

400338 |

胆汁酸によるアポトーシス調節作用と肝再生機構に関する研究

課題番号 15590614

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）

研究成果報告書

平成17年2月

研究代表者 平野史倫

(旭川医科大学医学部講師)

【はしがき】

アポトーシスは制御された細胞死であり、別名「プログラム細胞死」とも呼ばれている。すなわち、アポトーシスは様々な酵素や転写因子の活性化によって制御されている。中でも、転写因子 NF- κ B は肝細胞のアポトーシス抑制作用と密接に関連している。すなわち、NF- κ B ファミリーの p65 を欠損させたマウスにおいてアポトーシスが誘導されて胎生死することが、さらに、NF- κ B の抑制は腫瘍壊死因子 (TNF)- α によるアポトーシス作用を増強させることが証明されている。さらに、NF- κ B は細胞増殖作用も有し、部分肝切除後の再生肝で NF- κ B の活性化が明らかとなっている。これら NF- κ B を活性化させる因子に TNF- α が知られ、従って、TNF- α はアポトーシス誘導作用とアポトーシス抑制作用を同時に有し、両作用のバランスによって細胞は死か生かを決定される。

一方、近年、消化吸収を補助する生理活性物質と考えられていた胆汁酸が免疫調整作用と核受容体 farnesoid X receptor 活性化作用を有していることから、原発性胆汁性肝硬変などに汎用されているウルソデオキシコール酸療法の理論的根拠が明らかになりつつある。研究代表者らは、一貫して胆汁酸研究に取り組み、胆汁酸が、(1) 主要組織適合抗原クラス I および II 発現調節作用 [Biochem Biophys Res Commun, 1993, 1995、J.Immunol, 1995、J Gastroenterol, 1996]、(2) NF- κ B の活性化とケモカイン RANTES の発現調節作用 [研究業績 4, 5]、(3) アポトーシス誘導作用 [日本消化器病学会雑誌, 2002]、に深く関与していることを明らかにしてきた。ここで、これら一連の研究から、胆汁酸が TNF- α と同様に肝細胞に対してアポトーシス誘導作用と NF- κ B 活性化作用の両面を有することに注目した。すなわち、常に胆汁酸に暴露される正常肝細胞はアポトーシス促進と NF- κ B 活性化 (=アポトーシス抑制) の両シグナルが同時に伝達されると生存し、病的状態で両シグナルの伝達が不均衡となり細胞減少 (=肝細胞障害) や細胞増加 (=肝癌) を引き起こすと想定した。

そこで、本研究は、

- 1) 胆汁酸によるアポトーシス・細胞増殖作用の解明

2) 胆汁酸による farnesoid X receptor と NF- κ B の相互活性化機構

3) 胆汁酸によるアポトーシス・細胞増殖に関する標的遺伝子のクローニングの3プロジェクトを推進することによって胆汁酸による肝細胞のアポトーシスと増殖のメカニズムを分子レベルで明らかにし、アポトーシス-増殖の均衡/不均衡の制御法を開発することによって胆汁うっ滞による肝細胞障害の改善、さらには肝細胞癌治療や肝再生医学への応用も視野に入れて包括的に解明することを目的とする。

【研究経過・成果】

1) 胆汁酸によるアポトーシス・細胞増殖作用の解明

胆汁酸は高濃度において肝細胞のアポトーシスを誘導するが、低濃度においてはむしろ肝細胞の抗アポトーシス作用や細胞増殖作用を誘導することが明らかになった。具体的には、高濃度胆汁酸ではカスパーゼ3やカスパーゼ9を強く誘導した。さらに、これら高濃度胆汁酸によるアポトーシス作用はカスパーゼ8阻害剤では抑制されず、カスパーゼ9阻害剤では抑制された。これらの結果から、高濃度胆汁酸によるアポトーシス作用は、ミトコンドリア障害性にアポトーシス経路が活性化されることを示唆していた。一方、低濃度胆汁酸において、肝細胞のアポトーシスはカスパーゼ活性化以前に転写因子 NF- κ B が活性化されることによって誘導される抗アポトーシス蛋白である IAP-1 によって阻害されることを明確にした。また、胆汁酸は他の抗アポトーシス蛋白として知られている IAP-2 や XIAP を誘導しなかった。さらに、肝細胞において、低濃度胆汁酸は細胞増殖作用を有するサイクリン D1 活性を強く誘導し、細胞増殖を促進することも推測された。従来から肝細胞の自己増殖作用は報告されているが、これらのメカニズムに生理的に存在している胆汁酸が肝細胞の抗アポトーシス・細胞増殖誘導を介して作用している可能性を明らかにした。

2) 胆汁酸による farnesoid X receptor と NF- κ B の相互活性化機構

farnesoid X receptor と NF- κ B による転写調節作用における相互作用を検討するため、プロモーター上に NF- κ B 結合領域を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子 (2XkB-Luc) を作成し farnesoid X receptor が転写活性化能を有するか否かについて検討した。その結果、farnesoid X receptor 単独では 2XkB-Luc の転写を誘導できなかった。そこで、farnesoid X receptor と NF- κ B の相互作用を検討するため、NF- κ B 存在下で farnesoid X receptor の発現量を徐々に増加させると、2XkB-Luc の転写は NF- κ B 単独と比較して farnesoid X receptor 発現量依存性に活性化された。その作用は、NF- κ B のコンポーネントの中で、p65 に認められたが p50 には認められなかった。また、farnesoid X receptor と NF- κ B 発現プラスミドを用いた免疫沈降法によって、farnesoid X receptor と NF- κ B はそれぞれダイメリゼーション部位を介して結合していることが明らかとなった。次に、胆汁酸による NF- κ B 活性化機構について in vitro phosphorylation 法を用い検討した。その結果、NF- κ B 活性化の情報伝達系の中で、特に重要な I κ B キナーゼをリン酸化していることを解明した。従って、胆汁酸は直接 NF- κ B を活性化するとともに、farnesoid X receptor 活性化を介した NF- κ B 活性化機構を介して肝細胞増殖や抗アポトーシス作用を有する標的遺伝子を活性化させ肝再生機構に深く関与していることを明らかにした。

3) 胆汁酸によるアポトーシス・細胞増殖に関する標的遺伝子のクローニング

正常ヒト肝細胞を用いて、胆汁酸を添加し前後における遺伝子発現を DNA チップを用いた解析で検討した。その結果、胆汁酸によって前後 2 倍以上の mRNA 発現を認めた遺伝子は 55000 gene 中、2378 gene であった。その中で特出すべき既知遺伝子として、RAS、PKA、PKC、PKR、PI3kinase、MAPK などの細胞内情報伝達系を担う各種リン酸化酵素、cyclin、c-myc など細胞周期増殖関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子、Sp3、NF- κ B などの転写因子、TGF- α 、IL-8 などのサイトカインなど従来知られている遺伝子や今回はじめて発見された遺伝子が認められた。現在これら機能分子を解析中である。

【研究組織】

研究代表者 平野史倫 (旭川医科大学医学部講師)
研究分担者 府川悦士 (旭川医科大学医学部助手)
海外共同研究者 C. Scheidereit (Max-Delbrück Center, Germany)

【交付決定額（配分費）】

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	2,500	0	2,500
平成16年度	1,100	0	1,100
総計	3,600	0	3,600

【研究発表】

(1) 学会誌など

1、英文

Hirano F, Nomura Y, Maruyama N, Komura K, Fukawa E, Haneda M, Makino I.
Bile acid induces anti-apoptotic cIAP-1 expression in human hepatocytes: possibility of rescues from hepatocyte apoptosis in cholestatic liver diseases.

World J Gastroenterol. 2005; in press.

Krappmann D, Wegener E, Sunami Y, Esen M, Thiel A, Mordmuller B, Scheidereit C.
The I κ B kinase complex and NF- κ B act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1.

Mol Cell Biol. 24(14): 6488-500, 2004.

El Jamali A, Freund C, Rechner C, Scheidereit C, Dietz R, Bergmann MW.
Reoxygenation after severe hypoxia induces cardiomyocyte hypertrophy in vitro: activation of CREB downstream of GSK3 β .

FASEB J. 18(10): 1096-8, 2004.

Broemer M, Krappmann D, Scheidereit C.
Requirement of Hsp90 activity for I κ B kinase (IKK) biosynthesis and for constitutive and inducible IKK and NF- κ B activation.

Oncogene. 23(31): 5378-86, 2004.

Ohazama A, Hu Y, Schmidt-Ullrich R, Cao Y, Scheidereit C, Karin M, Sharpe PT.
A dual role for I κ k α in tooth development.

Dev Cell. 6(2): 219-27, 2004.

Hirano F, Komura K, Fukawa E, Makino I.
Tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced RANTES chemokine expression via activation of NF- κ B and p38 MAP kinase: roles of TNF- α in alcoholic liver diseases.

J Hepatol. 38(4): 483-9, 2003.

Hirano F, Kobayashi A, Makino I.

Inhibition of TNF- α -induced RANTES expression in human hepatocyte-derived cells by fibrates, the hypolipidemic drugs.

Int Immunopharmacol. 3(2): 225-32, 2003.

Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R.

Inhibition of NF- κ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis.

Blood. 102(6): 2259-67, 2003.

Mathas S, Lietz A, Janz M, Hinz M, Jundt F, Scheidereit C, Bommert K, Dorken B.

Inhibition of NF- κ B essentially contributes to arsenic-induced apoptosis.

Blood. 102(3): 1028-34, 2003.

Tegethoff S, Behlke J, Scheidereit C.

Tetrameric oligomerization of I κ B kinase gamma (IKK γ) is obligatory for IKK complex activity and NF- κ B activation.

Mol Cell Biol. 23(6): 2029-41, 2003.

Mordmuller B, Krappmann D, Esen M, Wegener E, Scheidereit C.

Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF- κ B-p52 generation by a co-translational mechanism.

EMBO Rep. 4(1): 82-7, 2003.

2、邦文

平野史倫、羽田勝計

自己免疫疾患のすべて「アジソン病」

臨床看護 30(6): 828-830, 2004.

平野史倫、牧野勲

アポトーシスの転写因子、特に NF- κ B について

肝胆膵 46(1): 7-17, 2003

牧野勲、平野史倫

胆汁酸療法の新展開

消化器科 36(1): 95-100, 2003

(2) 口頭発表 (主なもの)

Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2004)

June 9-12, Berlin, Messe Berlin GmbH

Effect of thrombin on CD40 ligand expression in T cells: Correlation between thrombin receptor and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis.

○ Hirano F, Komura K, Nomura Y, Fukawa E.

第16回北海道骨粗鬆症研究会

1月31日、札幌、北海道大学医学部大講堂

ステロイド性骨粗鬆症における血中 sRANKL と骨代謝マーカーの関連について

○ 平野史倫、小村景司、野村嘉伸、府川悦士

第29回北海道リウマチ研究会

2月28日、札幌、ロイトン札幌

強膜炎で発症した大動脈炎症候群の1例

○ 野村嘉伸、平野史倫、小村景司、府川悦士、羽田勝計

第3回旭川関節疾患カンファランス

3月20日、旭川、旭川パレスホテル

多発性骨折を契機に発見されたクッシング症候群の2例

○ 府川悦士、小村景司、野村嘉伸、平野史倫、羽田勝計

第48回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月15日～17日、岡山、岡山コンベンションセンター

ワークショップ「リウマトイド因子の意義」

RA患者におけるトロンビン受容体(ThrR)の発現とリウマチ因子(RF)との関連

○ 平野史倫、小村景司、野村嘉伸、府川悦士

第48回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月15日～17日、岡山、岡山コンベンションセンター

両側手根管症候群を契機に発見された家族性アミロイドポリニューロパチー(FAP)2型の一家系

○ 小村景司、府川悦士、野村嘉伸、平野史倫、中村公英

第90回日本消化器病学会総会

4月21日～23日、仙台、仙台市民会館

ワークショップ「胆汁酸と細胞増殖、アポトーシス」

肝細胞における高濃度胆汁酸によるアポトーシス誘導作用の検討

○ 平野史倫、牧野勲

第23回北海道甲状腺談話会

7月23日、札幌

甲状腺機能低下症を呈し、発見された偽性副甲状腺機能低下症の1例

○ 滝山由美、府川悦士、野村嘉伸、小村景司、丸山直紀、平野史倫、滝山義之、羽田勝計

第47回日本甲状腺学会学術集会

11月11日～13日、前橋、前橋テルサ

甲状腺機能低下症を呈し、発見された偽性副甲状腺機能低下症の1例

○ 滝山義之、府川悦士、野村嘉伸、小村景司、丸山直紀、平野史倫、滝山由美、羽田勝計

第6回日本骨粗鬆症学会

11月17日～20日、さいたま、大宮ソニックシティ

ステロイド性骨粗鬆症における血中sRANKLとOPGの検討

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

第14回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会

12月10日～11日、秋田、秋田県総合保健センター

RA患者末梢血単核球におけるthrombin receptor (ThrR)の発現と血中sCD40Lとの関連

○ 平野史倫、丸山直紀、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、羽田勝計

第47回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月24日～26日、東京、京王プラザホテル

ワークショップ「リウマチ性疾患と細胞表面分子」

RA 患者末梢血単核球(PBMC)におけるトロンビン受容体(ThrR)の発現と疾患活動性の関連

○ 平野史倫、小林厚志、小村景司、岡本健作、野村嘉伸、府川悦士、牧野勲

第47回日本リウマチ学会総会・学術集会

4月24日～26日、東京、京王プラザホテル

膠原病類似の臨床症状を呈したヒトパルボウイルス B19(B19)感染症の3例

○ 岡本健作、野村嘉伸、高橋賢治、小村景司、府川悦士、小林厚志、平野史倫、牧野勲

第2回東日本胆汁酸研究会

7月12日、仙台、エクセル東急ホテル

胆汁酸による転写因子 NF- κ B の活性化とベザフィブレートによる抑制機構の解明

旭川医科大学第二内科

○ 平野史倫、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、牧野勲

第25回胆汁酸研究会

11月1日、旭川、旭川グランドホテル

サテライトシンポジウム「胆汁酸研究の新展開」

胆汁酸とホルモン受容体—ビタミンD受容体を介した胆汁酸作用の新展開

○ 平野史倫、牧野勲

第5回日本骨粗鬆症学会

10月9日～11日、福岡、アクロス福岡

膠原病患者におけるステロイド性骨粗鬆症と骨代謝マーカー、特に sRANKL との関連について

○ 平野史倫、小村景司、野村嘉伸、府川悦士、牧野勲

(3) 出版物

なし