様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　１２１０２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４６０４８５

研究課題名（和文）新しいNASHモデルマウスの病態発症機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of pathogenic mechanism in novel NASH model mice

研究代表者
蕨　栄治（Warabi, Eiji）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：７０３９６６１２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は代表者らが見出した、ヒトNASHの病態と非常に類似した表現型を示す新しい動物モデルである、p62:Nrf2二重欠損（DKO）マウスのNASH発症メカニズムを解明することを目的とした。DKOマウスは、腸管上皮組織の脆弱化により透過性が亢進し、腸内細菌に起因するLPSの取り込みが上昇することにより高エンドトキシン血症となり、肝臓における炎症が惹起されることがNASH発症の一因となっていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to elucidate the pathological mechanism of NASH in p62:Nrf2 double knockout mice that were recently developed by our group and found that they showes a very similar phenotype to human NASH. It is suggested that in DKO mice, intestinal epithelial permeability is accelerated, resulting in high endotoxinemia, causing inflammation in the liver. It is considered that these defects are main reasons for NASH onset.

研究分野：　分子生物学

キーワード：　NASH

１．研究開始当初の背景

NASH 患者には肥満や糖尿病・脂質異常症などを背景に持つ人が多く、生活習慣病としての重要性が認められてきているが、その詳細な発症機序は不明である。また、治療は食生活の改善、運動療法が有効であるが、根本的な治療法、治療薬は存在しない。これには開発に有用なモデル動物がないことが大きな原因として考えられる。従来、NASH モデル動物として、メチオニン・コリン欠乏食投与による食餌誘導性マウス、ラットモデルが知られてきた。また、NASH を発症する遺伝子改変動物として、MC4R 欠損、肝細胞特異的 Nrf1 欠損、肝細胞特異的 retinoic acid receptor α-dominant negative トランスジェニックなどのマウスが知られている。しかしこれらのモデル動物は、過剰な高脂肪食の投与を必要としたり、不自然な体重の減少や急激な症状の進行を認めたりと、生活習慣病を基盤とするヒト NASH の発症機序とはかなり乖離しているという問題点があった。

代表者らはこれまでに、酸化ストレスに対する生体防御機序に関する研究を行い、マウス腹腔マクロファージからジエチルマレイン酸、パラコートなどの親電子性物質や活性酸素種により誘導される機能未知のストレス応答タンパク質 p62 を発見し、その機能解析を行なってきた。その結果、p62 は主要な細胞内タンパク質分解経路であるオートファジーに関与し、神経変成疾患や NASH 病態における肝実質細胞内で認められる異常タンパク質の凝集体形成に深く関与する因子であることなどを報告してきた。また、申請者らが作製した p62 遺伝子欠損マウスは、中枢性のレプチン抵抗性に起因した過食による肥満、高血圧、耐糖能異常に加え、脂肪肝を発症し、その表現型はヒトのメタボリック症候群に類似することを見出した。

そこで代表者は、p62 遺伝子に加え、単純性脂肪肝から NASH 進行への second hit のひとつとして重要であると考えられる、酸化ストレスに着目し、抗酸化防御系に中心的な役割を果たす転写因子である Nrf2 遺伝子も欠損させた遺伝子二重欠損マウスを作製した。

その結果、p62:Nrf2 遺伝子に重欠損マウスは、通常の飼育環境下、通常の食事下で、メタボリックシンドロームを発症し、壮年期以降に肝臓組織に炎症、線維化がみられ、加齢とともにその病態が悪化する NASH 自然発症マウスであることが明らかとなった。更に、このマウスは 50-60 週齢の高齢期に約 10%の確率で前癌病変と見られる肝腫瘍を発生することもわかり、ヒト NASH の転帰と極めて類似した、これまでにない新規な NASH モデルを作製することに成功した。

２．研究の目的

p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは、通常の飼育下で NASH を自然に発症すること、またその病態の基盤には過食に伴う肥満症が関与していると思われること、これらの病態が加齢とともに緩やかに進行し、腫瘍の出現につながることなど、ヒトの NASH 病態と酷似しているところに特徴がある。このような NASH モデル動物の報告はこれまでに存在しない。本マウスの病態発症機序を解析することで、未だ根本的な治療法が存在しない NASH の克服に、画期的な知見を見出すことが出来ると考え、本研究を立案した。

