

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10666

研究課題名(和文) NASHにおける肝線維化と肝内マクロファージ活性化における組織線溶因子の役割

研究課題名(英文) Role of tissue fibrinolytic factors in NASH liver fibrosis and intrahepatic macrophage activation

研究代表者

岩城 孝行 (Iwaki, Takayuki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70509463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自然発症動脈硬化モデルであるL-/-/A-/-マウスを用いてNASHモデルを作製することで、LDL高値を示し、線維化も顕著に促進することが確認された。通常のマウスではリポタンパク分画としてLDL分画がほとんど認められないため、LDLによるNASH病態への影響を評価することが可能になった。今後はLDLにより修飾される細胞、とりわけマクロファージに対する影響を凝固線溶因子と絡めて評価していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回作製したNASHモデルは顕著な高LDL血症を示す実験モデルであり、従来のモデルでは評価できないVLDLによる病態への影響を評価することが可能となっている。今後NASHにおけるLDLコレステロールの影響に関して本モデルを用いて研究することで、現在有効な治療薬が存在しないNASHにおける有望な治療薬が開発される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：L-/-/A-/- mouse model is characterized as spontaneous LDL-C driven atherosclerosis model. We have established a NASH model by using L-/-/A-/- mouse model, in which hepatic foam cell formation of macrophages were observed with massive fibrosis. Since the LDL fraction is hardly observed as a lipoprotein fraction in Wt mice, it will be possible to evaluate the effect of LDL on NASH pathology in our murine system. For the next steps, we are planning to evaluate the effects on cells modified by LDL, especially macrophages, in connection with coagulation/fibrinolytic factors.

研究分野：血液凝固線溶、脂質代謝異常、動脈硬化

キーワード：LDL apoB100 Macrophage Foam cell NASH Fibrosis

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プラスミン(Plasmin: Plm)は、その前駆物質であるプラスミノゲン(Plasminogen: Plg)から、組織型やウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(tissue type or urokinase type Plasminogen Activator: tPA or uPA)による触媒作用により産生される。Plm は凝固血栓の主要成分であるフィブリンを溶解する反応(線溶反応)の主要因子であるが、血管外組織における線維成分の溶解にも重要な役割を担っている(組織線溶)。ペスト菌感染や溶連菌感染において組織壊死を引き起こす致死的原因はすべて Plm による組織線溶の結果である。Plm、PA は大多数の凝固因子と同様に、触媒部位は消化酵素であるトリプシンと類似の構造を示すセリン酵素であり、プラスミノゲン活性抑制因子(Plasminogen Activator Inhibitor-1: PAI-1)は、PA を特異的に阻害するセリン酵素阻害因子である。血中 PAI-1 値はメタボリック症候群における指標の一つとされ、その増加が血栓性の疾患(心筋梗塞や脳梗塞)のリスクとなることが知られており、最近 PAI-1 阻害薬の開発が盛んで、臨床試験への導入もなされている。

メタボリック症候群の増加は血栓性疾患のみならず他の疾患の原因ともなっており、その中でも非アルコール性脂肪肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)は増加傾向であり、最近の米国の報告では成人の3分の1が罹患していると推定されており1、最近の日本の大規模調査でも成人罹患率は29.7%にも及ぶことが判明している2。NAFLD 罹患者の大部分は病態がほとんど進行しないと考えられる非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver: NAFL)に分類されるが、進行性で肝硬変や肝癌に発生母地となる非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)に分類されるものも存在する。NASH の組織学的特徴は脂肪変性、炎症反応などの所見があり、肝細胞の風船様変性や線維化を認めるものは特に重症であることが知られている。

最近、血中 PAI-1 特に活性型の PAI-1 が NASH と非 NASH を識別する際に非常に有用なマーカーになることが指摘された3。この現象は NASH における線維化反応に PAI-1 による組織線溶の調節機構が関与していることを示唆している。しかし、組織線維化が病態進行にどのように影響しているか、つまり原因か結果か、について解析するための動物モデル、特に線溶関連遺伝子を改変したノックアウトマウス等を利用した解析はほとんど進んでいない。

### 2. 研究の目的

線溶阻害因子である PAI-1 の血中濃度の上昇は血栓性疾患のリスク因子として知られるのみでなく、NASH のような組織の線維化病態において著増することが知られている。NASH における組織の線維化は重症度と相関するが、線維化が病態の主因であるかについての線溶系の遺伝子改変動物を用いた包括的な検討は行われていない。また、肝内マクロファージの活性化が NASH の病態に影響しているとされているが、マクロファージ表面上には Plg レセプターが発現しており、Plm 産生がマクロファージの活性化を促し NASH を増悪させる可能性も考えられる。そこで本研究では、NASH モデル作製の検討を行い、次に NASH 病態と線溶因子との関係を検討する。

### 3. 研究の方法

今回の研究では、野生型のマウス(Wt マウス)及び LDL 受容体と apobec-1 をダブルノックアウトさせることで高脂血症を示すマウス( $L^{-/-}/A^{-/-}$ マウス)を用いて NASH モデルを作製し、評価を行うこととした。 $L^{-/-}/A^{-/-}$ マウスは Wt マウスと異なり LDL コレステロール分画を顕著に認めるモデルであるため、既存のマウスモデルでは評価できなかった LDL による NASH への影響が考えられ、ヒト臨床に近いモデル動物になることが期待される。

また NASH モデルにおける線溶系因子 Plg の役割を評価するために、Plg をノックアウトさせたマウスを用いる。

#### NASH モデルの作製

(1) BCG により肝内マクロファージを予め活性化し、その後に四塩化炭素を週に2回、12週齢まで腹腔内投与した。BCG は生理食塩液(saline)に、四塩化炭素は Olive oil(Oil)に溶かした。

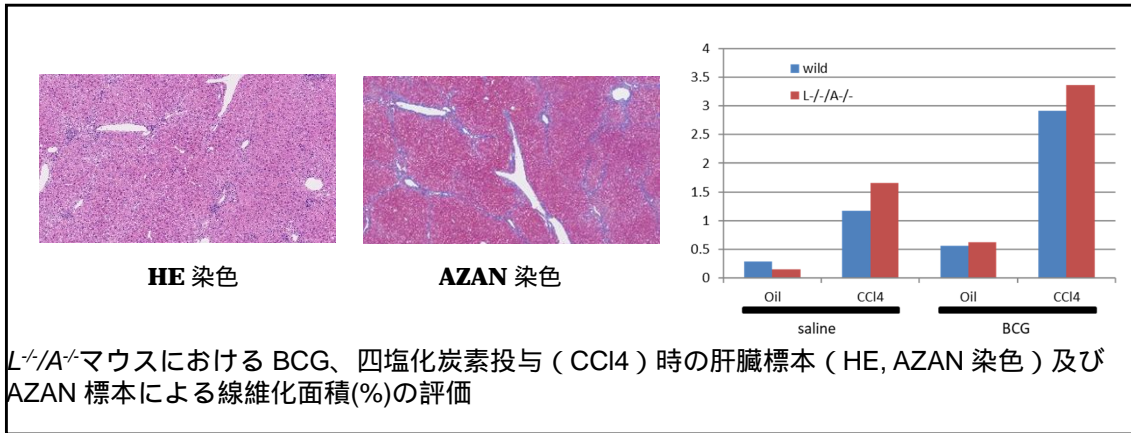
(2) BCG により肝内マクロファージを予め活性化し、その後にアセトアミノフェンを自由摂餌にて24週間投与した。

(3) 生後約2日齢で streptozotocin(STZ)を投与し、その後高脂肪食(HFD)にて飼育した。

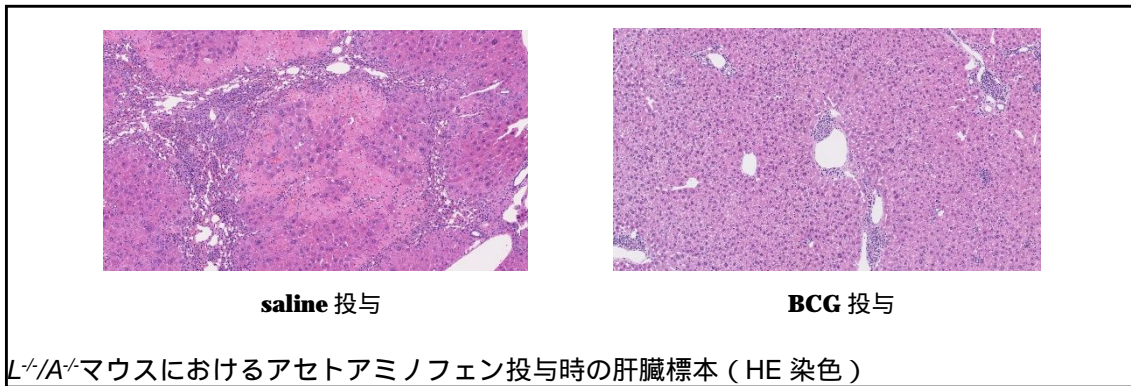
### 4. 研究成果

#### NASH モデルの作製

(1) BCG によるプライミングと12週間の四塩化炭素投与により肝臓の線維化は顕著に確認されたが、脂肪化が Wt と  $L^{-/-}/A^{-/-}$ マウス共に認められず、NASH 病態を作製するに至らなかった。



