

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：25301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23293

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎の進展における血小板型12-リポキシゲナーゼ発現調節機構

研究課題名(英文) Study on the expression regulation of platelet-type 12-lipoxygenase in the development of non-alcoholic steatohepatitis.

研究代表者

戸田 圭祐 (Toda, Keisuke)

岡山県立大学・保健福祉学部・助教

研究者番号：80881630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の進展における肝星細胞の活性化と筋線維芽細胞への分化に伴って発現レベルが上昇する、血小板型12-リポキシゲナーゼの発現調節機構について検討を行った。マウス肝星細胞の初代培養細胞を用いた検討では、培養0日目と比べて培養1日後に本酵素の発現が顕著に低下したことから、まずはin vitroにおける本酵素の発現を維持できるような条件を検討する必要がある。次にヒト肝星細胞株を用いて、肝線維化に関連するサイトカインを添加した時の血小板型12-リポキシゲナーゼの転写活性を測定したところ、有意な上昇は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、血小板型12-リポキシゲナーゼ発現調節機構が明らかになり、NASHにおける肝線維化の機序が解明された場合、アルコール性肝炎やウイルス性肝炎など他の多くの慢性炎症性肝疾患の進展における肝線維化の理解にも応用できる可能性があると考えられ、本研究の学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the regulatory mechanism of the platelet-type 12-lipoxygenase expression. The expression level of platelet-type 12-lipoxygenase on day 1 was significantly reduced compared with that on day 0 in mouse primary hepatic stellate cells. Therefore, it was necessary to find the culture conditions of the cells in which the expression of the enzyme was maintained. The mRNA level of the platelet-type 12-lipoxygenase as examined RT-PCR was not increased by the addition of cytokines associated with progression of liver fibrosis.

研究分野：脂質生化学

キーワード：12-リポキシゲナーゼ 肝星細胞 非アルコール性脂肪性肝炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、著しいアルコールの摂取がないにも関わらずアルコール性肝炎類似の肝組織所見を呈し、進行すると肝臓における炎症から肝細胞が傷害され、肝臓の線維化を引き起こし、高率に肝硬変や肝臓癌に至る可能性のある疾患であるが、その発症進展のメカニズムについては未だに明らかになっておらず、確立された薬物療法は知られていない。

12-リポキシゲナーゼはオメガ 6 系不飽和脂肪酸のアラキドン酸に立体特異的に酸素を添加し、過酸化脂質の 12-ヒドロペルオキシ酸を生成する酵素で、血小板型、白血球型、皮膚型の 3 つのアイソザイムが知られている。これまで本研究室において、正常のマウス肝臓では 12-リポキシゲナーゼ活性がほとんど検出されず、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食投与により作製した NASH モデルマウス肝臓において検出できるレベルまで活性が上昇すること、免疫沈降によりその活性に寄与するアイソザイムが血小板型 12-リポキシゲナーゼであることを明らかにした。さらに、この血小板型 12-リポキシゲナーゼは肝星細胞に発現しており、NASH 進展における肝星細胞の活性化と筋線維芽細胞への分化に伴って、その発現レベルが上昇することが明らかとなった。

以上のことは、本酵素が NASH の進展に伴う肝線維化の段階において、何らかの役割を果たすことを強く示唆する。これまでヒト類表皮癌細胞やヒト赤白血病細胞を用いた本酵素の発現調節機構についてはいくつか報告があるが、肝星細胞における調節機構については報告がない。

2. 研究の目的

NASH 進展における肝線維化の過程で、肝星細胞に局在する血小板型 12-リポキシゲナーゼがどのように発現調節されているのか、ひいては、本酵素の発現調節が、NASH 進展にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウスの初代培養肝星細胞における遺伝子発現動態

C57BL/6J マウスの肝臓を EGTA 液、コラゲナーゼ液で処理し、Opti-prep を用いた密度勾配遠心法により肝星細胞を単離し、20% FBS 含有培地で 0~7 日間培養した。それぞれの日数が経過した細胞は TRI reagent (Molecular Research Center 社) を用いて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 社) を用いて cDNA を合成した。SsoAdvanced™ SYBR Green Supermix (Bio Rad 社) を用いて、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社) により遺伝子発現を解析し、GAPDH をハウスキーピング遺伝子として相対的発現量を比較した。

(2) ヒト肝星細胞株における血小板型 12-リポキシゲナーゼの転写活性

ヒト血小板型 12-リポキシゲナーゼの 5' 非翻訳領域を *Gussia Luciferase (Gluc)* 遺伝子の 5' 上流につなぎ、導入効率を補正するために CMV プロモーターの下流に分泌型アルカリホスファターゼ (*SeAP*) 遺伝子を有するプラスミド (HPRM30641-PG04, GeneCopoeia 社) をヒト肝星細胞の TWNT-1、LX-2 細胞に導入し、肝線維化に関連するサイトカインである TNF- α 、TGF- β 、MCP-1、PDGF、CTGF で刺激し、Gluc と SeAP の酵素活性を *Secrete-Pair Dual Luminescence Assay Kit* (GeneCopoeia 社) を用いてルミノメーターで測定した。

4. 研究成果

(1) マウスの初代培養肝星細胞における遺伝子発現動態

調製したマウスの初代培養肝星細胞を 20% FBS 存在下で 0~7 日間培養すると、日数が経過するごとに活性化肝星細胞に特徴的な突起を伸ばす様子が観察された。図 1 に示すように肝星細胞の活性化マーカーとして汎用されている *Col1a1* (2 つの $\alpha 1$ 鎖および 1 つの $\alpha 2$ 鎖から成る三重らせんを有する I 型コラーゲンのプロ $\alpha 1$ 鎖をコードする遺伝子) と *Acta α* (タンパク名: α -SMA) の発現は培養日数依存的に発現が上昇した。一方で、*Alox12* (タンパク名: 血小板型 12-リポキシゲナーゼ) の発現は培養後 1 日で顕著に低下した。今後、本酵素の発現を維持できる条件を探索し、その後、NASH によって発現が上昇するサイトカインに対する応答について検討する予定である。

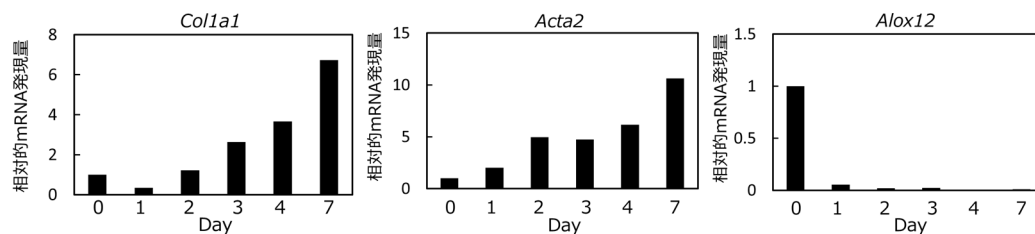


図1 マウス初代培養肝星細胞の遺伝子発現動態

(2) ヒト肝星細胞株における血小板型 12-リボキシゲナーゼの転写活性

ヒト肝星細胞株、TWNT-1 と LX-2 の両細胞において各種サイトカインを添加後、24 時間経過後の培養上清を回収し、転写活性を測定したところ、血小板型 12-リボキシゲナーゼの転写活性の有意な変化は認められなかった。今後は、他の NASH に関わるサイトカインにおいても検討するとともに、差が見られたものについては、既に報告されている²⁾5' 非翻訳領域のシスエレメントを少しずつ削除するように設計したベクターを構築し、転写活性調節効果の消失が見られた部分から、寄与するプロモーター領域を推定する予定である。

参考文献

- 1) Mori, Y. *et al. J. Biochem.* 168(5), 455-463, 2020.
- 2) Chang, W.C. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 71, 277-285, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Izumi Tsukayama, Takuto Mega, Nana Hojo, Keisuke Toda, Yuki Kawakami, Yoshitaka Takahashi, Toshiko Suzuki-Yamamoto	4. 巻 156
2. 論文標題 Diosgenin suppresses COX-2 and mPGES-1 via GR and improves LPS-induced liver injury in mouse.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostaglandins and Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prostaglandins.2021.106580	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5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上山真依, 戸田圭祐, 田中将夢, 津嘉山泉, 目賀拓斗, 鴻池優佳, 爲延麻子, Februadi Bastian, 赤井衣里阿, 伊東秀之, 川上祐生, 高橋吉孝, 山本登志子.
2. 発表標題 ザクロ葉由来エラジタンニン類によるミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素-1の発現抑制と肺癌細胞のアポトーシス誘導.
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上山真依, 戸田圭祐, 田中将夢, 津嘉山泉, 目賀拓斗, 鴻池優佳, 爲延麻子, Februadi Bastian, 赤井衣里阿, 伊東秀之, 川上祐生, 高橋吉孝, 山本登志子.
2. 発表標題 ザクロ葉由来エラジタンニン類のミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素-1発現抑制効果と大腸炎改善効果.
3. 学会等名 第57回おかやまバイオアクティブ研究会シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上山真依, 田中将夢, 津嘉山泉, 戸田圭祐, 目賀拓斗, 鴻池優佳, 爲延麻子, Februadi Bastian, 赤井衣里阿, 伊東秀之, 川上祐生, 高橋吉孝, 山本登志子.
2. 発表標題 ザクロ葉由来エラジタンニン類のミクロソーム型プロスタグランジンE合成酵素-1発現抑制と大腸炎改善効果.
3. 学会等名 第53回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Toda, Yoshiko Mori, Yuki Kawakami, Keita Kanzaki, Rena Tamai, Ryoma Tanaka, Izumi Tsukayama, Toshiko Suzuki-Yamamoto, Takayo Kawakami, Yoshitaka Takahashi.
2. 発表標題 Platelet-type 12S-lipoxygenase in hepatic stellate cells of non-alcoholic steatohepatitis model mice.
3. 学会等名 4th International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸田圭祐, 森香子, 川上祐生, 神崎圭太, 玉井玲名, 田中龍舞, 津嘉山泉, 山本登志子, 川上貴代, 高橋吉孝
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎の進展に寄与する12-リポキシゲナーゼの解明
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
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
---------	---------