

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07077

研究課題名(和文) NASHの新規治療観点となる細胞種特異的IVA型PLA2の制御による肝線維化抑制

研究課題名(英文) Inhibition of liver fibrosis by cell type-specific deficiency of group IVA PLA2 as a novel therapeutic strategy for NASH

研究代表者

秋葉 聡 (AKIBA, Satoshi)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70231826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、線維化の進展に伴い予後不良の肝硬変や肝がんの発症リスクが上昇することから、NASH線維症に対する治療が重要課題である。NASHでの肝線維化は炎症により進展することから、線維症の治療標的分子として起炎分子産生の初発反応を担うIVA型ホスホリパーゼA2(IVA-PLA2)に着目した。本研究では、類洞内皮細胞のIVA-PLA2が、NASHの進展過程における毛細血管化および肝星細胞の活性化を亢進し、肝線維化を促進することを明らかにした。さらに、肝星細胞のIVA-PLA2はMCP-1の発現を介して、肝線維化の要因となる単球等、白血球の浸潤に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝組織の類洞内皮細胞または肝星細胞のIVA-PLA2を選択的に欠損させたマウスにおいて、高脂肪食誘発性のNASH病態における肝線維化が軽減することを見出した。このことから類洞内皮細胞のIVA-PLA2は毛細血管化および肝星細胞の活性化を介して、肝星細胞のIVA-PLA2は単球走化因子の発現を介して、それぞれ肝線維化を進展させる分子機構を解明した点で学術的意義は高い。さらに本研究結果は、類洞内皮細胞と肝星細胞のIVA-PLA2を阻害することが、副作用の発現リスクを抑えた高効果的な肝線維症の治療に繋がることを示しており、NASHの薬物療法の実現化に貢献する点で社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is characterized by hepatic fibrosis with inflammation. However, effective pharmacotherapeutic strategies for hepatic fibrosis remain to be established. Among the initiators of inflammation, we have been investigating the possible involvement of group IVA phospholipase A2 (IVA-PLA2), which catalyzes the generation of lipid proinflammatory mediators, in the progression of hepatic fibrosis. The present study explored which types of cells in the liver are involved in IVA-PLA2-mediated hepatic fibrosis using cell-specific IVA-PLA2-conditional knockout mice. The results suggest that IVA-PLA2 in endothelial cells plays a role in the hepatic stellate cell (HSC)-mediated progression of hepatic fibrosis. Furthermore, IVA-PLA2 in HSCs mediates the generation of monocyte chemotactic protein-1, which induces infiltration of monocytes/macrophages that activate HSCs. Thus, IVA-PLA2 may be a pharmacotherapeutic target for hepatic fibrosis in NASH.

研究分野：病態生化学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝線維化 ホスホリパーゼA2 類洞内皮細胞 肝星細胞

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患は、過度な飲酒やウイルス感染に起因しない脂肪性肝疾患の総称であり、単純性脂肪肝と進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) に分類される。NASH は、肝での脂肪蓄積にはじまり、炎症反応および肝実質細胞風船化、肝線維症を伴う進行性の慢性肝炎である。NASH 患者は自覚症状に乏しいため NASH の早期発見が困難であり、また、線維化の進展に伴い予後不良の肝硬変や肝がんの発症リスクが上昇することから、特に NASH 線維症に対する治療が重要課題である。

NASH の発症進展機構としては、必ずしもすべての症例が脂肪肝を経由して進行せず、多様な要因が影響し合い NASH が発症するというマルチヒット仮説が提唱されている。この説では、生活習慣に起因したインスリン抵抗性に伴う肝での遊離脂肪酸の蓄積や脂質代謝異常、酸化ストレスによるミトコンドリア機能障害、肝細胞死、炎症性サイトカインおよびケモカインの産生に伴う単球浸潤をはじめとした炎症反応、さらには肝線維化などの複数の要因が複雑に影響し合っており NASH の病態は発症・進展すると考えられている。

