

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08353

研究課題名(和文) NASHの発症・進展におけるAMPKを中心とした抗酸化能の経路解析

研究課題名(英文) Analysis of antioxidant-related AMPK pathway in the onset and progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

研究代表者

及川 寛太(OIKAWA, KANTA)

岩手医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00405804

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)：NASHと診断された37例とNAFLと診断された40例の肝組織を免疫染色した。酸化ストレス関連である8OHdG、4-HNEはNASHで発現が強く、抗酸化関連であるSOD2、Catalaseの発現は有意差を認めなかった。培養細胞で疑似NASH/NAFLモデルを作成した。immunoBlot法およびReal-time PCRで酸化還元関連各分子の比較検討では、疑似NASHでLKB1、AMPK、FOXO3aの強い発現を認めた。SOD2、catalaseの発現に有意差を認めなかった。AMPKノックダウン培養細胞株は、AMPK、FOXO3aの低発現およびSOD2、catalaseのやや低発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：Thirty seven cases of NASH and forty cases of NAFL were immunohistochemically examined. 8OHdG and 4-HNE which was oxidation stress-related were over expression in NASH. SOD2 and Catalase which was antioxidation-related on NASH were not recognize significant difference compared with NAFL. The protein and mRNA with NASH model in a cultured cell showed over expression on LKB1, AMPK, FOXO3a. However SOD2 and Catalase were not recognized significant difference. Knockdown of the AMPK induced the inhibition of FOXO3a, SOD2 and Catalase.

研究分野：肝臓内科 肝臓病理 消化器癌 消化器内科

キーワード：NASH AMPK SOD2 Catalase 8OHdG

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-Alcoholic Steatohepatitis: NASH) は、肝硬変や肝細胞癌に進展する病態であり (Ekstedt M et al. Hepatology 2006)、我が国の肥満人口や2型糖尿病患者の増加に伴って、さらに増加する肝疾患として位置づけられている。しかしながら、治療法は確立されてない。一方で、非アルコール性脂肪肝 (Non-Alcoholic Fatty Liver: NAFL) は比較的良性的な肝疾患と考えられている (Day CP et al. Gastroenterology 2005)。NASH と NAFL の相違は、肝細胞周囲傷害像や線維化の存在である。慢性肝疾患進展の共通経路である肝細胞周囲傷害像や線維化のきっかけは、脂肪肝においては2nd hit である酸化ストレスの存在が示唆されている (Feldstein AE et al. Hepatology 2004)。

我々は、自動分析装置 FREE carpe diem (WISMERLL、イタリア)を用いて、病理組織学的に診断されたNASHおよびNAFLの酸化ストレス度を評価するd-ROMsと抗酸化力を評価するBAPを全血で測定した。修正BAP/d-ROMs比はBAP/d-ROMs/7.541で算出(健常者のBAP/d-ROMsは7.541)され、修正比が1以上で潜在的抗酸化能が高く、1以下で潜在的抗酸化能が小さい(Shimano M et al. Heart Rhythm 2009)。我々は、コントロール、NAFL、NASHにおけるd-ROMs、BAP、修正BAP/d-ROMs比を比較した。コントロールと比較しNAFL、NASHではd-ROMs、修正BAP/d-ROMs比が有意に高値であった。BAPは3群で有意差を認めなかったことを報告した(図1)(及川寛太他。肝臓 2012)。このことから、全血においてはNAFLおよびNASHいずれも酸化ストレスが高い病態下におかれていることを確認した。しかしながら、肝臓組織局所では、酸化ストレスの指標である8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)について、Sekiらは、NASHではNAFLや健常者と比較して高

値であることを報告し(Seki S, J.Hepatol 2002)、Fujitaらも同様にNASHではNAFLよりも高値であると報告している(Fujita N, Cancer Epidemiol Biomarkers 2009)。つまり、全血の酸化ストレスの結果は、局所の病態を反映していない可能性がある。我々は、1つの仮説を立てた。“NASHの発症は、肝臓局所で酸化ストレスが抗酸化能を上回り、そのバランスが破綻によるもの”。

