

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26460672
 研究課題名(和文) 肝硬変を引き起こすフィブリノゲン低下症の鑑別法の開発と分子生物学的発症機序解明

 研究課題名(英文) Diagnosis and molecular mechanisms for hypofibrinogenemia inducing liver cirrhosis

 研究代表者
 奥村 伸生 (OKUMURA, Nobuo)

 信州大学・学術研究院保健学系・教授

 研究者番号：60252110
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フィブリノゲン(Fbg)蓄積病(FSD)を呈するFbg低下症として6例が報告されている。早期診断法・治療薬候補を探索する研究を行った。異常Fbg産生CHO細胞を確立し、蛍光抗体法で形態学的特徴を検討した結果、FSDを引き起こす変異型では、細胞質に繊維状封入体が観察され、特異的であることが証明できた。

また、種々の薬剤を用いた封入体形成原因の検索では、封入体は異常Fbgがプロテアソーム系あるいはオートファジー系による分解を免れて形成されることが示唆された。しかし、それぞれの促進薬剤の添加では、封入体の形成を抑えられないことから、FSDの治療薬として使用できる可能性が低いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Six hypofibrinogenemic mutations have been identified in gamma-chain of fibrinogen for fibrinogen storage disease (FSD). To investigate the diagnostic test and pharmaceutical therapy for FSD, we performed research. First we established aberrant fibrinogen-producing Chinese hamster ovary (CHO) cells and observed those by immunofluorescence method using anti-fibrinogen antibody. All of six transiently transfected CHO cell lines specifically showed fibrous forms of intracellular inclusion bodies.

To analyze the mechanisms for the formation and inhibition of fibrous forms of inclusion bodies, some of anticipated inhibitor or enhancer reagents were added into the established cell lines. These results suggest that fibrous inclusion bodies are formed by the inhibition of proteasome and/or autophagy protein degradation pathway, however, enhancer reagents for these pathway does not reduce the fibrous forms. Therefore these enhancing reagents can not use as the therapeutic agent for FSD.

研究分野：血栓止血学

キーワード：フィブリノゲン低下症 フィブリノゲン蓄積症 細胞質封入体 粗面小胞体 蛍光抗体法 プロテアソーム阻害剤 オートファジー阻害剤 アポトーシス促進剤

1. 研究開始当初の背景

遺伝性フィブリノゲン(Fbg)異常症のうち活性測定値低値と蛋白測定値低値であるものをFbg低下症といい、その一部に肝細胞の小胞体内に異常Fbgが徐々に蓄積することにより肝硬変を引き起こす症例が存在する。このような病態を肝小胞体蓄積病 (hepatic endoplasmic reticulum storage disease; HERSD)という。また、Fbgが蓄積する病態をfibrinogen storage diseaseという。現在までに報告されているHERSDを呈するFbg低下症は γ G284R、 γ T314P、 γ Δ 346-350(GVYYQ)、 γ R375Wの4種類であり、このうち γ R375Wは最近わが国でも報告された (Sogo T et al, J Pediatr Gastr Nutr 2009;49:133-136)。 γ G284 \sim γ R375の間には上記以外に47種類のFbgアミノ酸異常が報告されており、そのうちの18種類がFbg低下症例である。これらのFbg低下症例の中にHERSDを呈するものが存在する可能性が強く疑われるが、現在それを発症前に鑑別診断する方法はない。我々の研究室では、長年Fbg異常症・欠損症を呈する変異FbgをChinese Hamster Ovary(CHO)細胞で産生させ、機能異常の解析を行うとともに、産生異常の機序を分子生物学的に研究を行ってきた。

我々は試みにHERSDを呈する症例中最も報告数が多く、わが国でも報告例のある γ R375Wについて、変異Fbg産生CHO細胞を作成し、FITC標識抗Fbg抗体を用いた蛍光抗体法を実施した。その結果、正常Fbg産生CHO細胞と比較して、細胞質に粗大顆粒状あるいは繊維状に染色される封入体を有する細胞が多数観察された(Kobayashi T, Arai S, et al. Thromb Res 133:101-107, 2014)。