本研究は、この新規 NASH モデル“p62 および Nrf2 遺伝子二重欠損マウス”を用いて、NASH 発症・病態形成と肝腫瘍発生の分子メカニズムを解明することを目的とする。

３．研究の方法

DKO マウスの NASH 発症機序について、以下の解析を行った。

(1)腸管、内臓脂肪、肝臓組織の病理学的解析
8, 30, 50 週齢時における各組織像について HE 染色を行なった。

(2)腸管透過性試験
FITC-デキストランを経口投与し、継時的な血中への取り込みを測定した。

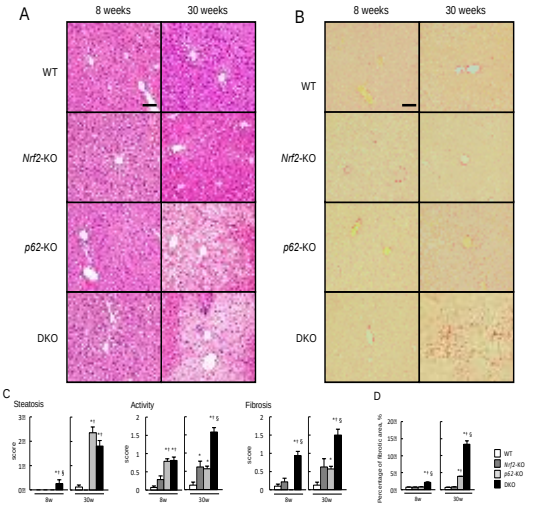
(3)エンドトキシンの測定
血中および便中に含まれる LPS を測定した。

(4)遺伝子欠損 Raw264.7 細胞の作製と炎症応答の解析
CRISPR/Cas9 システムにより、Nrf2、p62 を欠損した Raw264.7 細胞を作製し、LPS 処理による炎症性遺伝子発現を定量した。

(5)遺伝子欠損 Caco-2 細胞の作製とバリア機能の解析
CRISPR/Cas9 システムにより、Nrf2、p62 を欠損した Caco-2 細胞を作製し、タイトジャンクションタンパク質の発現量およびバリア機能の評価を行なった。

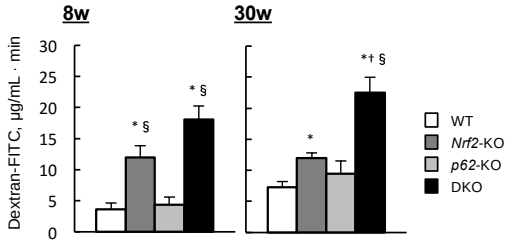
４．研究成果

(1) 腸管、内臓脂肪、肝臓組織の病理学的解析
DKO マウスの肝臓組織では、30 週齢において著明な脂肪蓄積、炎症性細胞浸潤、線維化を認め（下図）、50 週齢においてその様子はさらに増悪した。内臓脂肪組織においても、DKO マウスでは著しい腫大化と炎症性細胞

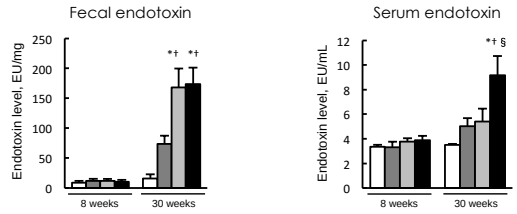


浸潤を 25 週齢より認めた。腸管においては、25 週齢時より上皮細胞の脱落等の脆弱化を認めた。

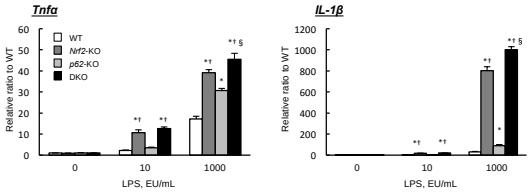
(2)腸管透過性試験
DKO マウスにおいては、8 週齢時より腸管透過性が増大しており（下図)、バリア機能が低下していることが示唆された。