この仮説を証明するために、NAFLおよびNASHの肝組織を、活性酸素である8-OHdGと活性酸素を分解する酵素であるマンガンスーパーオキシドディスムターゼ(Manganese superoxide dismutase: MnSOD:SOD2)免疫染色を行った。NAFLにおいて8-OHdG陽性核とSOD2陽性細胞はほぼ認めないが、NASHは8-OHdG陽性核とSOD2陽性細胞をしばしば認めた。肝臓局所では、全血と結果が異なることが確認できた。我々は、以上の結果より、NAFLでは酸化ストレスと抗酸化力のバランスが保たれ、免疫染色ではほぼ染色性を認めず、NASHでは酸化ストレスと抗酸化力のバランスが破綻し、抗酸化力を上回る酸化ストレスの存在が発症の起点となっていると考えた。つまり、抗酸化力に発症は左右されると考えた。我々は、Liver kinase B1(LKB1)-AMP活性化プロテインキナーゼ(AMP-activated protein kinase: AMPK) pathwayに着目した。LKB1-AMPK pathwayは、細胞内のエネルギーのセンサーとして重要な役割を担っている(Shaw RJ et al. Science 2005)。Metformin刺激によりLKB1-AMPK pathwayを介して脂肪酸合成を抑制することが報告されている(Zhou G et al. J Clin Invest 2001)。さらに、AMPK下流は、Forkhead box O3a(FOXO3a)を介して、SOD2やcatalaseの抗酸化作用を刺激することが示された(Shimazu T et al. Science 2013)。NASH発症の1つの経路として、LKB1-AMPK-FOXO3a-SOD2/catalaseを評価す

ることは、NASH 発症様式と新たな治療戦略の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

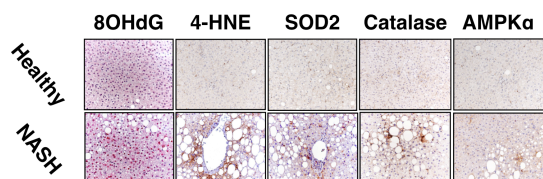
NASH の発症様式は、2hit theory が広く受け入れられている。1st hit が肝臓への脂肪蓄積、2nd hit は過剰な酸化ストレスの発生である。そしてその酸化ストレスに対して抑制的に働く主要な役割を担っていると推定されている分子は、AMPK である。AMPK はその上流の LKB1 のリン酸化による調節を受ける。リン酸化した AMPK は FOXO3a を介して、SOD2 と catalase の抗酸化作用を刺激する。NASH を対象とした酸化ストレスに関わる LKB1-AMPK-FOXO3a-SOD2/catalase pathway の意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

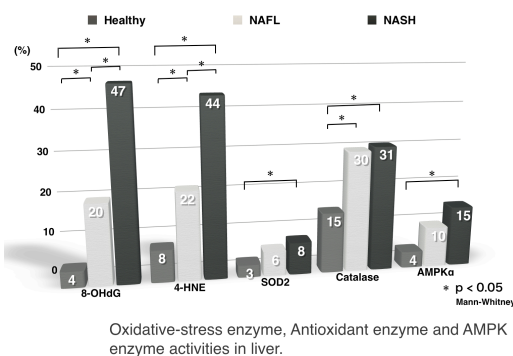
- (1) NASH/NAFL を診断したヒト肝生検組織の免疫染色の検討。移植肝をコントロールとした。NASH37 例と NAFL40 例を 8OHdG 免疫染色、4-HNE 免疫染色、SOD2 免疫染色、Catalase 免疫染色、AMPK α 免疫染色した。染色強度は、Pannomartatic Viewer 1.15.4 (3DHISTECHLtd.) HistoQuant で評価した。
- (2) 培養細胞株 (Hep3B, Huh-7, Human primary hepatocyte) で、疑似 NASH/NAFL モデルを作成し、タンパク、RNA で各分子評価および、Oil Red 染色で脂肪滴評価を行った。
- (3) 培養細胞株 (Mouse primary hepatocyte) で疑似 NASH/NAFL モデルを作成し、タンパク、RNA で各分子評価を行った。
- (4) AMPK をノックダウンした培養細胞株 (Huh-7) の疑似 NASH モデルを作成し、タンパク、RNA で各分子評価および、Nile Red 染色で脂肪滴評価を行った。

4. 研究成果

- (1) NASH/NAFL を診断したヒト肝生検組織の免疫染色の検討

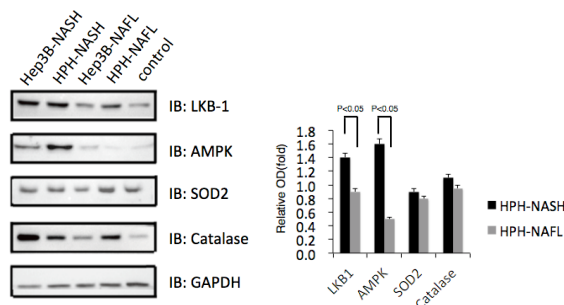


Analysis of Oxidative stress in human non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Representative photographs of healthy liver was compared with NASH specimen. Immunostaining showed oxidative stress related positive cell clusters in NASH.

