

受賞対象論文

Katayama A, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Teshigawara S, Kanzaki M, Nunoue T, Hida K, Wada N, Yasunaka T, Ikeda F, Takaki A, Yamamoto K, Kiyonari H, Makino H, Wada J : Beneficial impact of Gpnmb and its significance as a biomarker in nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep* (2015) 5, 16920.

片山晶博

Akihiro Katayama



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

Department of Nephrology, Rheumatology, Endocrinology and Metabolism, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

<プロフィール>

昭和55年生まれ

平成16年3月 岡山大学医学部医学科卒業
 平成16年5月 独立行政法人国立病院機構岡山医療センター 初期研修医
 平成18年4月 独立行政法人国立病院機構岡山医療センター 内科 後期研修医
 平成21年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学
 岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 医員
 平成27年8月 岡山大学病院 高度救命救急センター 医員
 平成27年10月 岡山大学病院 検査部 医員
 平成28年3月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了
 平成28年4月 厚生労働省 保険局医療課医療技術評価推進室 先端・再生医療迅速評価専門官
 現在に至る

研究の背景と経緯

近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) は世界における慢性肝疾患の主因となっており、先進国ではその頻度は30%を越えてさらに増加している。NAFLDは腹部肥満、インスリン抵抗性、高血圧、脂質異常症といったメタボリックシンドロームの構成要素と強く関連しており、メタボリックシンドロームはNAFLDの危険因子の中心的なものであるが、内臓脂肪組織と肝臓を病態生理学的につなぐ分子の存在ははっきりしていない。

我々の研究室ではメタボリックシンドロームおよび2型糖尿病の動物モデルである Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) ラットの内臓脂肪組織で特異的に発現が上昇する遺伝子群を同定し^{1,2)}、そのうちの glycoprotein nonmelanoma protein B (Gpnmb) に着目し検討を行った。Gpnmbはメラノーマ細胞、乳癌、樹状細胞などの多数の細胞・組織での発現が確認され、その可溶性分泌型の存在も報告されている。また、近年ではGpnmbが肥満で内臓脂肪組織内マクロファージに誘導されること³⁾、筋萎縮性側索硬化症患者においてGpnmbが酸化ストレスを軽減し、運動神経の変性を抑える可能性があるとも言われている⁴⁾。

今回、我々はGpnmbの遺伝子操作により脂肪組織の炎症やインスリン抵抗性が変化すると仮定し、Gpnmb欠損 (Gpnmb^{-/-}) マウスおよびaP2プロモーターを用いたGpnmbトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、表現型を検討した。当初の予想に反してGpnmb^{-/-}マウス、Gpnmb Tgマウスとともに体重や脂肪重量、脂肪組織の炎症などに変化を認めなかつたが、Gpnmb Tgマウスの肝臓において脂肪沈着および肝線維化が抑制されていることを見出した。この結果から、GpnmbはNAFLDにおける新たな治療標的分子やバイオマーカーになる可能性があると考え、Gpnmbの脂肪肝および肝線維化改善の分子機構について検討した。

研究成果の内容

1. Gpnmbは肥満で白色脂肪組織に誘導され、その可溶性分泌型は培養脂肪細胞から分泌される

まず初めに、Gpnmb mRNAの発現量が肥満状態でどのように変化するかを検討するため OLETF ラットを1年間飼育し、体重や脂肪重量、血糖値などを観察した。OLETF ラットは肥満のピークである30週齢で、白色脂肪組織における Gpnmb の遺伝子発現は最も強く、その後は糖尿病の悪化に伴い体重、脂肪重量

は減少し、脂肪組織でのGpnmbの発現も低下した。OLETFラットにインスリンを投与した群、チアゾリジン誘導体を投与した群では30週齢以降も体重増加は持続し、Gpnmbの遺伝子発現も強いままであった。この結果から、脂肪組織におけるGpnmbの発現は白色脂肪組織量や肥満の進行に関連していると考えられ、次に培養脂肪細胞である3T3-L1細胞でのGpnmbの発現を検討した。Gpnmbの遺伝子発現は前駆脂肪細胞で非常に強く、脂肪細胞に分化させると急激にその発現量は低下した。3T3-L1細胞を培養した培養上清でウエスタンプロットを施行したところ、遺伝子発現と同様に前駆脂肪細胞でGpnmb蛋白の強い発現を認め、可溶性分泌型のGpnmbを同定した。