2. 研究の目的

近年、遺伝性Fbg低下症の一部患者で、細胞外に分泌できない異常Fbgが産生細胞である肝細胞小胞体内に蓄積し肝硬変を引き起こす症例(HERSD)が報告された。このような異常Fbg産生CHO細胞を樹立し、①HERSD発症型と非発症型を発症前に非侵襲的に鑑別診断する臨床検査法を確立する、②HERSDの発症機序を分子生物学的に明らかにする、③異常Fbgの細胞内蓄積を抑制する物質を探索する、以上の三点を目的とする。これらの成果は、HERSDと同じくタンパク質フォールディング病に属するアルツハイマー病(リン酸化タウタンパクが細胞内に蓄積する)などの原因解明と治療薬探索に繋がる可能性が期待できる。

3. 研究の方法

平成26年度は、 γ R375W以外の3種類のHERSDを呈する変異Fbg産生CHO細胞とできるだけ多くのHERSD発症報告のない変異Fbg産生CHO細胞を確立し、HERSD型封入体の有無を明らかにするために、蛍光抗体法を実施した。

平成27年度は、変異Fbgを本来のFbg産生細胞である肝細胞癌由来細胞株であるHuH-7細胞で産生させ、蛍光抗体法を実施し、Fbgの細胞内封入体形成性にCHO細胞とどのような相違があるかを比較した。また、異常Fbgが小胞体あるいはライソゾームのどちらに局在しているかを電子顕微鏡で同定した。さらに、粗大顆粒状封入体と繊維状封入体の相違と相互移行性を明らかにするための、発現実験を行った。

平成28年度は、HERSDを呈する変異Fbg産生CHO細胞を用いて、正常であれば異常タンパク質を分解する小胞体関連分解(ERAD)系あるいはオートファジー分解系を阻害する試薬、あるいは促進する試薬を添加することにより、異常封入体形成の増加あるいは減少を蛍光抗体法で観察した。

4. 研究成果

平成26年度は、 γ R375W変異以外のHERSDを引き起こす γ G284R、 γ T314P、 γ Δ 346-350(GVYYQ)の3種類の遺伝性Fbg低下症について、変異Fbg安定化産生CHO細胞を確立し、特異な粗大顆粒状(LG)と繊維状(F)細胞内封入体の有無をFbg抗体を用いた蛍光抗体法で観察した。その結果、 γ T314P、 γ Δ 346-350では γ R375W-Fbgと同様のLGとF封入体が観察された。すなわち、 γ T314P(LG:27.2%, F:37.3%)、 γ Δ 346-350(LG:53.7%, F:12.3%)、 γ R375W-Fbg(LG:50.5%, F:40.0%)であった。しかし、 γ G284R変異においてはLGが8.4%, Fが0.0%であり、F封入体が観察されなかった。

一方、 γ G284 \sim γ R375の間に報告されているHERSDを引き起こした報告はないが、細胞内の異常Fbg濃度が高く、細胞外への分泌が低下している7種類のFbg低下症例(γ S313N、 γ C326A、 γ C326S、 γ C326Y、 γ M336I、 γ A341D、 γ N345D)について、変異Fbg安定化産生CHO細胞を確立し、HERSD型封入体の有無を観察した。その結果、いずれの細胞においてもF封入体は観察されず、LG封入体がそれぞれにおいて14.3、13.1、23.0、0.0、1.0、0.8、8.6%観察されただけであった。

CHO細胞を用いた実験では γ G284R変異においてF封入体が観察されなかったため、次の実験として、Fbgを産生しているヒト肝細胞であるHuH-7細胞に異常な γ 鎖を導入する一過性発現実験を行った。さらにその対照としてCHO細胞への一過性発現実験も行った。その結果、F封入体はHERSDを引き起こす γ G284R、 γ T314P、 γ Δ 346-350、 γ R375Wではそれぞれ2.1、4.5、4.0、24.5%観察された。対照としたCHO細胞でもそれぞれ4.9、5.3、3.2、22.7%観察された。すなわち、安定化産生細胞ではF封入体が観察されなかった γ G284Rにお

いても、一過性発現実験では観察することができた。このことから、F封入体の出現はHERSD発症型Fbg低下症に特異的であることが示唆された（図1-3）。

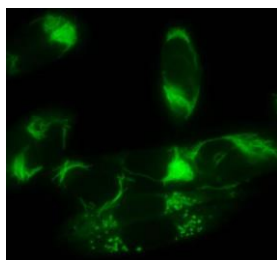


図1. γ R375W-CHO細胞（安定発現）

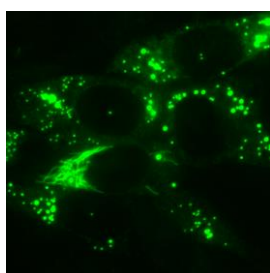


図2. γ R375W-CHO細胞（一過性発現）

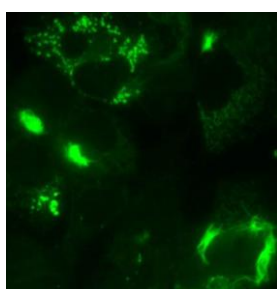


図3. γ R375W-HuH-7細胞（一過性発現）

平成27年度には平成26年に新たに論文発表されたHERSDを呈する2つの異常Fbg症、 γ D316N症例と γ G366S症例について一過性と安定発現実験を行った。この結果、安定化発現CHO細胞では、 γ D316N(LG:8.4%, F:72.1%)、 γ G366S(LG:17.7%, F:0.0%)であったが、一過性発現CHO細胞では、 γ D316N(LG:5.4%, F:35.6%)、 γ G366S(LG:5.6%, F:4.6%)、一過性発現HuH-7細胞では、 γ D316N(LG:19.7%, F:4.5%)、 γ G366S(LG:14.9%, F:3.5%)という結果となり、安定化発現CHO細胞では観察されない γ G366SのF封入体が、一過性発現CHO細胞では観察できるという前年度と同様な結果であった。また、 γ D316NのF封入体は繊維状の数が少なく太い形状で、他の5種類の細胞で観察されたものと大きく異なっていた（図4）。

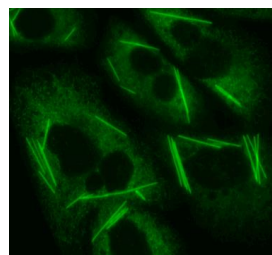


図4. γ D316N-CHO細胞（安定発現）

さらに、HERSDを呈するFbg変異においてのみ観察されたF封入体が、異常 γ 鎖だけで生じかどうかを明らかにするために、異常 γ 鎖のみ、異常 γ 鎖と正常 $A\alpha$ 鎖の組み合わせ、異常 γ 鎖と正常 $B\beta$ 鎖の組み合わせ産生CHO細胞を作成した。この結果、F型封入体は異常 γ 鎖がFbgに組み立てられるときにのみ形成されることが明らかになった。

次に、HERSD発症型Fbg低下症に特異的なF型封入体を電子顕微鏡で観察した。その結果、F型封入体は粗面小胞体であることが明らかになり、さらにその中には繊維状の構造を持つ物質(Fbg)が詰まっていることも観察された（図5,6）。

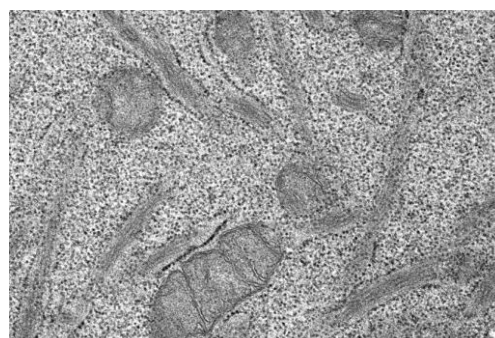


図5. γ R375W-CHO細胞（安定発現）

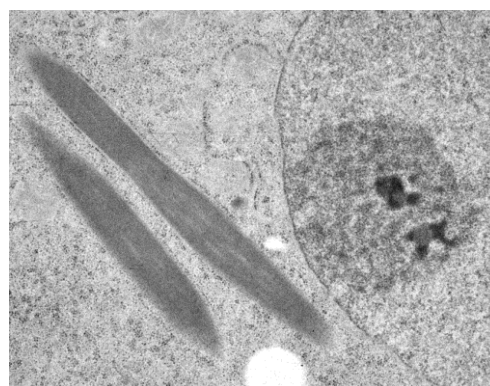


図6. γ D316N-CHO細胞（安定発現）

以上の結果をまとめると図7のようになる。すなわち、Fbg低下症患者において、一過性発現のCHO細胞を用いてF型封入体を観察す

ることにより、HERSDを呈する危険性のある遺伝子異常型を発症前にスクリーニングできる可能性が示唆された。一方、HuH-7細胞はCHO細胞に比較して、細胞の発育速度が遅いことや、細胞継代の扱いがやや難しことが欠点となった。

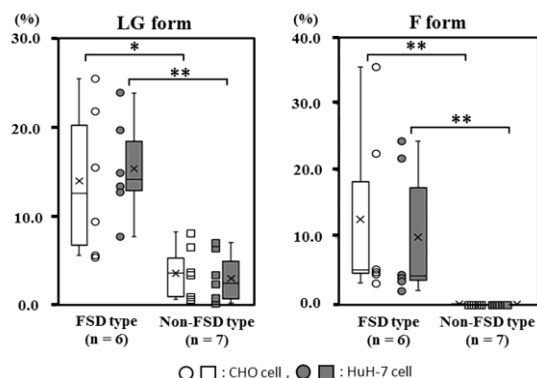


図7. 一過性発現細胞の封入体陽性率

F型封入体形成が最も顕著であった γ R375W CHO細胞において、アポトーシスの亢進がある可能性を疑い次の実験を行った。annexinVとプロピジュームヨウ素を用いたフローサイトメトリーと、Tunel法を用いたフローサイトメトリーにより、それぞれ前期アポトーシスおよび後期アポトーシスの亢進を解析した結果、どちらも正常Fbg産生CHO細胞の結果と変わらない結果であった。このことは、F型封入体を多数形成しているCHO細胞でもアポトーシスは起こらず、生存期間が正常Fbg産生CHO細胞と変わらないことが推察された。

平成28年度にはHERSD型の2種CHO細胞 (γ R375W、 γ D316N) を用いて、apoptosis促進剤、オートファジー系阻害剤、オートファジー系促進剤、プロテアソーム系阻害剤の合計13種の薬剤の添加実験を行った。細胞培養開始の翌日、薬剤を添加し3日間培養し、蛍光抗体法を実施した。

各種薬剤の影響は2種類の細胞で大きな違いがみられたが、 γ D316Nではプロテアソーム阻害剤であるLactacystinとPepstatin A、オートファジー阻害剤のSP600125において、F封入体形成を50%以上増加させた。また、両細胞でF封入体形成を20%以上減少させたのはapoptosis促進剤のKifnensineとオートファジー阻害剤のBafilomycinA1とLY294002であった。

以上の結果より、異常蛋白質分解系である

プロテアソーム系あるいはオートファジー系の働きを阻害すると、異常Fbg産生細胞においてHERSD特異的なF封入体の形成を増強することから、F封入体は異常Fbgが何らかの機序でプロテアソーム系あるいはオートファジー系による分解を免れることにより形成されることが示唆された。しかし、オートファジー系促進剤の添加では、F封入体の形成を抑えられないことから、今回使用したオートファジー系促進剤はFSDの治療薬として使用できる可能性が低いことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- ① Arai S, Ogiwara N, Mukai S, Takezawa Y, Sugano M, Honda T, Okumura N. The fibrous form of intracellular inclusion bodies in recombinant variant fibrinogen-producing cells is specific to the hepatic fibrinogen storage disease-inducible variant fibrinogen. Int J Hematol DOI 10.1007/s12185-017-2185-5. (複数査読有)

[学会発表] (計 3件)

- ① 新井慎平, 池田み奈美, 小林玉宜, 菅野光俊, 本田孝行, 寺澤文字, 奥村伸生: HERSD型遺伝子変異を有する変異フィブリノゲン/ γ 鎖産生細胞の作製と封入体形成の検討 第61回日本臨床検査医学会学術集会 (2014. 11. 22-11. 25 福岡)
- ② 新井慎平, 向井早紀, 菅野光俊, 本田孝行, 奥村伸生: γ R375W フィブリノゲン産生 CHO 細胞における封入体形成性と低フィブリノゲン血症における HERSD の検索 第62回日本臨床検査医学会学術集会 (2015. 11. 19-11. 22 岐阜)
- ③ Arai S, Mukai S, Takezawa Y, Sugano M, Honda T, Okumura N: Screening method for hepatic fibrinogen storage disease associated with congenital hypofibrinogenemia. 57 th ASH Annual Meeting (2015. 12. 5-8 Orlando FL, USA) The American Society of Hematology

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 伸生 (OKUMURA, Nobuo)
信州大学・学術研究院保健学系・教授
研究者番号：60252110

(2) 研究分担者

寺澤 文子 (TERASAWA, Fumiko)
北陸大学・新学部設置準備室・教授
研究者番号：40109210

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

新井 慎平 (ARAI, Shinpei)