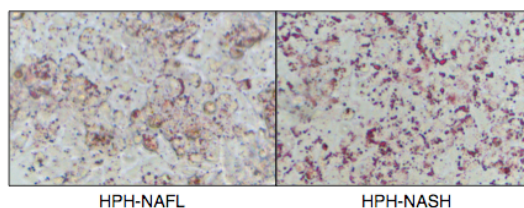


酸化ストレスマーカーである 8OHdG および 4-HNE は、NAFL と比較して有意に染色強度が強かった。しかしながら、抗酸化マーカーである SOD2 および Catalase は、NAFL と比較して染色強度に有意差を認めなかった。NAFL/NASH の AMPK α の染色強度は、コントロールと比較して強かった。

- (2) 培養細胞株で、疑似 NAFL/NASH モデルの各分子の検討

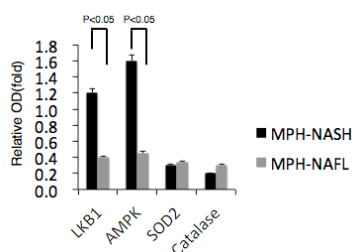


疑似 NASH および疑似 NAFL の各分子を immunoblot および RT-PCR にて検討すると、LKB1 と AMPK は疑似 NAFL に比較して疑似 NASH は有意に発現していた。しかしながら、SOD2 と Catalase は疑似 NAFL に比較して疑似 NASH と同等の発現であった。



Oil Red 染色の評価では、疑似 NAFL と比較して疑似 NASH で脂肪滴を多く認めた。

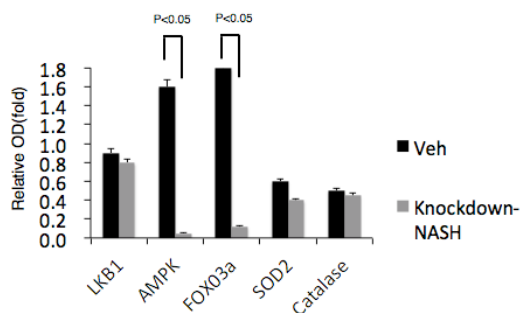
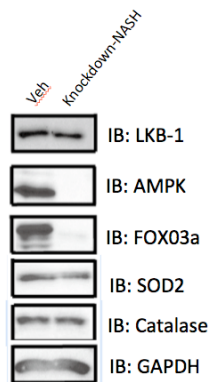
- (3) 培養細胞株 (Mouse primary hepatocyte) で疑似 NASH/疑似 NAFL モデルにおける分子評価。



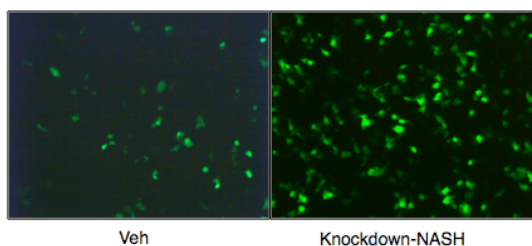
Mouse primary hepatocyte において、疑似 NASH および疑似 NAFL の各分子を immunoblot および RT-PCR にて検討すると、LKB1 と AMPK は疑似 NAFL に比較して疑似 NASH は有意に発現していた。しかしながら、SOD2 と Catalase は疑似 NAFL に比較して疑似 NASH と同等の発現であった。

(4) AMPK をノックダウンした培養細胞株 (Huh-7) の疑似 NASH/NAFL モデルでの各分子評価。

AMPK の発現はノックダウンにより抑制されていた。AMPK より上流の LKB-1 の発現に有意差を認めなかった。一方、AMPK の下流である FOXo3a の発現は Vehicle と比較し、ノックダウン AMPK では、抑制されていた。SOD2 および Catalase は Vehicle と比較し、やや減弱していた。



RT-PCR でも同様の結果であった。



脂肪滴は Vehicle に比較し、Knockdown-NASH で、増加していた。今後、AMPK pathway 以外の抗酸化関連 pathway の検討を加える予定である。Nrf2/Keap1 pathway に着目し検討する予定である。

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 7 件)

