



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1523号
学位記番号	第1094号
氏名	佐川 弘之
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>Connexin 32 and luteolin play protective roles in non-alcoholic steatohepatitis development and its related hepatocarcinogenesis in rats</p> <p>(コネキシン 32 とルテオリンはラットにおける非アルコール性脂肪肝炎の進行とそれに関連した肝細胞癌形成に対して保護的役割を担う)</p> <p>Carcinogenesis, 36: 1539-1549, 2015</p>
論文審査担当者	主査： 高橋 智 副査： 田中 靖人, 竹山 廣光

論文内容の要旨

本邦における非アルコール性脂肪肝 (NAFLD)の発症率は、ライフスタイルの欧米化に伴い増加している。NAFLD は、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に進展し、肝硬変や肝癌の発症母地となりうる危険性がある。病態進行の過程には酸化ストレス上昇やホメオスタシス低下の関与が指摘される。抗酸化物質の摂取は NASH および NASH に関連した肝発癌の予防や治療への有効性が示唆されている。細胞間結合装置の一つであるギャップ結合は、組織や生体のホメオスタシスを担う。我々は肝で発現している Cx32 dominant negative transgenic (Cx32 Δ Tg) ラットを作製し、同腹の野生型 (Wt) ラットと比較して肝前癌病変の形成が促進されることを明らかにした。Cx32 Δ Tg ラットで認めたこの現象は、加齢 Wt ラットで生理的に起こる Cx32 発現の低下と肝発癌性の亢進と酷似していた。Cx32 Δ Tg ラットは、NASH の病態進行のリスクを表現しており、NASH および NASH 関連肝発癌の病態や化学予防効果の解析に有用なモデルであると考えた。本研究では Cx32 Δ Tg および Wt ラットに対して methionine-choline deficient diet (MCDD)により NASH を誘導し、NASH に対する luteolin の予防効果の検討と Cx32 の役割の解析を行った。【方法】10 週齢雄性 Cx32 Δ Tg および Wt ラットに diethylnitrosamine (DEN) を単回腹腔内投与し、DEN 投与 2 日後から、MCD 飼料を投与した。各々に luteolin 混餌投与群を設け、実験開始 2 週間と、12 週間後に肝組織を採取し解析した。【結果】MCDD により、肝には脂肪変性、炎症や繊維化が誘導された。炎症と繊維化は、Wt と比較して Cx32 Δ Tg ラットで有意に増強され、いずれの genotype においても luteolin 投与により有意な改善を認めた。肝前癌病変である GST-P 陽性細胞数、Cx32 Δ Tg ラットにおいて luteolin 投与により有意に減少した。DHE 染色の結果、Wt と比較して Cx32 Δ Tg ラットの肝で、酸化ストレスは亢進し、いずれの genotype においても、luteolin 投与群で酸化ストレスは減少していた。定量 RT-PCR の結果、炎症関連の炎症性サイトカイン Il-18 と Il-6 や線維化関連の炎症性サイトカインの mRNA 発現量は、Cx32 Δ Tg ラットにおいて luteolin 投与群で有意な低下を認めた。また、Il-6, Tgf- β , Colla1、Ctgf の mRNA とリン酸化 NF κ B 蛋白の発現量は、Cx32 Δ Tg ラットにおいて有意な上昇を認め、IkB 蛋白発現は有意に減少していた。Wt ラットにおける肝細胞膜上の Cx32 および Cx26 発現は減少しており、NASH の進行度と逆相関関係を示し、luteolin 投与により Cx32 および Cx26 発現の減少は軽減された。肝発癌感受性の群間差と関連した遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析した結果、Cx32 Δ Tg ラットで高発現を示し、luteolin により発現低下する遺伝子として brain expressed, X-linked 1 (Bex1) が同定された。定量的 RT-PCR により、Bex1 の発現は Cx32 Δ Tg ラットで有意に高く、いずれの genotype においても luteolin 投与により減少した。in situ hybridization の結果、Bex1 mRNA は肝細胞に局在し、Cx32 Δ Tg では GST-P 陽性細胞における発現上昇と、luteolin 投与による発現低下を認めた。Bex1 の肝細胞の腫瘍性増殖能における関与を検証するため、ラット正常肝細胞株 Clone 9 に対して、Bex1 遺伝子を導入した。その結果、mock 細胞と比較して、有意な細胞増殖能の上昇とリン酸化 NF κ B 蛋白発現の増加を認めた。一方、ラット肝癌細胞株 HSU-C2 および HSU-C6 の Bex1 発現を knock down した結果、細胞増殖抑制とリン酸化 NF κ B 蛋白とリン酸化 JNK 蛋白の発現低下が見られた。【考察】ラット NASH の進展および肝発癌に対する Cx32 および luteolin の予防効果が示され、luteolin は NASH の化学予防剤として有用であることが示唆された。また本研究により、NASH 関連肝発癌に関わる遺伝子として Bex1 が新規に同定され、その予防や治療の標的になりうる可能性が見出された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、抗酸化物質 luteolin の摂取による非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) の病態進行および発癌に対する予防効果とギャップ結合蛋白 (Cx32) の役割を検討したものである。加えて NASH 関連肝発癌に関与し得る遺伝子 brain expressed, X-linked 1 (Bex1) を同定した。

