

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11682

研究課題名(和文) 血漿糖タンパク質VWFによる非アルコール性脂肪肝炎(NASH)発症機序の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) mediated by plasma glycoprotein VWF

研究代表者

早川 盛禎 (Hayakawa, Morisada)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：30326847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、非進行性の単純性脂肪肝と進行性の非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に分類される。NASH発症の要因の一つとして、肝臓での血小板凝集が示唆されている。本研究は、NAFLDモデルマウスを用いて、血小板凝集作用を持つ“フォン・ウィルブラント因子(VWF)”のNASH発症に対する役割を検討した。高脂肪食給餌マウスでは、肝血管内皮細胞からの過剰産生されたVWFが、肝臓由来の血液凝固第VIII因子(FVIII)を血漿中で安定化し、その凝固活性を上昇させた。これらの結果は、肝臓でのVWF増加とFVIII活性上昇が血小板凝集に関与することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLDは世界的に患者数が増加している肝疾患であり、なかでもNASHは肝硬変に進展するため注視する必要がある。しかし、有効な治療法や治療薬はまだ開発されていない。NASH発症では、肝臓での血小板凝集が要因の一つとされている。本研究は、NAFLDモデルマウスにより、脂肪肝・脂肪肝炎時に、血小板凝集を促進するVWF量と血栓形成を促進するFVIII活性が上昇することを明らかにした。本研究の成果から、VWFとFVIIIの発現および活性を制御することで、NASH発症の抑制につながるものと考えられる。また、VWF濃度およびFVIII活性は、NASH診断時の有用な血液マーカーになることが期待された。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is classified into nonprogressive nonalcoholic fatty liver (NAFL) and progressive nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Platelet aggregation in the liver has been suggested as one of the factors in the development of NASH. In this study, we investigated the role of von Willebrand factor (VWF), which promotes platelet aggregation, in the development of NASH using a murine model of NAFLD. In high-fat diet-fed mice, overproduced VWF from hepatic vascular endothelial cells stabilized blood coagulation factor VIII (FVIII) in plasma and increased its coagulation activity. These results suggest that increased VWF protein and FVIII activity may be involved in platelet aggregation in the liver.

研究分野：生化学

キーワード：NAFLD VWF FVIII

1. 研究開始当初の背景

近年、アルコールをほとんど飲まない人にみられる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の患者数が世界的に増加している。高脂肪・高カロリーな食事、長時間のデスクワークなど、生活習慣の変化が NAFLD の発症や進行に影響すると考えられている。NAFLD は、非進行性の単純性脂肪肝 (NAFL) と進行性の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に分類される。NAFL は生活習慣の改善次第で健全な肝臓に戻るが、NASH は 10 年以内に 9~20% が肝線維化を経て肝硬変、肝がんに進展する。そのため、NASH 発症機序の解明とそれに基づく治療法の確立が課題となっている。

NASH 発症では、肝臓での血小板凝集増加が要因の一つとして示唆されている。これまでに申請者は、血漿糖タンパク質 “フォン・ウィルブラント因子 (VWF)” と血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) の発現が、肝臓の類洞内皮細胞の一部で一致することを報告した [1]。また、NAFLD モデルマウスの解析から、VWF の発現が肝臓で増加することを見出した。VWF には、血小板に関する重要な機能が 2 つある。一つは、血小板膜の VWF 受容体への結合による血小板凝集の促進である。もう一つは、血漿中で FVIII と結合して、FVIII を切断酵素から保護し安定化する作用である。FVIII は他の凝固因子とともに、出血部位に凝集した血小板を強固に覆うフィブリン形成を誘導する。しかし、NASH 発症に VWF の増加がどのように影響するのか、その詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、高脂肪食給餌による NAFLD モデルマウスを用いて、VWF 発現増加の機序、および血小板凝集への関与を明らかにし、NASH 発症に対する VWF の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) NAFLD モデルの作製

