究課題名(英文) Involvement of apoptosis inhibitory factor of macrophage (AIM) on pathophysiological condition of chronic liver disease

研究代表者

坪内 博仁 (Tsubouchi, Hirohito)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60145480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アポトーシス抑制因子AIMはマクロファージ特異的に産生・分泌される蛋白で、メタボリックシンドロームやインスリン抵抗性に関与するが、慢性肝疾患との関連は不明である。本研究で、血清AIM濃度がC型慢性肝炎や非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の肝線維化と相関すること、AIMとアディポサイトカインがC型慢性肝炎やNAFLDの病態に異なる機序で関連していること、マクロファージ特異的にAIMを発現するマウスではコリン欠乏アミノ酸置換食による肝線維化が促進されることを明らかにした。以上のことから、AIMは慢性肝疾患の肝線維化マーカー候補であり、肝線維化に促進的に作用する因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) is a protein that is specifically produced and secreted from macrophages, and is involved in metabolic syndrome and insulin resistance. However, the association between AIM and chronic liver disease is unclear. In this study, we found that the serum AIM concentration is correlated with liver fibrosis in chronic hepatitis C and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). In addition, we showed that AIM and adipocytokines are associated with the pathogenesis of chronic hepatitis C and NAFLD through different mechanisms. Furthermore, liver fibrosis induced by a choline-deficient amino acid-defined diet was promoted in mice expressing macrophage-specific AIM. These results show that AIM is both a candidate marker and a stimulatory factor for liver fibrosis in chronic liver disease.

研究分野：消化器内科

キーワード：アポトーシス抑制因子 AIM C型慢性肝炎 非アルコール性脂肪性肝疾患 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

AIM(Apoptosis inhibitor of Macrophage)は、アポトーシスを抑制するタンパク質として発見された(Miyazaki T et al, J Exp Med 1999)。AIMは動脈硬化巣において泡沫化したマクロファージで発現し、マクロファージにおける liver X receptor (LXR) や retinoid X receptors (RXRs)などの核内受容体により発現が調節される(Arai S et al, Cell Metab 2005)。また、肥満に伴い AIMの血中濃度は著しく上昇し、成熟した脂肪細胞にとって重要な脂肪酸合成酵素の機能を AIMが抑制することで、脂肪細胞中の脂肪滴を融解する。さらに、幼若な脂肪前駆細胞の成熟を著明に妨げ、肥満を抑制するタンパク質として注目されている。一方では、AIMは肥満時の慢性炎症やインスリン抵抗性を誘導する鍵分子である可能性も報告されている(Kurokawa J et al, Cell Metab 2010)。このように、AIMは多彩な生理活性を有し、肥満を基盤としたインスリン抵抗性や生活習慣病と密接に関連すると考えられる。一方、肥満やインスリン抵抗性などの生活習慣病は非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)の発症や病態進展だけではなく、C型慢性肝炎の肝線維化や肝発癌に促進的に作用すると考えられている。

我々は肝疾患患者血清を用いたプロテオーム解析で、AIMが高発現している事を見出した。AIMは抗アポトーシスや抗肥満作用を有するタンパク質であるだけでなく、内臓脂肪蓄積、複雑な免疫応答やアポトーシスの結果、肝疾患患者における病態と密接に関連する可能性が考えられるが、AIMのNAFLDやC型慢性肝炎における発現機序や肝病態進展との関連については明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオミクスで同定した AIMに着目して、NAFLDやC型慢性肝炎などの慢性肝疾患の病態解明を行う。NAFLDやC型慢性肝炎患者の肝組織や肝癌組織を病理学的に

評価し、血清や肝組織・肝癌組織など臨床検体を用いて AIMの測定やマイクロアレイやプロテームによる解析を行い、AIMの発現機序や病態との関連について検討する。また、脂肪肝から、肝硬変を経て肝癌を発症するNASH動物モデルや肝発癌動物モデルを用いて、動物モデルでの病態進展における AIMやその関連分子の関与や経時的な変化を検討する。さらに、遺伝子改変動物モデルを用いて、AIMが病態進展にどのように関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) C型慢性肝炎患者血清を用いた検討