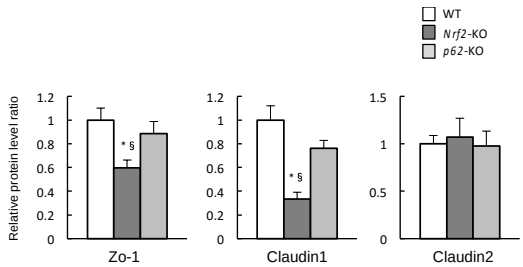
(3)血中エンドトキシンの測定
血中および便中に含まれる LPS はともに DKO マウス 30 週齢より増大していた(下図)。



(4)遺伝子欠損 Raw264.7 細胞の作製と炎症応答の解析
Nrf2、p62 の欠損により低濃度の LPS による炎症応答が亢進した。特に Nrf2 欠損による著明な炎症性遺伝子発現を認めた（下図)。



(5)遺伝子欠損 Caco-2 細胞の作製とバリア機能の解析
Caco-2 細胞を単層培養し透過性の指標である細胞膜抵抗値を測定したところ Nrf2 欠損で低下していた。また、Caco-2 細胞のタイトジャンクションタンパク質の発現は、Nrf2 欠損により低下した（下図)。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 14 件）

① Watanabe Y, Honda S, Konishi A Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S. Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. Nature Communications, 7:13508.,2016 doi: 10.1038/ncomms13508.

② Ohbuchi K, Mori Y, Ogawa K, Warabi E, Yamamoto M, Hirokawa T. Detailed Analysis of the Binding Mode of Vanilloids to Transient Receptor Potential Vanilloid Type I (TRPV1) by a Mutational and Computational Study. PLoS One, 11(9):e0162543. 2016 doi: 10.1371/journal.pone.0162543.

③ Ohbuchi K, Miyagi C, Suzuki Y, Mizuhara Y, Mizuno K, Omiya Y, Yamamoto M, Warabi E, Sudo Y, Yokoyama A, Miyano K, Hirokawa T, Uezono Y. Ignavine: a novel allosteric modulator of the μ opioid receptor. Sci Rep, 6:31748. 2016 doi: 10.1038/srep31748.

④ McSweeney SR, Warabi E, Siow RC. Nrf2 as an Endothelial Mechanosensitive Transcription Factor: Going With the Flow. Hypertension, 67, 20-29. 2016 doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06146.

⑤ Hadano S, Mitsui S, Pan L, Otomo A, Kubo M, Sato K, Ono S, Onodera W, Abe K, Chen X, Koike M, Uchiyama Y, Aoki M, Warabi E, Yamamoto M, Ishii T, Yanagawa T, Shang HF, Yoshii F. Functional links between SQSTM1 and ALS2 in the pathogenesis of ALS: cumulative impact on the protection against mutant SOD1-mediated motor dysfunction in mice. Hum Mol Genet, 25, 3321-3340. 2016 doi: 10.1093/hmg/ddw180.

⑥ Ito S, Kimura S, Warabi E, Kawachi Y, Yamatoji M, Uchida F, Ishibashi-Kanno N, Yamagata K, Hasegawa S, Shoda J, Tabuchi K, Sakai S, Bukawa H, Sekido M, Yanagawa T. p62 modulates the intrinsic signaling of UVB-induced apoptosis. J Dermatol Sci, 83, 226-233. 2016 doi: 10.1016/j.jdermsci.2016.05.005.

⑦ Le Q, Tabuchi K, Warabi E, Hara A. The role of peroxiredoxin I in cisplatin-induced ototoxicity. Auris Nasus Larynx, 44, 205-212. 2016 doi: 10.1016/j.anl.2016.06.001.

⑧ Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K. p62 Deficiency Enhances α-Synuclein Pathology in Mice. Brain Pathol, 25, 552-564. 2015 doi: 10.1111/bpa.12214.