1. Arakawa N, Okubo A, Yasuhira S, Takahashi K, Amano H, Akasaka T, Masuda T, Shibazaki M, Maesawa C. Camosic acid, an inhibitor of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, enhances the cytotoxicity of β -lapachone in melanoma cell lines. *Oncol Lett* . 15, 2393-2400, 2018. Doi: 10.3892/ol.2017.7618. 査読あり.
2. Okubo A, Yasuhira S, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 (NQO1), protects melanin-producing cells from cytotoxicity of rhododendrol. *Pigment Cell Melanoma Res* 29 (2015) 306-16. doi: 10.1111/pcmr.12461. 査読あり.
3. Sugiyama I, Oikawa H, Masuda T, Sadzuka Y. Effect of liposomes with different double arms polyethyleneglycol on hepatic metastasis model mice and evaluation using a fluorescent imaging device. *Curr Drug Deliv*. in press (2016). Doi:10.2174/1567201813666160328113653. 査読あり.
4. Shigeeda W, Shibazaki M, Yasuhira S, Masuda T, Tanita T, Kaneko Y, Sekido Y, Maesawa C. Hyaluronic acid enhances cell migration and invasion via the Yap1/TAZ-RHAMM axis in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget* .8, 93729-93740, 2017. Doi: 10.18632/oncotarget.20750. 査読あり.
5. Endo K, Kakisaka K, Oikawa K, Endo R, Takikawa Y. Comparison of Predicted Energy Expenditure in Japanese Patients with Non-Alcoholic

Fatty Liver Disease to Establish a Suitable Nutrition Intervention. *J Nutr Sci Vitaminol*. 62, 108-115, 2016. Doi: 10.3177/jnsv.62.108. 査読あり.

6. Kasai S, Arakawa N, Okubo A, Shigeeda W, Yasuhira S, Masuda T, Akasaka T, Shibazaki M, Maesawa C. NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase-1 Expression Sensitizes Malignant Melanoma Cells to the HSP90 Inhibitor 17-AAG. *PLoS One* 11 (2016)e0153181. doi:10.1371/journal.p one.0153181. 査読あり.
7. Tatemichi Y, Shibazaki M, Yasuhira S, Kasai S, Tada H, Oikawa H, Suzuki Y, Takikawa Y, Masuda T, Maesawa C. Nucleus accumbens associated 1 is recruited within the promyelocytic leukemia nuclear body through SUMO modification. *Cancer Sci* 106 (2015) 848-56. doi: 10.1111/cas.12680. 査読あり.

[学会発表] (計 6 件)

1. 及川浩樹、及川寛太、水谷久太、増田友之. 肝細胞癌浸潤能に及ぼすafadinの発現変化の検討. 第106回日本病理学会総会. 2017年. 東京都.
2. 及川寛太、及川浩樹、及川純子、及川慶一、増田友之. *Helicobacter pylori*感染診断における鏡検法の評価. 第106回日本病理学会総会. 2017年. 東京都.
3. 及川浩樹、及川寛太、若杉優樹、根岸駿、水谷久太、増田友之. afadin の肝細胞癌細胞機能への影響の検討. 第 105 回日本病理学会総会. 2016年. 仙台市.

4. 及川寛太、及川純子、及川慶一、水谷久太、西谷匡央、阿保重紀子、及川浩樹、佐藤孝、前沢千早、増田友之. 非アルコール性脂肪性肝疾患の病理組織学的な酸化ストレスマーカーの意義II. 第105回日本病理学会総会. 2016年. 仙台市.

5. 及川浩樹、西谷匡央、及川寛太、水谷久太、前沢千早、増田友之. RhoGDI2 の発現変化による大腸癌進展の検討. 第 104 回日本病理学会総会. 2015年. 名古屋市.

6. 及川寛太、及川純子、及川慶一、水谷久太、西谷匡央、阿保重紀子、及川浩樹、佐藤孝、前沢千早、増田友之. 非アルコール性脂肪性肝疾患の病理組織学的な酸化ストレスマーカーの意義. 第104 回日本病理学会総会. 2015年. 名古屋市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

及川 寛太 (Oikawa, Kanta) 岩手医科大学・医学部・研究員 研究者番号：00405804

(2)研究分担者

及川 浩樹 (Oikawa, Hiroki) 岩手医科大学・医学部・講師 研究者番号:50285582

前沢 千早 (Maesawa, Chihaya) 岩手医科大学・医学部・教授 研究者番号: 10326647

増田 友之 (Masuda, Tomoyuki) 岩手医科大学・医学部・教授 研究者番号: 10199698