

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670273

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎を自然発症する新規モデル動物を利用した診断マーカーの探索

研究課題名(英文)Exploration of diagnostic marker for nonalcoholic steatohepatitis by using unique NASH model mouse

研究代表者

鬼澤 浩司郎(Onizawa, Kojiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60194578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、飲酒歴がないにもかかわらず中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が肝細胞に起こり、炎症・線維化等のアルコール性肝障害と同様の所見を認める予後不良な疾患である。本研究は独自に開発したNASHを自然発症するマウスを用いて、NASHの診断に有用な非侵襲的な診断マーカーを探索することを目的とした。その結果、apolipoprotein A-Vなどの6種のタンパク質が新規NASHマーカー候補として有用である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is poor prognosis disease with inflammation and fibrosis in liver as well as steatosis without apparent drinking history. The aim of this study was to explore novel noninvasive diagnostic marker for NASH by using unique NASH model mouse. We found 6 proteins including apolipoprotein A-V are valuable novel candidates for diagnosis of NASH.

研究分野：口腔外科学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 NASH

### 1. 研究開始当初の背景

人間ドック検診結果の調査によると、現在本邦には200万人以上のNASH患者が存在するものと推定されている。NASHの診断としては、血清中トランスアミラーゼ値や、血小板数低下、線維化マーカー、フェリチン値高値などの血液生化学検査が用いられるが、これらの指標は病態の進展度合いとの相関性が低く、最終的な確定診断は肝生検を行なう以外にないのが現状である。また、病勢の判断にも有用な診断法がなく、肝生検に頼らざるを得ない。これらのことがNASHの発見の遅れを招いており、簡便な非侵襲的なNASH診断マーカーが開発されれば、診断スピードの改善や患者への負担の軽減のみならず、NASHの臨床そのものが劇的に改善するものと思われる。

我々はこれまでにNASHの成因に関する研究を行ってきた。その中で、NASHの進展や防御に重要な因子として、転写因子Nrf2とストレスタンパク質p62を見出した。大変興味深いことに、我々の作製したNrf2とp62遺伝子を欠損した遺伝子二重欠損(DKO)マウスは、通常食の投与下で自然にNASHを発症し、一部のマウスの肝臓に腫瘍が発生することが明らかになった(特願:2012-078966)。本DKOマウスには、右図および次頁図に示すように加齢とともに著明な体重増加が見られ、肝臓に生じる炎症、繊維化の程度も増悪して行く。さらに、腫瘍の発生が50週齢以降の高齢時に約10%の個体に見られる。これらの所見、特に加齢とともにゆっくりと病態が進行して行く点は、ヒトのNASH病態と非常に類似しており、これまでに例のないモデル動物である。

### 2. 研究の目的

本研究はこのDKOマウスを用いて、その血清に含まれるNASHの診断に有用な非侵襲的な診断マーカーを探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

32週齢または62週齢の野生型(WT)及びDKOマウス計4群(各群2匹)の血清をマルチプルアフィニティー除去スピンカートリッジ(アジレント社)を用いてアルブミンとIgGの除去を行った。サンプルの一部を分取し、タンパク質定量を行った。タンパク質量はBradford法(Sigma, Bradford reagent)を用い、タンパク質濃度はBSA標準品を用い近似した。タンパク質量として180µg分のサンプル溶液を1.5mLチューブに分取し、トリクロロ酢酸(TCA)濃度が15%となるように冷100%TCA溶液を添加した。軽く混合した後、2時間氷上にて静置してタンパク質を沈殿させた。沈殿は遠心(20,000g×15min, 4°C)にて回収し、冷エタノール/エーテルにて十分洗浄した後、室温にて乾燥させた。これにIEF lysis buffer 250µLを加え、室温

で45分間攪拌した後、超音波処理を5分間行い、タンパク質を再溶解した。飽和プロモフェノールブルー溶液1µLおよびIPGバッファー(pH 3-10 NL, GEヘルスケア)1µLを加えて攪拌し、遠心(20,000g×15min, 室温)して不溶物を沈殿させ、上清を等電点電気泳動サンプルとした。

調製した等電点電気泳動サンプルをImmobiline DryStrip gel (pH 3-10 non-linear, 13cm, GEヘルスケア)にアプライし、5時間ゲルの膨潤を行った。膨潤後のゲルをフォーカシングトレイにセットし、PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad社)にて等電点電気泳動を行った。

等電点電気泳動後のストリップゲルを平衡化バッファー(6M urea, 20% glycerol, 2% DTT, 2% SDS, 100mM Tris-HCl, pH8.8)に完全に浸し、45分間振とうして平衡化した。平衡化したゲルを10-18%ポリアクリルアミドグラジエントゲル(16cm×16cm, バイオクラフト社)にセットし、25mA/枚 Constant Currentにて電気泳動を行った。泳動先端がゲル下端に到達した時点で電気泳動を終了した。

電気泳動後のゲルは固定液(10%メタノール, 7%酢酸溶液)で30分間振とう後、SYPRO Ruby (Molecular Probe社)にて遮光下で一晩染色した。染色後のゲルは10%メタノール、7%酢酸溶液で十分洗浄した。電気泳動画像はMolecular Imager FX (Bio-Rad社)を用いて取得した。

二次元電気泳動の画像解析はPDQuest ver.7.30 (Bio-Rad社)を用いて行った。解析は同一週齢サンプルのn-2でそれぞれ実施し、3倍以上の増減があったスポットを抽出し、さらにn-1、n-2で共通に検出されたスポットを抽出した。

抽出したスポットについて、M/Mイオンサーチによるタンパク質同定を実施した。データベース検索エンジンとしてMascot (Matrix Science Inc.)を用い、NCBIデータベースを用いて検索を行った。検索の際、生物種として"Mus."に設定した。尚、イオンスコア>32のペプチドについて有意に同定されたと判断した。

### 4. 研究成果

同週齢のWT、DKO間で3倍以上の増減が認められるものとして以下のタンパク質が同定された。

WT32WとDKO32Wを比較して、DKO32Wが3倍以上増加したスポットおよびDKO32Wのみに検出されたスポット

スポットNo.	同定されたタンパク質*	同定タンパク質の理論質量	Mascot Score
SSP1110	apolipoprotein A-IV	44686	395
	ApoA4 protein	42889	349
	precursor Apoprotein A-I	30569	91
	centrapsin	47106	78
	carboxypeptidase N catalytic chain precursor	52098	51
	mannose-binding lectin associated serine protease-2	78924	38
SSP1220	complement component C3 prepropeptide, last, partial	187904	65

WT32WとDKO32Wを比較して、DKO32Wが1/3以下に減少したスポットおよびWT32Wのみに検出されたスポット

スポットNo.	同定されたタンパク質 <sup>4)</sup>	同定タンパク質の理論質量値	Mascot Score
SSP1006	C4 complement protein, partial	37743	55
SSP6004	hemoglobin beta	15767	61

WT62WとDKO62Wを比較して、DKO62Wが3倍以上増加したスポットおよびDKO62Wのみに検出されたスポット

スポットNo.	同定されたタンパク質 <sup>4)</sup>	同定タンパク質の理論質量値	Mascot Score
SSP2210	immunoglobulin gamma kappa chain variable region	24421	249
	Chain L, Structure Of An Antibody-Antigen Complex. Crystal Structure Of The HyHEL-10 Fab-Lysozyme Complex	23801	133
	Chain A, Idiotope-Anti-Idiotope Fab-Fab Complex; D1.3-E225	24063	131
	Chain 4, Structure Of The Complex Of An Fab Fragment Of A Neutralizing Antibody With Foot And Mouth Disease Virus	47836	130
	Chain L, Phosphocholine Binding Immunoglobulin Fab MePC603. AN X-Ray Diffraction Study At 2.7 Angstroms	24361	130
	immunoglobulin light chain (V-J) and kappa constant chain	24118	130
	Ig kappa chain precursor (15C5) - mouse	26413	130
	precursor Apoprotein A-I	30569	79
	Ig kappa chain V region (253.12D3) - mouse (fragment)	12127	38
	serum amyloid P-component precursor	26387	510
SSP2206	immunoglobulin kappa light chain	27146	70
	Chain L, Crystal Structure Of A Recombinant Anti-Single-Stranded Dna Antibody Fragment Complexed With D15	23864	302
SSP4221	immunoglobulin light chain	11344	150
	Chain L, Structure Of An Antibody-Antigen Complex. Crystal Structure Of The HyHEL-10 Fab-Lysozyme Complex	23801	93
	Chain L, Structure Of Rotavirus Outer Capsid Protein Vp7 Trimer In Co A Neutralizing Fab	23440	74
	apolipoprotein A-I preproprotein	30666	42
SSP5227	Ig kappa chain V region (G2a) - mouse	24486	201
	Chain L, Three-Dimensional Structure Of Two Crystal Forms Of Fab R19.9, From A Monoclonal Anti-Arsonate Antibody	23937	189
	immunoglobulin kappa light chain variable region	23702	176
	Chain L, Crystal Structure Of Anti-tetrahydrocannabinol Fab Fragment In Complex With The	23596	148
	Ig kappa chain precursor (15C5) - mouse	26413	132
	Chain L, Phosphocholine Binding Immunoglobulin Fab MePC603. AN X-Ray Diffraction Study At 2.7 Angstroms	24361	129
	Ig kappa chain (Mab03-1) - mouse (fragment)	23799	123
	anti-DNA immunoglobulin light chain IgG	11661	80
	Ig kappa chain V region (253.12D3) - mouse (fragment)	12127	76
	RecName: Full-Ig lambda delta-1 chain C region, partial	11739	40