⑨ Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda J. Cytoprotective Role of Nrf2 in Electrical Pulse Stimulated C2C12 Myotube. PLoS One, 10(12):e0144835. 2015 doi: 10.1371/journal.pone.0144835.

⑩ Kurosawa M, Matsumoto G, Kino Y, Okuno M, Kurosawa-Yamada M, Washizu C, Taniguchi H, Nakaso K, Yanagawa T, Warabi E, Shimogori T, Sakurai T, Hattori N, Nukina N. Depletion of p62 reduces nuclear inclusions and paradoxically ameliorates disease phenotypes in Huntington's model mice. Hum Mol Genet., 24, 1092-1105. 2014 doi: 10.1093/hmg/ddu522.

⑪ Kawasaki A, Furukawa H, Nishida N, Warabi E, Kondo Y, Ito S, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Suda A, Nagaoka S, Setoguchi K, Nagai T, Hirohata S, Shimada K, Sugii S, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Ohno S, Katayama M, Okamoto A, Kono H, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tohma S, Tsuchiya N. Association of Functional Polymorphisms in Interferon Regulatory Factor 2 (IRF2) with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Case-Control Association Study. PLoS One, 9(10):e109764. 2014 doi: 10.1371/journal.pone.0109764.

⑫ Seto K, Shoda J, Horibe T, Warabi E, Kohno M, Yanagawa T, Bukawa H, Nakanuma Y, Kawakami K. Targeting Interleukin-4 Receptor Alpha by Hybrid Peptide for Novel Biliary Tract Cancer Therapy. Int J Hepatol, 2014:584650. 2014 doi: 10.1155/2014/584650.

⑬ Ito T, Kimura S, Seto K, Warabi E, Kawachi Y, Shoda J, Tabuchi K, Yamagata K, Hasegawa S, Bukawa H, Ishii T, Yanagawa T. Peroxiredoxin I plays a protective role against UVA irradiation through reduction of oxidative stress. J Dermatol Sci, 74, 9-17. 2014 doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.12.002.

⑭ Ohtsuka S, Ishii Y, Matsuyama M, Ano S, Morishima Y, Yanagawa T, Warabi E, Hizawa N. SQSTM1/p62/A170 regulates the severity of Legionella pneumophila pneumonia by modulating inflammasome activity. Eur J Immunol, 44, 1084-1092. 2014 doi: 10.1002/eji.201344091.

〔学会発表〕（計 20 件）

① 秋山健太郎、蕨栄治、正田純一. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスの肝蔵、内臓脂肪、腸内環境の解析よりみた NASH 発症機序の解明. 第 41 回日本肝臓学会東部会、2016.12.8、京王プラザホテル（東京・新宿区）

② 秋山健太郎、蕨栄治、正田純一. 非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)自然発症マウスにおける Kupffer 細胞の表現形質の変化と発症機序との関連性. 第 102 回日本消化器病学会総会、2016.4.21、京王プラザホテル（東京・新宿区）

③ Miho Ikeuchi, Eiji Warabi, Junichi Shoda. The effect of female hormones on NAFLD in p62 knockout mice. APASL, Tokyo, 2016.2.20、グランドプリンスホテル新高輪（東京・港区）

④ Kentaro Akiyama, Eiji Warabi, Junichi Shoda. p62:Nrf2 double knockout mice develop steatohepatitis through the serum endotoxin overload. APASL, Tokyo, 2016.2.20、グランドプリンスホテル新高輪（東京・港区）

⑤ 池内美穂, 蕨 栄治, 長岡亜実, 秋山健太郎, 正田 純一. メス p62/Sqstm1 遺伝子欠損マウスを用いた Estradiol と NAFLD との関係の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学大会合同大会 2015.12.1、神戸ポートピアホテル（兵庫・神戸市）

⑥ 秋山健太郎, 蕨 栄治, 岡田浩介, 正田 純一. p62: Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは血清中エンドトキシンが増加し, 脂肪性肝炎を発症する. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学大会合同大会 2015.12.1、神戸ポートピアホテ