NAFLD モデルの作製には、C57BL/6J 系統の野生型 (WT) マウス、VWF 欠損 (VWF KO) マウス、組織特異的 FVIII 欠損マウスのオスを用いた。組織特異的 FVIII 欠損マウスは、F8-flox マウスと Tie2-Cre または Lyve1-Cre マウスとの交配による産仔を用いた (Tie2-Cre; F8 flox, Lyve1-Cre; F8 flox)。Tie2-Cre; F8 flox および Lyve1-Cre; F8 flox マウスは、肝類洞内皮細胞で FVIII を産生しないマウスとなる。

上記のマウスに、普通食 (NCD) または高脂肪食 (コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料, CDAHFD) を 12 週間給餌した。飼育期間中は、経時的に採血し、血漿を分離した。安楽死後は、肝臓を含む複数の組織を採取し、RNA を抽出した。また肝臓の組織切片を作製した。

(2) 凝固活性測定および凝固因子発現解析

NAFLD モデルマウスにおいて、血漿 FVIII および血液凝固第 IX 因子 (FIX) の凝固活性は、凝固一段法により測定した。血漿 VWF のタンパク質濃度は ELISA 法により測定した。血漿 ALT, AST などの肝機能マーカー測定は、民間検査会社に委託した。凝固因子および関連因子の遺伝子発現は、リアルタイム-qPCR 法により解析した。肝組織切片における脂肪沈着はヘマトキシリン & エオジン (H&E) 染色法と Oil-red O 染色法により検出し、VWF 発現は免疫蛍光染色法により検出した。

また、市販のヒト肝臓組織 (健常者、脂肪肝患者、脂肪肝炎患者) においても、肝臓組織より RNA を抽出し、凝固因子および関連因子の遺伝子発現をリアルタイム-qPCR 法により解析した。

(3) FVIII クリアランスの解析

NCD または CDAHFD を 3 週間給餌した WT マウス、VWF KO マウスにリコンビナントヒト FVIII を静脈投与した後、経時的に採血し、血漿を分離した。血漿ヒト FVIII のタンパク質濃度を ELISA 法により測定し、FVIII クリアランスを評価した。

(4) 肝臓における VWF 発現制御の解析

C57BL/6J WT マウスよりゲノム DNA を抽出し、vwf 遺伝子のプロモーター領域を PCR 法によりクローニングした。Vwf プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作製し、NCD または CDAHFD を 4 週間給餌した野生型マウスに静脈投与した。さらに 4 週間給餌した後、生体イメージング装置 (IVIS) を用いて肝臓のルシフェラーゼ発光を定量した。

4. 研究成果

(1) CDAHFD 給餌における FVIII 凝固活性の上昇

CDAHFD を給餌した WT マウスは、NCD 給餌に比べて、AST、ALT、ALP、TBA、T-BIL の値が上昇しており、肝機能の低下が認められた。また、肝臓には脂肪滴が蓄積しており、脂肪肝・脂肪肝炎を発症していた (図 1)。

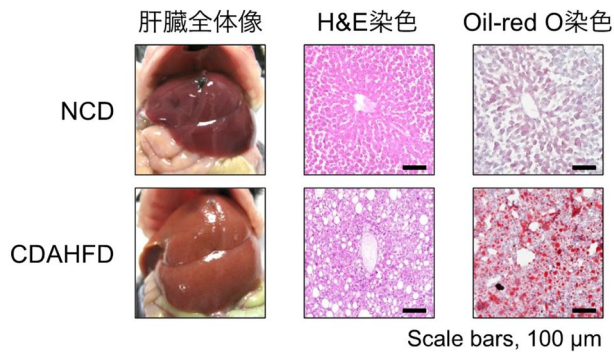


図1. NAFLDモデルマウスの肝臓における脂肪蓄積

血漿中の凝固活性の変動を調べるために、肝類洞内皮細胞から産生される FVIII と肝細胞から産生される FIX の活性を測定した。CDAHFD 給餌マウスの FVIII 活性は、給餌開始時の 100% から徐々に上昇し、12 週間後には 250% に達した (図 2)。逆に、CDAHFD 給餌マウスの FIX 活性は低下傾向が認められた。