現在、運動や食餌療法による生活習慣の改善が NASH に対する第一選択の治療法として推奨されているが、本療法には長期間を要し、患者のコンプライアンス不良が大きな障害となっていることから、NASH の線維症の治療に向けた薬物療法の確立が求められている。しかしながら、ペロオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ 作動薬であるピオグリタゾンや抗酸化薬であるビタミン E の投与が試みられたものの、肝線維症に対して治療効果はみられていないのが現状である。それゆえ、NASH での肝線維症に対する新規薬物療法の確立が求められている。

2. 研究の目的

NASH での肝線維化は炎症により進展することを踏まえ、以前より報告者は、リン脂質水解酵素であるホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) の種々のアイソザイムのうち、IVA 型に分類される PLA₂ (IVA-PLA₂) が脂質性起炎分子の産生を担うことから、本酵素が NASH での炎症に伴う肝線維症の治療標的分子となる可能性について検証している。その根拠として、本研究の着想時点では、IVA-PLA₂ の全身性欠損マウスにおいて肝線維化が抑制されることを見出していたからであるが、IVA-PLA₂ は全身の細胞に普遍的に発現しており、本酵素を介した炎症の制御や恒常性の維持を担う細胞も存在することから、細胞種非選択的な本酵素の阻害は治療効果の低下や副作用の発現リスクの上昇に繋がる可能性が危惧される。このことを考慮すると、IVA-PLA₂ を治療標的とした肝線維症の薬物療法の確立には本酵素を介した肝線維化を担う責任細胞を同定することが必須となる。

NASH の病態においては、肝組織を構成する肝実質細胞での脂肪蓄積および脂肪毒性、血管(類洞)を構成する類洞内皮細胞の形態変化や機能不全、単球の浸潤・マクロファージからの種々のメディエーターの分泌、さらには、活性化肝星細胞からのコラーゲン線維の分泌などの様々な細胞応答や機能変化が肝線維化過程に関与している。これらの肝構成細胞のいずれもが IVA-PLA₂ を発現していることから、本酵素を介した肝線維化の責任細胞種を明確にするために、本研究では、細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを用い、NASH での肝線維化における各種肝構成細胞の本酵素の関与を検証した。

3. 研究の方法

(1) NASH における肝線維化への類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ の関与

本研究では、Cre-loxP システムでの条件依存的な遺伝子組換え実験系により、全身性、または、肝実質細胞、内皮細胞/類洞内皮細胞、単球・マクロファージ、肝星細胞の各細胞種において選択的に IVA-PLA₂ を欠損させた IVA-PLA₂ コンディショナル欠損 (IVA-PLA₂-CKO) マウスを作出して用いた。これらの全身性または細胞種選択的 IVA-PLA₂-CKO 欠損マウスに対し、短時間で脂肪肝および肝線維化を誘発するコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食飼料 (choline-deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet with 0.1% methionine: CDAHFD) を 3 週間摂食させることで、CDAHFD 誘発性 NASH モデルを作製し、肝障害、肝線維化および脂肪肝形成を組織学的および生化学的に解析した。また、血清肝逸脱酵素である AST・ALT の活性および肝トリグリセリド量の測定により肝障害および脂肪肝形成の程度を、肝組織切片のピクロシウスレッド染色によりコラーゲンの蓄積に伴う線維化の程度をそれぞれ評価した。さらに、肝星細胞の活性化マーカーである α -平滑筋アクチン (α -SMA) の発現量をイムノプロット法および免疫染色により解析した。その結果から、NASH での肝線維化における各種肝構成細胞の IVA-PLA₂ の関与を検証した。

(2) NASH における肝線維化進展への肝星細胞の IVA-PLA₂ の関与

活性化した肝星細胞は炎症を伴う肝線維化に重要な役割を果たしており、肝星細胞の活性化は、形質転換増殖因子- β (TGF- β) や腫瘍壊死因子- α (TNF- α) などの炎症性メディエータ

一によって誘起される。TGF- β 1 によるラット由来肝星細胞の活性化が、IVA-PLA₂ の阻害剤によって抑制されることが培養細胞系の実験において報告されているから、肝星細胞の活性化への IVA-PLA₂ の関与が示唆されている。このことと、NASH の治療には生活習慣の改善策の1つとして食餌療法が推奨されていることを踏まえ、この食餌療法を想定した実験系において肝星細胞の IVA-PLA₂ の治療標的としての可能性を検証した。その実験系としては、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO 欠損マウスまたは対照マウスに CDAHFD を9週間摂食させて、NASH における高度の脂肪肝および肝線維症を誘発した後、一旦、普通食を5週間摂食させた系を用いた。その後、肝線維化および脂肪肝形成を組織学的および生化学的に解析した。

4. 研究成果

(1) NASH における肝線維化への類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ の関与

本研究では、NASH の病態に対する細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損の影響から、IVA-PLA₂ を介した NASH 進展を担う責任細胞種を特定することを試みた。Cre/loxP システムでの条件特異的遺伝子破壊法により、全身性に IVA-PLA₂ を欠損させたマウスの他、脂肪滴を含む肝実質細胞、線維化促進因子を分泌する内皮細胞/類洞内皮細胞や単球・マクロファージ、およびコラーゲン産生を担う活性化肝星細胞の各細胞において選択的に IVA-PLA₂ を欠損させたマウスに、CDAHFD を3週間摂食させ、NASH 初期段階の病態モデルを作製し解析した。その結果、CDAHFD により肝障害や脂肪肝形成が誘発されたが、これらは全身性および各細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損により軽減されなかった。一方、CDAHFD による肝線維化は、対照マウスに比し全身性および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスでは有意に抑制されたが、他の細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは抑制効果はみられなかった (図1)。

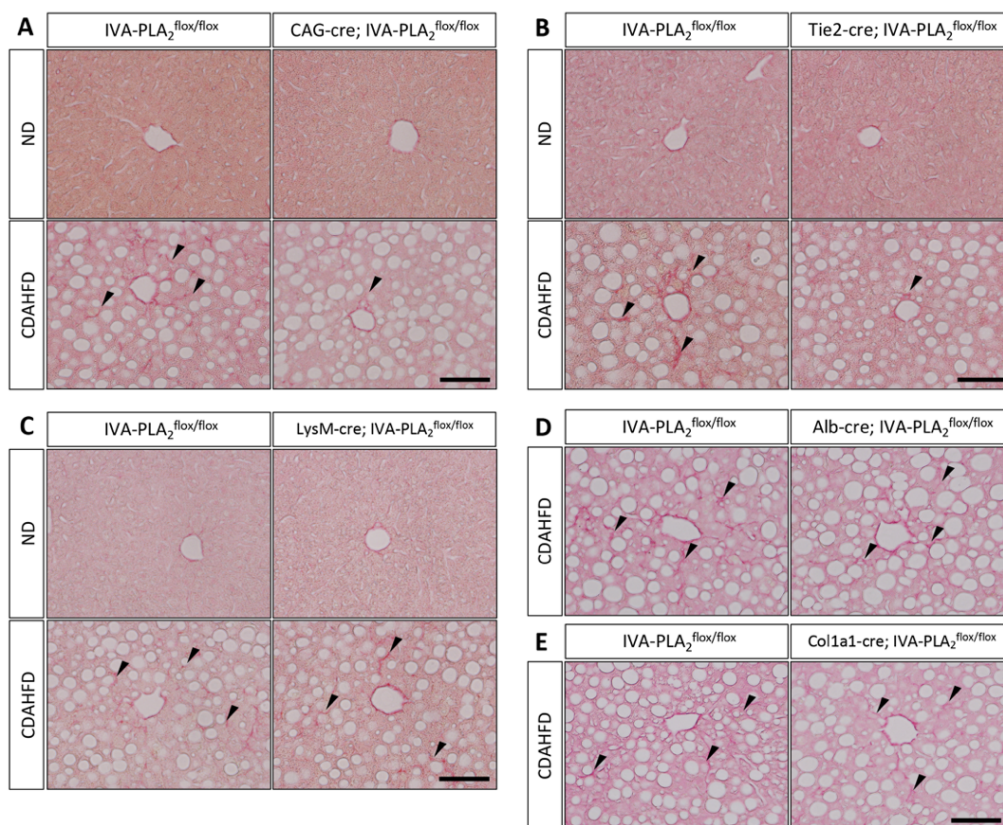


図1 Effects of cell type-specific IVA-PLA₂ deficiency on CDAHFD-induced hepatic fibrosis Paraffin-embedded liver sections were stained with picrosirius red.

(A-E) は、以下の各 IVA-PLA₂-CKO マウス (右側) および対照マウス (左側) の結果を示す。(A) 全身性, (B) 内皮細胞/類洞内皮細胞, (C) 単球・マクロファージ, (D) 肝実質細胞, (E) 肝星細胞. スケールバー: 200 μ m. ND: 普通食, CDAHFD: 高脂肪食.

また、CDAHFD による α -SMA 発現量および α -SMA 発現細胞数の増加が、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスにおいて低減していたことから、類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が肝星細胞の活性化を促進することが明らかになった。さらに、類洞内皮細胞の毛細血管化が肝星細胞の活性化を促進することから、毛細血管化の指標となる類洞内皮の小孔数の減少程度を走査電子顕微鏡にて観察した結果、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスでは、

CDAHFD による毛細血管化が顕著に抑制された (図 2)。以上のことから、NASH の進展において、類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が類洞内皮の毛細血管化を亢進するとともに、肝星細胞の活性化や肝線維化を促進することが示唆され、類洞内皮細胞が IVA-PLA₂ を介した NASH 進展を担う責任細胞種であると考えられる。

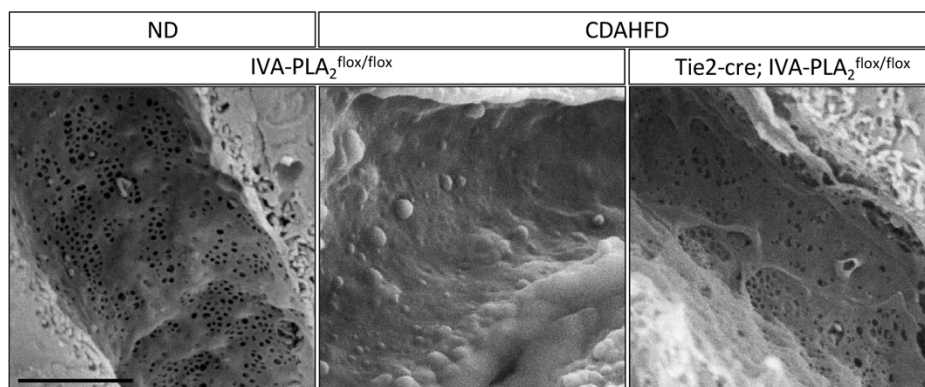


図 2 Effects of EC/LSEC-specific IVA-PLA₂ deficiency on sinusoidal capillarization on a CDAHFD. 内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウス (右側) および対照マウス (中央, 左側) の結果を示す. スケールバー: 2.5 μ m. ND: 普通食, CDAHFD: 高脂肪食。

(2) NASH における肝線維化進展への肝星細胞の IVA-PLA₂ の関与

高脂肪食下の肝組織では、IVA-PLA₂ が産生を担う脂質性起炎因子以外に、コラーゲン産生促進因子である TGF- β 1 や、炎症性サイトカインなどの複数の因子が肝星細胞を活性化させる。このことを踏まえ、前項 (1) において、肝星細胞での IVA-PLA₂ の欠損が高脂肪食下での肝線維化に影響しなかった結果は、肝星細胞活性化因子群が共存していたことに起因すると考えられ、高脂肪食の影響を除く目的で普通食へと切り替えた条件下では肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ の欠損が肝線維化に対して抑制効果を示す可能性がある。そこで本研究では、この食餌療法を想定した実験系にて肝星細胞 IVA-PLA₂ の肝線維化への関与について検証した。肝星細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスおよび対照マウスに CDAHFD を 9 週間投与し、著しい脂肪肝および白血球の浸潤を伴う肝線維化を誘発した後、普通食を 5 週間摂食させたところ、両遺伝子型マウスとも脂肪滴はほぼ消失した。しかしながら、対照マウスでの肝線維化の程度は約 2 倍に増大しており、CDAHFD 投与下にみられた白血球の浸潤はほとんど抑制されていなかった。一方、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスでの普通食投与後の肝線維化の増加は 1.3 倍程度で統計学的に有意な差はなく、白血球の浸潤は有意に抑制されていた。これらのことから、食餌療法後の線維症の悪化は肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損により軽減されることが判明した。さらに、対照マウスの肝組織では、単球の浸潤を担う単球走化因子 (MCP-1) の遺伝子が CDAHFD 投与下に発現していたが、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスでの発現量は対照マウスに比し有意に低下していた。なお、普通食投与後の MCP-1 遺伝子の発現量は、両遺伝子型マウスとも CDAHFD 投与下に比しほぼ低下しており、同程度であった。このように、食餌療法下に肝星細胞の IVA-PLA₂ 欠損による抗炎症および抗線維化効果がみられたことは、白血球浸潤や肝線維化への肝星細胞 IVA-PLA₂ の促進的な関与を示唆しており、肝星細胞由来の MCP-1 に応答した単球の浸潤がその機構の一端を担っていると推察する。

(3) 結論

本研究では、類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が、NASH の進展過程における毛細血管化および肝星細胞の活性化を亢進し、肝線維化を促進することを明らかにした。さらに、肝星細胞の IVA-PLA₂ は MCP-1 の発現を介して、肝線維化の要因となる単球等、白血球の浸潤に関与することを見出した。これらの得られた知見は、NASH での肝線維化の進展分子機構を提示するものであり、学術的に意義があると考えられる。また、本研究での成果は、食餌運動療法と併せて類洞内皮細胞と肝星細胞の IVA-PLA₂ を選択的に阻害することが、副作用の発現リスクを抑えた、高効果的な線維症の治療に繋がることを示唆しており、NASH の薬物治療の実現化に貢献する点で社会的意義が高い提示であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawashita E., Ozaki T., Ishihara K., Kashiwada C., Akiba S.	4. 巻 294
2. 論文標題 Endothelial group IVA phospholipase A2 promotes hepatic fibrosis with sinusoidal capillarization in the early stage of non-alcoholic steatohepatitis in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2022.120355	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 Ozaki T., Kawashita E., Ishihara K., Akiba S.	4. 巻 46
2. 論文標題 Deficiency of group IVA phospholipase A2 in collagen-producing cells alleviates the aggravated hepatic fibrosis in high-fat diet-fed mice after returning to a normal diet	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 488 ~ 493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00862	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 泰地健芳, 河下映里, 石原慶一, 秋葉 聡
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎に対する細胞特異的IVA型ホスホリパーゼA2欠損の影響
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泰地健芳, 河下映里, 石原慶一, 木村徹也, 保田史織, 秋葉 聡
2. 発表標題 NASH病態進展および肝修復過程における肝星細胞のIVA-PLA2の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松代美礼, 河下映里, 石原慶一, 泰地健芳, 奥村綾茄, 親川奈未, 秋葉 聡
2. 発表標題 NASH肝線維化進展における内皮細胞のIVA型ホスホリパーゼA2の関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泰地健芳, 河下映里, 石原慶一, 木村徹也, 秋葉 聡
2. 発表標題 肝星細胞のIVA型ホスホリパーゼA2欠損による肝線維化の修復促進
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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