2. Gpnmb過剰発現は肥満における肝線維化を抑制する

Gpnmb^{-/-}マウスの表現型を観察したところ、通常食(STD)群、高脂肪高蔗糖食(HFHS)群ともGpnmb^{+/+}マウスと比較して体重、脂肪重量、脂肪細胞のサイズ、耐糖能などに明らかな変化は認めなかつたが、HFHS群のGpnmb^{-/-}マウスはGpnmb^{+/+}マウスと比較して肝臓の線維化がやや進行しており、血清ALT値は上昇していた。次にaP2プロモーターを用いてGpnmbを過剰発現させたGpnmb Tgマウスを作製し、STD群、HFHS群で表現型を検討したところ、こちらも体重、脂肪重量、脂肪細胞のサイズ、耐糖能などに明らかな変化を認めなかつた。しかし、HFHS群のGpnmb Tgマウスは野生型(WT)マウスと比較して脂肪肝および肝線維化は明らかに抑制され、血清ALT値も有意に低値であった。また、各種酸化ストレスマーカーを測定したところ、Gpnmb Tgマウスの肝臓ではWTと比較して酸化ストレスが軽減していることが判明し、酸化ストレスの抑制が肝の線維化や脂肪沈着の抑制に関与していることが示唆された。

3. Gpnmbは肝マクロファージおよび肝星細胞に発現し、calnexinと相互作用している

Gpnmbが肝臓内のどの細胞に発現しているかを確認するため免疫蛍光染色を行ったところ、GpnmbはマクロファージのマーカーであるLAMP2や肝星細胞のマーカーであるGFAPなどとその発現が一致しており、Gpnmbはマクロファージおよび肝星細胞に存在すると考えられた。続いて免疫沈降法や質量解析(LC-MS/MS法)を用いてマクロファージ、肝星細胞におけるGpnmbの相互作用分子を検索したところ、

calnexinを同定した。その後、Gpnmbとcalnexinの相互作用の有無を確認するためにDuolink proximity ligation assayを用い、両者の蛋白相互作用も確認した。

4. 血中GpnmbはNASHの新規バイオマーカーになりうる

最後にGpnmbの血中濃度をELISA法で測定したところ、Gpnmb^{-/-}マウスでは測定感度以下であり、Gpnmb Tgマウスでは著明に上昇していた。また、WTマウス、Gpnmb TgマウスともにSTD群と比較してHFHS群で血中Gpnmbは有意に高値であり、血中Gpnmbは肥満により上昇すると考えられた。ヒトにおいてはNAFLD患者で血中GPNMBは著明に上昇しており、単純性脂肪肝(SS)群と非アルコール性脂肪肝炎(NASH)群に分類するとNASH群でさらに高値だった。また、AST、ALT、γGTPといった肝機能検査と血中Gpnmbは有意な単相関を認め、BMIとも有意な単相関を認めた。続いてNAFLD患者を肝線維化の程度で4群(stage 1～stage 4)に分類したところ、肝線維化が進行するに従って血中GPNMBは上昇する傾向を認めた。さらに肝硬変に至ったstage 4とそれ以前のstage 1～3で比較したところ、血中GPNMBはstage 4で有意に高値であり、ロジスティック回帰分析でも血中GPNMBは肝線維化の進行における独立した危険因子であると考えられた。以上の結果より血中GPNMBはNAFLDの進行を評価可能な新たなマーカーになりうることが示唆された。

研究成果の意義と今後の展開や展望

Gpnmbは骨芽細胞やメラノーマ、様々な癌細胞、樹状細胞などでの発現や機能が報告されており⁵⁾、白色脂肪組織や肝臓にも発現している。Gpnmbは各種細胞においてBMP-2やRANKL、CSFなどによって発現調整を受けているが、肥満状態の肝マクロファージや肝星細胞においてどのような物質がGpnmbの発現を調整するのかはまだ不明であり、本研究でも同定できなかつた。Tanakaらは筋萎縮性側索硬化症において運動ニューロンや星細胞でGpnmbの発現が上昇し、Gpnmbが酸化ストレスを軽減することで運動ニューロンの細胞死などを抑制していると報告している⁴⁾。この報告からGpnmbが酸化ストレスを抑制することで脂肪性肝疾患の進展を抑制しているのではないかと推測し検討を行ったところ、Gpnmbが肝臓における酸

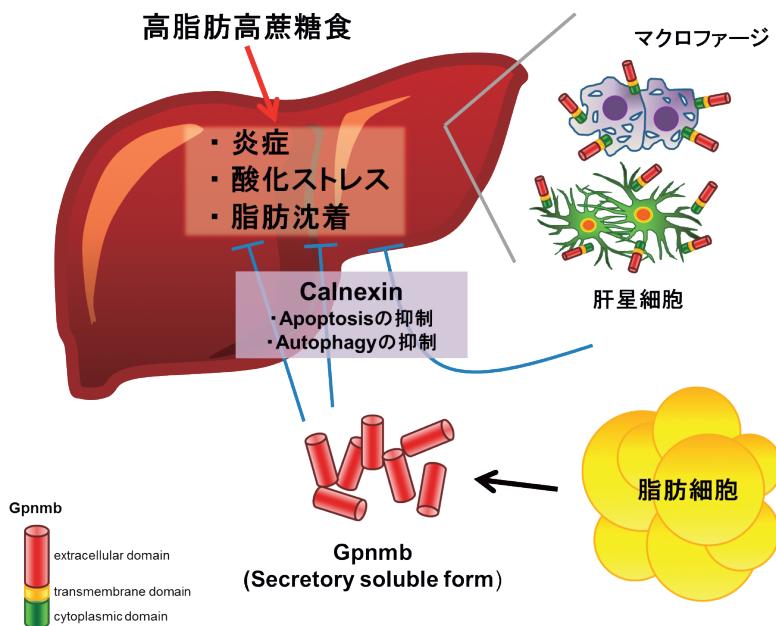


図 Gpnmb の脂肪肝・肝線維化抑制機構（仮説）
肝マクロファージや肝星細胞に過剰発現した Gpnmb、あるいは脂肪組織から分泌された可溶性分泌型 Gpnmb が小胞体上、または肝マクロファージや星細胞の膜表面の calnexin と結合し、酸化ストレスおよび肝線維化を抑制していると推測される。

※受賞論文より一部改変して引用。

本論文は Creative Commons Attribution 4.0 International License にライセンスされており、原作者のクレジット（氏名、作品タイトルなど）を表示することを主な条件とし、改変はもちろん、営利目的での二次利用も許可される。

化ストレスを抑制していることが示唆され、Gpnmb の相互作用分子として calnexin を同定した。Calnexin は小胞体に存在する 1 型膜蛋白質で新生糖蛋白質の折りたたみや組み立てに関与している。本研究結果から肝マクロファージや肝星細胞に過剰発現した Gpnmb、あるいは脂肪組織から分泌された可溶性分泌型 Gpnmb が小胞体上、または肝マクロファージや星細胞の膜表面の calnexin と結合し、酸化ストレスおよび肝線維化を抑制していることが示された。Gpnmb が calnexin を介して apoptosis や autophagy を抑制することで酸化ストレスや肝線維化を抑制している可能性があると考えられたが、このメカニズムに関しては未検討であり、今後はこの経路に焦点を絞って研究を進める必要があると考えられる。

また、現在、NAFLD において NASH の鑑別や肝線維化の進展を確認するための標準的な方法は侵襲的な肝生検であり、非侵襲的で有用な新規バイオマーカーの出現が望まれている。本研究では血清中の可溶性 GPNMB 濃度が SS 患者と比較して NASH 患者で有意に高値であることを示し、血中 GPNMB 濃度は NASH の診断に有用な可能性が示唆された。今後、NAFLD 症例を集積し、血中 GPNMB 値を測定することで肝線維化の進展評価や NASH の鑑別が可能かどうかを詳細に検討していく必要があると考えられた。また、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎などの NAFLD 以外の肝疾患患者における血中 GPNMB 値の測定を行い、この変化が NAFLD に特異的なものかどうかにつ

き検討する必要があると考えられる。最後に、Gpnmb が NAFLD に対する治療ターゲットになる可能性もあり、その有用性についても明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) Hida K, Wada J, Zhang H, Hiragushi K, Tsuchiyama Y, Shikata K, Makino H : Identification of genes specifically expressed in the accumulated visceral adipose tissue of OLETF rats. *J Lipid Res* (2000) 41, 1615-1622.
- 2) Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, Shikata K, Hourai S, et al. : Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor : a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102, 10610-10615.
- 3) Gabriel TL, Tol MJ, Ottenhof R, van Roomen C, Aten J, Claessen N, Hooibrink B, de Weijer B, Serlie MJ, Argmann C, van Elsenburg L, Aerts JM, et al. : Lysosomal Stress in Obese Adipose Tissue Macrophages Contributes to MITF-Dependent Gpnmb Induction. *Diabetes* (2014) 63, 3310-3323.
- 4) Tanaka H, Shimazawa M, Kimura M, Takata M, Tsuruma K, Yamada M, Takahashi H, Hozumi I, Niwa J, Iguchi Y, Nikawa T, Sobue G, et al. : The potential of GPNMB as novel neuroprotective factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Rep* (2012) 2, 573.
- 5) Singh M, Del Carpio-Cano F, Belcher JY, Crawford K, Frara N, Owen TA, Popoff SN, Safadi FF : Functional roles of osteoactivin in normal and disease processes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* (2010) 20, 341-357.

平成28年4月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話 : 086-235-7235 FAX : 086-224-5214

E-mail : no_rain_no_rainbow222@hotmail.co.jp