WT62WとDKO62Wを比較して、DKO62Wが1/3以下に減少したスポットおよびWT62Wのみに検出されたスポット

スポットNo.	同定されたタンパク質 <sup>4)</sup>	同定タンパク質の理論質量値	Mascot Score
SSP6209	Pregnancy zone protein	167144	515

以上のうち、再現性、Mascot Scoreが高いものとして apolipoprotein A-V、C4 complement proteinが初期NASHマーカーとして有用である可能性が示唆された。さらに、62週齢の比較から見出された immunoglobulin gamma kappa chain variable region、serum amyloid P-component precursor、Ig kappa chain V region (G2a)、および pregnancy zone proteinの4種タンパク質は高度に病態が進んだNASHを反映する血中マーカーとして有用な候補であることが示された。これらの新規に同定されたマーカー候補はいずれもこれまでに報告がないタンパク質であり、これらを組み合わせ測定することでより精度の高いNASH診断につながる可能性がある。今後の臨床応用に向けた研究に発展することが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計10件)

McSweeney SR, Warabi E, Siow RC. Nrf2 as an Endothelial Mechanosensitive Transcription Factor: Going With the Flow. Hypertension, 査読あり, 2016, 67, 20-29.

doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06146. Horie M, Warabi E, Komine S, Oh S, Shoda J. Cytoprotective Role of Nrf2 in Electrical Pulse Stimulated C2C12 Myotube. PLoS One, 査読あり, 2015, 10(12):e0144835.

doi: 10.1371/journal.pone.0144835.

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  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Mice. Brain Pathol., 査読あり, 2015, 25, 552-564.

doi: 10.1111/bpa.12214.

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., 査読あり, 2015, 24, 1092-1105.

doi: 10.1093/hmg/ddu522.

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, 査読あり, 2014, 9(10):e109764.

doi: 10.1371/journal.pone.0109764.

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., 査読あり, 2014, 2014:584650.

doi: 10.1155/2014/584650.

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.*, 査読あり, 2014, 74, 9-17.  
doi:10.1016/j.jdermsci.2013.12.002.  
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.*, 査読あり, 2014, 44, 1084-1092.  
doi: 10.1002/eji.201344091.  
渡邊泰男, 石井 功, 藤 栄治. 秋潤社, RSS の生合成系とタンパク質機能制御. 査読なし, 細胞工学 34(4), 372-376. 2014  
藤 栄治. p62/Sequestosome1 の生理機能. 査読なし, 生化学 (日本生化学会誌), 86(6), 783-787. 2014

[学会発表](計 16 件)

池内美穂、藤 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, 2015.12.4, 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸市)  
秋山健太郎、藤 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, 2015.12.3, 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸市)  
池内美穂、藤 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)  
秋山健太郎、池内美穂、藤 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)  
池内美穂、藤 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)  
秋山健太郎、池内美穂、青山希、藤 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)  
藤 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, けぶり河 (京都・亀岡市)  
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*, 2014.11.19, (シアトル, 米国)  
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, (ボストン, 米国)  
堀江正樹、小峰昇一、蘇 リナ、藤 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)  
小峰昇一、藤 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)  
秋山健太郎、藤 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, 神戸ポートアイランド (兵庫・神戸市)  
秋山健太郎、池内美穂、正田純一、藤 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, 2014.10.15, 京都国際会館 (京都・京都市)  
藤 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)  
秋山健太郎、藤 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)  
藤 栄治. 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)

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼澤 浩司郎 (ONIZAWA, Kojiro)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：60194578

(2) 研究分担者

蕨 栄治 (WARABI, Eiji)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70396612