過去の研究から NASH および NASH 関連肝発癌の病態解析に有用なモデルであると考えられた Cx32 dominant negative transgenic (Cx32ΔTg) ラットを用い、Cx32ΔTg および同腹の野生型 (Wt) ラットに対して diethylnitrosamine (DEN) 投与 2 日後から methionine-choline deficient diet (MCDD) を投与し NASH を誘導した。各々に luteolin 混餌投与群を設け、実験開始 2 週間後、12 週間後に肝組織を採取し解析した。病理組織学的・定量 RT-PCR (炎症関連の炎症性サイトカイン・線維化関連の炎症性サイトカイン)・リン酸化 NF- κ B 蛋白と I κ B 蛋白の発現量・酸化ストレス発現量から評価した結果、NASH の進行は Cx32ΔTg ラットで有意に増強され、いずれの genotype においても luteolin 投与により有意な改善を認めた。肝前癌病変である GST-P 陽性細胞数、Cx32ΔTg ラットにおいて luteolin 投与により有意に減少された。肝細胞膜上の Cx32 および Cx26 発現は NASH の進行度と逆相関関係を示し、luteolin 投与により発現の減少が軽減された。肝発癌感受性の群間差と関連した遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析した結果、Cx32ΔTg ラットで高発現を示し、luteolin により発現低下する遺伝子として Bex1 を同定した。Bex1 mRNA は肝細胞に局在し、Cx32ΔTg では GST-P 陽性細胞における発現上昇と、luteolin 投与による発現低下を認めた。肝細胞の腫瘍性増殖能に対する Bex1 の関与を検証するために、ラット正常肝細胞株 Clone 9 に対して Bex1 遺伝子を導入した実験では、mock 細胞と比較し有意な細胞増殖能の上昇とリン酸化 NF- κ B 蛋白発現の増加を認めた。一方、ラット肝癌細胞株 HSU-C2 および HSU-C6 の Bex1 発現を knockdown した結果、細胞増殖抑制とリン酸化 NF- κ B 蛋白・リン酸化 JNK 蛋白の発現低下が認められた。以上より、ラット NASH の進展および肝発癌に対して Cx32 および luteolin の予防効果が示され、luteolin は NASH の化学予防剤として有用であることが示唆された。

第一副査の田中教授からは Cx32 機能低下により NASH が進展するメカニズムは何か、luteolin により inflammasome あるいは Bex1 発現が低下するメカニズムは何か、など 8 項目、主査の高橋からは Cx32 機能低下により肝組織内の活性酸素量が増加するのはなぜか、肝脂肪化に伴う Cx32 発現低下のメカニズムは何か、など 8 項目、第二副査の竹山先生からは専門領域の質問として、転移性肝癌の治療方針、胃癌の外科治療について質問があった。これらの質問に対して申請者から概ね適切な回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解していると判断した。本研究は、Cx32 および luteolin が inflammasome や活性酸素量を制御することで NASH の進展に対して抑制効果を惹起すると同時に、NASH 関連肝発癌に対する予防効果を示すことを明らかにした。また、Bex1 が NASH 関連肝発癌に対する新たな予防・治療法の標的分子になりうる可能性を示した。以上のことから、これらの新しい知見を報告している本論文の筆頭著者には博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判定した。