(2) アセトアミノフェンの自由摂餌によって、肝臓での炎症・肝細胞の壊死は確認されたが、脂肪化及び線維化は確認されず、NASH 病態の作製に至らなかった。また BCG によるプライミングではむしろ肝細胞の壊死等が軽減された。



3. Wt マウスと  $L^{-/-}A^{-/-}$ マウス共に顕著な NASH 病態が認められた。さらに、NASH の重症度指標の一つである NAS スコアには変化を認めなかったものの、 $L^{-/-}A^{-/-}$ マウスでは Wt マウスに比べて顕著な線維化亢進が認められた。

以上の結果から  $L^{-/-}A^{-/-}$ マウスを用いることによって、LDL による NASH 病態の悪化の可能性が示唆された。既存のマウスモデルではリポタンパク分画において LDL 分画が認められないが、本モデルでは LDL 分画が存在し、LDL によって影響されるマクロファージの NASH への影響を評価するために理想的であると思われる。今後はこのモデルを用いて、マクロファージの形態や機能における凝固線溶因子の評価及び機序等を研究していく予定である。

<引用文献>

- Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. (2011) Gastroenterology 140:124-131
- Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T. (2012) J Gastroenterol 47:586-595
- Ajmera V, Perito ER, Bass NM, Terrault NA, Yates KP, Gill R, Loomba R, Diehl AM, Aouizerat BE. (2017) Hepatology 65:65-77

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Urano T, Suzuki Y, Iwaki T, Sano H, Honkura N, Castellino FJ.	4. 巻 20
2. 論文標題 Recognition of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 as the Primary Regulator of Fibrinolysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Drug Targets.	6. 最初と最後の頁 1695-1701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389450120666190715102510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwaki T, Hara K, Umemura K.	4. 巻 170
2. 論文標題 Nanobody production can be simplified by direct secretion from Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Protein Expr Purif	6. 最初と最後の頁 105607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pep.2020.105607.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyajima C, Iwaki T, Umemura K, Ploplis VA, Castellino FJ	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of Atherosclerosis Formation in a Murine Model of Type IIa Human Familial Hypercholesterolemia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 1878964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/1878964	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka H, Iida Y, Iwaki T, Suzuki Y, Sano H, Miyajima C, Zaima N, Sasaki T, Sumioka A, Hakamata S, Shimizu H, Umemura K, Urano T.	4. 巻 48
2. 論文標題 Elevated Plasma Levels of LDL Cholesterol Promote Dissecting Thoracic Aortic Aneurysms in Angiotensin II-Induced Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Vasc Surg	6. 最初と最後の頁 204-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2017.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwaki, T. Nagahashi, K. Takano, K. Suzuki-Inoue, K. Kanayama, N. Uemura, K. Urano, T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Mutation in a highly conserved glycine residue in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 causes polymerisation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Thromb Haemost	6. 最初と最後の頁 860-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1160/TH16-07-0572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagahashi, K. Uemura, K. Kanayama, N. Iwaki, T.	4. 巻 69
2. 論文標題 Successful synthesis of active human coagulation factor VII by co-expression of mammalian gamma-glutamyl carboxylase and modification of vit.K cycle in Drosophila Schneider S2 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 317-327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10616-016-0059-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka, H. Zaima, N. Sasaki, T. Yamamoto, N. Inuzuka, K. Yata, T. Iwaki, T. Uemura, K. Sano, H. Suzuki, Y. Urano, T. Setou, M. Unno, N.	4. 巻 54
2. 論文標題 Lysophosphatidylcholine Acyltransferase-3 Expression Is Associated with Atherosclerosis Progression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vasc Res	6. 最初と最後の頁 200-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000473879	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩城 孝行
2. 発表標題 IIa型高脂血症モデルであるLdlr-/-/Apobec1-/- (L-/-/A-/-) マウスにおける動脈硬化症と血液凝固線溶因子の関係
3. 学会等名 第50回日本動脈硬化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩城 孝行
2. 発表標題 最近のPAI-1の話題
3. 学会等名 第3回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩城孝行
2. 発表標題 A mutation of highly conserved glycine in strand 5B of plasminogen activator inhibitor 1 caused its deficiency due to self-polymerization, which was also observed in other serine proteinase inhibitors.
3. 学会等名 第39回日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------