対象は2007年2月から2011年7月までに、鹿児島大学病院消化器内科に入院し、肝生検を行ったC型慢性肝炎患者77名である。血清AIMおよびアディポサイトカイン(レプチン、アディポネクチン、レジスチン)値は保存血清を用いてELISA法で測定し、これらが血液生化学検査値、HbA1c (JDS値)、HCVセロタイプやHCV-RNAなどの検査値と関連するかを検討した。また、新犬山分類に基づき肝病理組織所見を肝線維化の程度 (F0-4)と肝炎の活動性の程度 (A0-3)で評価し、肝脂肪化の有無 (HE染色で肝組織中の肝脂肪化が5%以上を有とする)を確認し、血清AIMやアディポサイトカイン値と肝病理組織所見との関連を検討した。さらに、糖尿病が明らかではない60名のうち39名で75gブドウ糖負荷試験が施行されており、これらのデータをもとにインスリン抵抗性指数 (HOMA-IR)やインスリン感受性指数 (WBISI)を算出し、血清AIMやアディポサイトカイン値との関連を検討した。

(2) 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)患者血清を用いた検討

肝生検で診断したNAFLD257例 (非アルコール性脂肪肝NAFL 52例、非アルコー

ル性脂肪肝炎NASH205例)を対象とし、血清AIM濃度と血液生化学検査及び肝組織所見との関連を検討した。血清AIM濃度測定にはTransGenic社製ELISAキットを用いた。

(3) 遺伝子改変動物を用いた検討

マクロファージ特異的に AIM を発現させるために、CD11b プロモーターの制御下に AIM-cDNA が発現するトランスジェニック (TG) マウスを作製した。この AIM-TG マウスに、コリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA) を投与して脂肪肝・肝線維化を誘導し、AIM が脂肪肝や肝線維化にどのように影響するかを検討した。

4. 研究成果

(1) C型慢性肝炎患者血清を用いた検討

血清AIM値はALT、ヒアルロン酸と正の相関、血小板数、総コレステロール、アルブミンと負の相関があり、血清AIM値は肝線維化や肝線維化と関連する肝予備能と関連すると考えられた。一方、AIMはアディポサイトカインとは関連しなかった。

肝線維化進行例 (F2以上) は非進行例 (F1以下) と比較して、血小板数、アルブミン値は低く、ALT、GTP、ヒアルロン酸、AIMは有意に高値であった。また、多変量解析では、ALT高値、ヒアルロン酸高値、AIM高値が肝線維化進行 (F2以上) に関連する独立した因子であった。

血清AIM値は肝脂肪化の有無とは関連せず、レプチン高値が肝脂肪化の存在に独立して関連した。

血清AIM高値、血小板数低値、アルブミン低値、ALT高値、GTP高値、ヒアルロン酸高値は肝炎の活動性の高い症例 (A2-3) に有意に多かったが、多変量解析では肝炎の活動性に関連する独立因

子はなかった。

レプチン、アディポネクチン、レジスチンはいずれもHOMA-IRおよびWBISIに有意に相関したが、AIMはHOMA-IRおよびWBISIとは相関しなかった。

(2) NAFLD患者血清を用いた検討

血清 AIM 値は NAFL 群と比較して NASH 群で有意に高値であり (NASH vs NAFL、 $P < 0.001$)、肝線維化マーカー (血小板、ヒアルロン酸、IV型コラーゲン 7S) および肝線維化スコア (FIB4 index、NAFIC score) と有意に相関し、肝病理組織所見 (炎症、線維化、Matteoni 分類) とも有意に関連した。また、血清 AIM 値は HOMA-R と CK18 断片濃度とも有意に正相関した。

NAFL と NASH の判別において AIM 値 (cut off 値 2378 [ng/mL]) の AUC ROC 値は 0.784 で、他の生化学検査値 (ヒアルロン酸、IV型コラーゲン 7S、CK18 断片濃度など) と比較して判別能は高く、多変量解析では AIM は NASH に関連する独立因子であった (OR 14.3、95%CI 2.5-81.9、 $P < 0.01$)。

(3) 遺伝子改変動物を用いた検討

AIM-TG マウスに CDAA 食を 16 週間投与すると、野生型 (WT) マウスと比較して AIM-TG マウスでは sirius red 染色、AZAN 染色、および肝組織中のハイドロキシプロリン含量で評価した肝線維化は有意に亢進していた。

WT マウスと比較して AIM-TG マウス肝では SMA 陽性の活性化肝星細胞数は有意に増加し、肝組織中のマクロファージ浸潤も認められた。

以上のことから、マクロファージから産生・分泌される AIM は、慢性肝疾患の肝線維化マーカー

一候補であることが示唆された。また、脂肪肝における肝線維化に AIM が促進的に作用する可能性が示唆された。

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 1 件)

1. Yoshimine Y, Uto H, Kumagai K, Mawatari S, Arima S, Ibusuki R, Mera K, Nosaki T, Kanmura S, Numata M, Tamai T, Moriuchi A, Tsubouchi H, Ido A. Hepatic expression of the Sptlc3 subunit of serine palmitoyltransferase is associated with the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Oncol Rep.* 2015; 33: 1657-66. doi: 10.3892/or.2015.3745. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Oda K, Uto H, Sumida Y, Okanou T, Mawatari S, Onishi H, Sakae H, Muromachi K, Tabu E, Oshige A, Imanaka D, Tamai T, Moriuchi A, Tsubouchi H, Ido A. Serum levels of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) are associated with hepatic fibrosis and insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. THE LIVER MEETING 2014 - AASLD, 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2014 年 11 月 07 日~11 日. John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (Boston, MA, USA).
2. 小田耕平、宇都浩文、岡上武. アポトーシス抑制因子 AIM は非アルコール性脂肪性肝疾患の病態進展に関与する. 第 18 回日本肝臓学会大会. 2014 年 10 月 23 日~26 日. ポートピアホテル(兵庫県神戸市).

3. 小田耕平、宇都浩文、角田圭雄、馬渡誠一、大西容雅、坂江遥、室町香織、梶恵理子、大重彰彦、玉井努、森内昭博、岡上武、坪内博仁、井戸章雄. 非アルコール性脂肪性肝疾患における Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) の臨床的意義. 第 51 回日本消化器免疫学会総会. 2014 年 07 月 10 日~11 日. 京都大学医学部芝蘭会館 (京都府京都市).

4. 小田耕平、宇都浩文、角田圭雄、馬渡誠一、梶 一晃、梶 恵理子、室町香織、大重彰彦、熊谷公太郎、玉井努、森内昭博、桶谷真、坪内博仁、井戸章雄. アポトーシス抑制因子 AIM は非アルコール性脂肪性肝疾患の病態と関連する. 第 103 回日本消化器病学会九州支部例会. 2014 年 07 月 04 日~05 日. アクロス福岡(福岡県福岡市).

5. 小田耕平、宇都浩文、馬渡誠一、指宿りえ、梶一晃、大野香織、梶 恵理子、大重彰彦、今中大、熊谷公太郎、玉井努、森内昭博、桶谷真、井戸章雄、角田圭雄、岡上 武、坪内博仁. 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態における Apoptosis Inhibitor of Macrophage の意義. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014 年 05 月 29 日~30 日. ホテルニューオータニ(東京都千代田区).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪内 博仁(Hirohito Tsubouchi)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

・客員研究員

研究者番号:60145480

(2)研究分担者

宇都 浩文 (Hirofumi Uto)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

・准教授

研究者番号:20347058

(3)連携研究者

指宿 りえ (Rie Ibusuki)

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

・助教

研究者番号:90747015