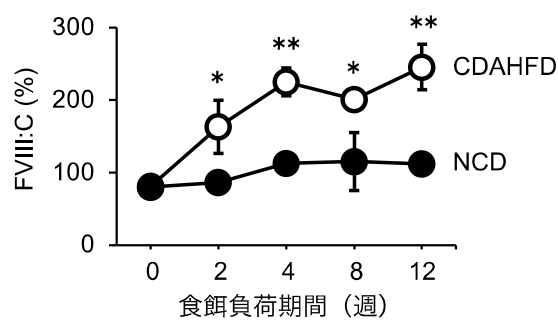


図2. NAFLDモデルマウスにおける血漿FVIII活性

脂肪肝・脂肪肝発症時に、肝類洞内皮細胞以外の細胞で FVIII が代償的に産生されるのかを flox-Cre システムにより検討した。FVIII 非発現性の肝類洞内皮細胞を有する Tie2-Cre;F8 flox マウス、および Lyve1-Cre;F8 flox マウスは、CDAHFD を給餌しても FVIII 活性はまったく上昇しなかった。この結果から、肝障害が生じてても、FVIII 産生は肝類洞内皮細胞に限定的であり、他の細胞で代償されないことが明らかになった。また、VWF が存在しない時に、FVIII 活性がどのように変化するのか、VWF KO マウスで検証した。VWF KO マウスは血漿 FVIII が不安定なため、FVIII 活性は 15% 程度である。VWF KO マウスの FVIII 活性は、CDAHFD 給餌から 2 週間後に一時的にわずかな上昇を認めたが、その後は WT マウスと同程度の 15% に低下した。

(2) CDAHFD 給餌における VWF 発現の増加

WT マウスにおいて、肝臓を含む 7 つの組織で FVIII の遺伝子発現を調べたが、NCD または CDAHFD の間で有意差のある組織は認められなかった。そこで、血漿中の FVIII 結合パートナーである VWF の遺伝子発現を調べたところ、CDAHFD 給餌マウスの肝臓にのみ高発現が認められた。肝臓における FVIII と VWF の遺伝子発現パターンは、脂肪肝および脂肪肝発症の患者検体でも同様であった。

CDAHFD 給餌マウスの肝臓では、VWF タンパク質の発現は、太い血管だけでなく、類洞の内皮細胞でも亢進していた。また、血漿中のタンパク質濃度も 2 倍以上に上昇していた (図 3)。VWF の制御タンパク質である ADAMTS13 の遺伝子発現は、給餌 12 週間後の時点では大きな変動はなく、CDAHFD マウスでは VWF の分解は進んでいないものと考えられた。

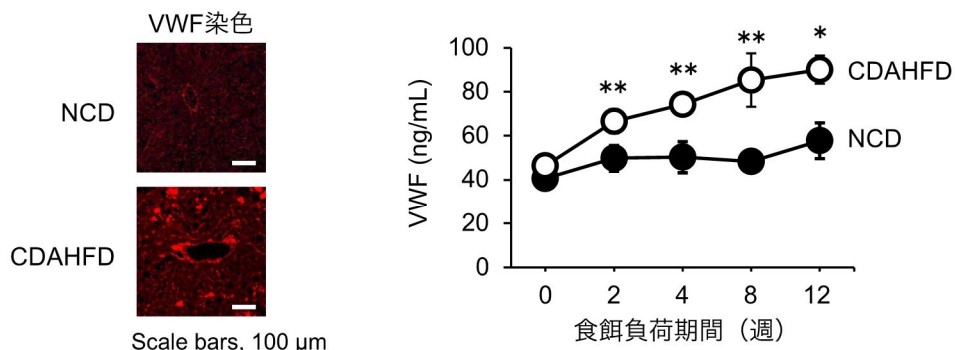


図3. NAFLDモデルマウスの肝血管内皮細胞におけるVWF産生と血漿におけるVWF量

VWF 発現の亢進メカニズムを明らかにするために、NCD または CDAHFD を 4 週間給餌した WT マウスに vwf プロモーター搭載ルシフェラーゼ発現 AAV ベクターを投与し、さらに 4 週間給餌した後、肝臓のルシフェラーゼ発光を定量した。5' 領域から段階的に短くした 2.1 kbp、0.6 kbp、0.3 kbp プロモーターは、いずれも NCD または CDAHFD でルシフェラーゼ発光に差は認められなかった。これらの結果から、脂肪肝・脂肪肝炎時の vwf 発現は 2.1 kbp の領域以外で制御されることが示唆された。

(3) FVIII クリアランスの解析

NCD または CDAHFD を給餌した WT マウス、および VWF KO マウスにリコンビナントヒト FVIII を静脈投与し、血漿中のヒト FVIII 量を測定した。CDAHFD 給餌した WT マウスでは、普通食マウスに比べて、血漿中に FVIII が多く残存しており、FVIII のクリアランスが抑制されていることが明らかになった。また、VWF 欠損マウスでは、FVIII は注射後早期に消失したが、CDAHFD 摂取時における FVIII クリアランスの抑制は認められた (図 4)。

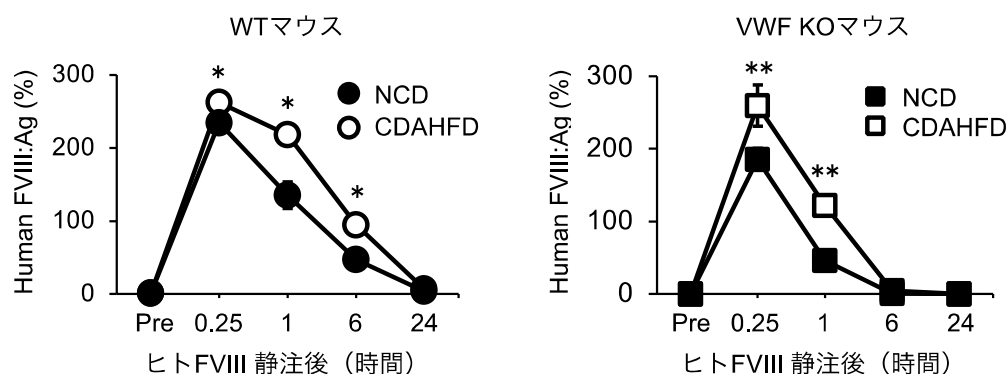


図 4. NAFLDモデルマウスにおけるFVIIIクリアランス

以上の結果から、NASH 発症時は、肝血管内皮細胞からの VWF 発現が過剰になることが明らかになった。このため、肝類洞内皮細胞からの FVIII 産生は変わらないものの、血漿中では過剰な VWF により FVIII 安定化が増進し、FVIII のクリアランスが抑制され、FVIII 活性が上昇することが示唆された。また、VWF 非依存的な FVIII クリアランス制御も FVIII 活性上昇に寄与していることが示唆された。さらに、血漿における VWF 濃度および FVIII 活性は、CDAHFD 給餌 2 週間後には有意に上昇が認められることから、NASH 診断時の有用な血液マーカーになることが期待された。

本研究は、脂肪肝・脂肪肝炎時に、血小板凝集を促進する VWF 量と血栓形成を促進する FVIII 活性が上昇することを明らかにした。これらのことから、VWF と FVIII の発現および活性を制御することで、NASH 発症の抑制につながるものと考えられる。今後は、肝臓での局所的な血小板凝集における FVIII と VWF の関与を明らかにすることが課題である。

<引用文献>

- [1] Hayakawa, M., Sakata, A. Hayakawa, H., Matsumoto, H., Hiramoto, T., Kashiwakura, Y., Baatartsoyt, N., Fukushima, N., Sakata, Y., Suzuki-Inoue, K., and Ohmori, T.: Characterization and visualization of murine coagulation factor VIII-producing cells *in vivo*. *Sci. Rep.* 11, 14824, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 早川 盛禎、柏倉 裕志、早川 裕子、Baatartsogt Nemekhbayar、平本 貴史、鴨下 信彦、大森 司
2. 発表標題 肝疾患における血液凝固第VIII因子活性の上昇機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
研究協力者	大森 司 (Ohmori Tsukasa)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究協力者	早川 裕子 (Hayakawa Hi roko)	自治医科大学・医学部・客員研究員 (32202)	
研究協力者	青木 環 (Aoki Tamaki)	自治医科大学・医学部 (32202)	
研究協力者	岸本 美華 (Kishimoto Mika)	自治医科大学・医学部 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	林 麻衣 (Hayashi Mai)	自治医科大学・医学部 (32202)	

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