

平成28年度「杉山産業化学研究所研究助成」報告書

研究題目:糖鎖技術を用いた非アルコール性脂肪肝炎治療効果判定法・治療法の開発

大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学 准教授 鎌田佳宏、教授 三善英知

本研究はヒト非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者を対象とした臨床的研究とマウス NAFLD モデルを用いた基礎的研究の 2 つから成る。以下、この 2 点について報告する。

(1)NASH 診療における Mac-2 binding protein と M2BPGi の比較検討(臨床的研究)

【目的】NAFLD からの NASH 鑑別、線維化予測診断は NAFLD サーベイランスにとって重要な問題である。我々は Mac-2 binding protein(Mac-2bp)が NASH 鑑別診断だけでなく、線維化ステージ予測にも有用であることを見出した。一方、WFA レクチンに反応する糖鎖修飾を持った Mac-2bp である M2BPGi は慢性肝疾患の新規線維化バイオマーカーとして臨床応用されている。今回、NAFLD における Mac-2bp、M2BPGi の有用性を明らかとすることを目的とした。【方法】肝生検にて組織学的に確定診断した NAFLD 患者 510 名(肝生検 NAFLD)、および健診受診者 2122 名(ウイルス性肝炎、アルコール多飲者を除外)を対象とした。健診受診者のうち NAFLD は 1291 名、非 NAFLD は 831 例であった。肝生検 NAFLD 症例全例で血中 Mac-2bp を測定し、うち 116 名では血中 M2BPGi も測定した。健診受診者全症例で血中 Mac-2bp と M2BPGi 両者を測定した。【成績】健診症例で Mac-2bp と M2BPGi 濃度は有意な相関があった($R=0.44$, $P<0.0001$)。血中 Mac-2bp 値は健診受診者(N AFLD, 非 NAFLD)ではそれぞれ 1.81/1.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、肝生検 NAFLD(F0/F1/F2/F3/F4)のそれぞれ 1.55/2.05/2.89/3.34/3.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。ROC 解析により、肝生検 NAFLD 症例にて線維化各ステージの Mac-2bp カットオフ値を算出した結果、1.80 (F1), 2.21 (F2), 2.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F3)であった。健診症例 NAFLD のうち 318 例(24.6%)が血中 Mac2bp 濃度 2.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であった。肝生検 NAFLD 症例の早期線維化ステージ(F1、F2)で、血中 Mac-2bp は有意に上昇したが M2BPGi は上昇しなかった。【結論】Mac-2bp と M2BPGi はともに有用な NASH 鑑別バイオマーカーであった。早期の線維化進展予測には Mac-2bp の方が優れていた。

(2)コアフコシル化を標的とした新規 NASH 治療法の開発(基礎的研究)

【目的】糖鎖修飾の変化は様々な疾患発症や病態に直接関与する。我々はフコシル化という糖鎖修飾について永年研究を行っており、最近フコシル化関連タンパク質が非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の血液バイオマーカーとなることを見出した。フコシル化の中でも、コアフコシル化が NASH を含めた慢性肝疾患病態進展に伴い、亢進することを見出した。コアフコシル化とは N 型糖鎖の根元の N-アセチルグルコサミンにフコースを付ける糖鎖修飾のことであり、糖転移酵素 Fut8 が担っている。さらに我々は、日本固有のスギタケというキノコからコアフコースを特異的に認識するレクチン PhoSL(*Pholiota squarrosa* lectin)を発見した。今回、コアフコシル化制御による NASH 病態進展への作用について、Fut8 KO マウス、細胞、PhoSL を用いた結果を報告する。

【方法】マウスは ICR マウス background の野生型(WT)マウスおよび、Fut8 欠損(KO)マウスを用いた。NASH モデルとして MCD 食あるいは高脂肪高コレステロール食(HFHC 食)投与マウスを用いた。スギタケより抽出した PhoSL の効果検討のため、HFHC 食投与 4 週 WT マウスを用い、最後の 2 週間のみ週 1 回 PhoSL 5 μ g を腹腔内投与したモデルと PBS を腹腔内投与したモデルで比較検討した。細胞は CRISPR/Cas9 システムにより Fut8 を欠損させた RAW 細胞、ヒト肝星細胞株 LX-2 を用いた。【成績】WT マウスでは NASH 病態進展とともに肝臓の Fut8 遺伝子発現、肝細胞のコアフコシル化が亢進していった。HFHC 食投与マウスでは肝臓マクロファージ浸潤に伴い、炎症が亢進するが PhoSL 投与によりマクロファージは著明に低下し、炎症が抑制された。KO マウスでは NASH 病態進展が WT マウスに比べ抑制されていた。In vitro の検討で PhoSL は IFN- γ により活性化した RAW 細胞のアポトーシスを亢進させることがわかった。この PhoSL のアポトーシス誘導作用は Fut8 KO RAW 細胞では認められなかった。肝星細胞に対する Fut8 ノックダウンは Smad3 のリン酸化を軽度抑制し、線維化関連遺伝子発現も有意に抑制した。興味深いことに PhoSL は Smad3 のリン酸化を著明に抑制し、線維化関連遺伝子発現も抑制した。【結語】マウス NASH モデルでは Fut8 発現が亢進し、Fut8 の抑制は炎症、線維化を改善することが明らかとなった。またコアフコース特異的レクチン PhoSL は NASH 治療のためのツールとなることが示唆された。

以上の研究により、ヒト NAFLD 患者で Mac-2bp が優れたバイオマーカーであることを見出し、マウス NAFLD モデルで PhoSL が治療ツールとなりうることを見出した。

本研究を遂行するにあたり、平成28年度「杉山産業化学研究所研究助成」より助成金を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

【学会発表】

- 第 41 回日本肝臓学会東部会 シンポジウム NAFLD の病態解明-bench から臨床へ
コアフコースを標的とした糖鎖治療法開発の基礎的検討
鎌田佳宏^{1,2}、竹原徹郎²、三善英知¹
大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学¹、消化器内科学²
- JDDW 2017 ワークショップ 8 NASH 診療のトピックス
NASH 診療における Mac-2 binding protein と M2BPGi の比較検討
鎌田佳宏^{1,2}、竹原徹郎²、三善英知¹
大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学¹、消化器内科学²