ル（兵庫・神戸市）

⑦ 池内美穂, 蕨　栄治, 正田純一　雌性 p62 遺伝子欠損マウスの表現型の解析-女性ホルモンの過食肥満と肝脂肪化に及ぼす影響の検討　日本消化器関連学会週間(JDDW)　2015.10.8、グランドプリンスホテル新高輪（東京・港区）

⑧ 秋山健太郎, 池内美穂, 蕨　栄治, 正田純一　NASH 自然発症モデルマウスの腸内環境よりみた疾病病態の解析と発症機序の解明　日本消化器関連学会週間(JDDW)　2015.10.8、グランドプリンスホテル新高輪（東京・港区）

⑨ 池内美穂, 蕨　栄治, 正田純一. 雌性 p62 遺伝子欠損マウスの表現型の解析と中高齢女性におけるメタボリック症候群の発症機序の解明. 第 51 回日本肝臓学会　2015.5.21、ホテル日航熊本（熊本・熊本市）

⑩ 秋山健太郎, 池内美穂, 青山希, 蕨　栄治, 正田純一. 非アルコール性脂肪性肝炎自然発症モデルマウスにおける腸内環境の変化と NASH 発症機序の解明. 第 51 回日本肝臓学会　2015.5.21、ホテル日航熊本（熊本・熊本市）

⑪ 蕨 栄治. 生活習慣病と p62/Sqstm1. 第 31 回臨床フリーラジカル会議 2014.12.5、烟河（京都・亀山市）

⑫ Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Satoshi Sakai, Giovanni E. Mann. Role of oxidative stress-inducible protein SQSTM1 in the regulation of daily variation in arterial pressure and heart rate. SFRBM2014, Seattle 2014.11.18、Sheraton Seattle（米国・シアトル）

⑬ Kentaro Akiyama, Eiji Warabi, Kosuke Okada, Miho Ikeuchi, Katsumi Kose, Junichi Shoda. Deletion of both p62 and Nrf2 spontaneously leads to development of steatohepatitis in mice. AASLD, Boston 2014.11.7 、 Hynes Convention Center（米国・マサチューセッツ）

⑭ 秋山健太郎, 蕨　栄治, 正田　純一. 非アルコール性脂肪性肝炎自然発症モデルマウスにおける腸肝相関からみた病態評価と機序の解明.　日本消化器関連学会週間(JDDW)　2014.10.23、神戸ポートピアホテル（兵庫・神戸市）

⑮ 秋山健太郎, 池内　美穂, 正田　純一, 蕨　栄治. p62: Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは kupffer 細胞の貪食能が低下し, 脂肪性肝炎を発症する.　第 87 回日本生化学会　2014.10.23、神戸ポートピアホテル（兵庫・神戸市）

⑯ 堀江正樹, 小峰昇一, 蘇　リナ, 蕨　栄治, 正田純一：肥満予防を目的とした全身振動刺激の有用性の基礎的検討.　第 69 回日本体力医学会大会　2014.9.19、長崎大学（長崎・長崎市）

⑰ 小峰昇一, 蕨 栄治, 呉　世昶, 堀江正樹, 岩脇隆夫, 正田純一：運動による肝・骨格筋における Nrf2 活性化の解析.　第 69 回日本体力医学会大会　2014.9.19、長崎大学（長崎・長崎市）

⑱ 蕨　栄治. ノックアウトマウスから見る p62/Sqstm1 の分子機能. 第 67 回日本酸化ストレス学会　2014.9.4、同志社大学（京都、京都市）

⑲ 秋山健太郎, 蕨　栄治, 正田純一.　p62 および Nrf2 遺伝子の二重欠損マウスにおける NASH 発症機序の解明―肝と腸管の臓器連関の観点より.　第 50 回日本肝臓学会総会　2014.5.29、ホテルニューオータニ（東京・千代田区）

⑳ 蕨　栄治, 秋山健太郎, 正田純一.　p62, Nrf2 遺伝子二重欠損マウスにおける腸肝相関よりみた NASH 発症機序の解明. 第 100 回日本消化器病学会　2014.4.23、東京国際フォーラム（東京・千代田区）

６．研究組織

(1)研究代表者

蕨　栄治（WARABI, Eiji）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：７０３９６６１２

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし