

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15659

研究課題名(和文)肝疾患の治療戦略となる新しい機序：リゾホスファチジルセリン

研究課題名(英文)LYSOPHOSPHATIDYLSERINE MAY BE INVOLVED IN LIVER FIBROSIS

研究代表者

西川 尚子(Nishikawa, Takako)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：80814706

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)：グリセロリゾリン脂質は多彩な生理活性作用を発揮するがその分子種による生理活性作用の相違については不明な点が多い。リゾリン脂質に分類されるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)は近年その特異的受容体(GPR174、GPR34、P2Y10)が同定され新規リゾリン脂質メディエーターとして注目され始めている。今回我々はLysoPSが疾患、特に肝線維化に関与しているかということを目指し、培養細胞および肝線維化モデルマウスおよびヒト血漿において、一部の脂肪酸分子種のLysoPSの有意な上昇を認めることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養細胞を用いた検討にて、LysoPSは肝臓の線維形成に関与していると推察された。またヒト検体では肝星細胞においてLysoPS受容体の発現亢進が認められ、LysoPSは肝線維化にも関与している可能性が示唆された。さらにマウス血漿において一部の脂肪酸分子種のLysoPSの上昇を認め、LysoPSの肝線維化マーカーとしての検査医学的応用の可能性が示唆された。今後受容体アンタゴニストによる肝線維化の治療法の開発、アゴニストによる癌進展抑制剤の開発などが期待される。

研究成果の概要(英文)：Lysophospholipids (LPLs), such as lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate are attracting attention as second-generation lipid mediators. Lysophosphatidylserine (LysoPS), a phosphatidylserine-derived LPL, has recently been identified as a specific receptor, such as GPR34 and GPR174, P2Y10, and has begun to attract attention as a novel lipid mediator. In this study, it was suggested that LysoPS is involved in liver fibrosis in vitro. In vivo study, upregulation of LysoPS receptor was observed in hepatic myofibroblast-like stellate cells, suggesting that LysoPS may also be involved in liver fibrosis. Furthermore, an increase in LysoPS of some fatty acid molecular species was observed in mouse plasma, suggesting the possibility of laboratory medical application of LysoPS as a marker of liver fibrosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：リゾリン脂質 リゾホスファチジルセリン 肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の学術的背景

脂肪酸は、生体内に必要な栄養素、細胞膜のリン脂質を形成する要素の1つであるが、炭素鎖の長さ、不飽和度により様々な分子種が存在する。脂肪酸の種類は、古くから種々の臨床研究によりヒト疾患との関わりが知られている。代表的なものに、血清  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 脂肪酸比が高いと動脈硬化、癌が起こりやすいということや、血清飽和脂肪酸濃度が高いと、糖尿病、心血管疾患が生じやすいという疫学的な報告がある。この脂肪酸の種類とヒト疾患をつなぐ機序としては、現在のところ次のような機序が想定されている。 $\omega$ -3、 $\omega$ -6 脂肪酸は体内で脂質メディエーター (エイコサノイド) に変換され、それぞれ、抗炎症作用、抗線維化、抗アレルギー作用を持つレゾルビンなど、あるいは催炎症作用、血小板活性化能を持つプロスタグランジン、ロイコトリエンなどに変換される。また、飽和脂肪酸は細胞膜の脂質組成の変化などにより催炎症状態や小胞体ストレスを引き起こすと考えられている。さて、脂肪酸は、生体内では、遊離脂肪酸、脂肪酸鎖を2本持つジアシルリン脂質、脂肪酸鎖を3本持つ中性脂肪であるトリアシルグリセロールとして存在するが、脂肪酸鎖1本と1つの塩基からなるグリセロリゾリン脂質という形でも存在する。このグリセロリゾリン脂質のうちにはリゾホスファチジン酸 (LPA)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI) のように特異的な受容体が同定され、強力な生理活性作用を有するものがある。グリセロリゾリン脂質の分子種の相違による生理活性作用の相違についてはまだわかっていないところが多いが、申請者の所属する研究グループでは、急性冠症候群患者の血漿では、LPA のうち、22:6、20:4、18:2 といった LPA が分子種特異的に増加することを報告しており、グリセロリゾリン脂質の分子種により、その生物学的作用が修飾される可能性が示唆されている。また後述するが、申請者は生体内の脂肪酸分子種の組成が変動すれば、グリセロリゾリン脂質分子種もその影響を受けて変動し、そのことが疫学的研究を説明するのではないかという着想に至り、培養肝癌細胞である HepG2 細胞に DHA を投与したところ、細胞増殖が抑制され、投与脂肪酸分子種由来のリゾリン脂質が増加していることを発見し、さらに生理的作用に関してリゾリン脂質受容体である GPR55 が少なくとも部分的に関与することを見出し報告している。さて、新規リゾリン脂質に分類されるリゾホスファチジルセリン (lysophosphatidylserine ; LysoPS) は近年その特異的な受容体 (GPR174、GPR34、P2Y10) が同定され、新規リゾリン脂質メディエーターとして注目され始めている。LysoPS も強力な生理活性作用を有すると想定されており、マスト細胞の脱顆粒反応を促進する作用のほか、T リンパ球の増殖や、神経突起の伸長、細胞遊走やマクロファージの貪食などの作用があると報告されているが、その作用や機序は不明な部分が多い。また、臨床との関わりにおいては殆ど報告を認めていない。このような背景より、本研究課題では、「疫学研究にて報告されている脂肪酸分子種と疾患の関連には、新規グリセロリゾリン脂質分子種、なかでも LysoPS の変動も関与しているのではないか」という問いに答えることを目的とする。

## 2. 本研究の目的

本研究の目的は、疫学研究にて報告されている脂肪酸分子種と疾患の関連についての新しい機序として、LysoPS が関与している可能性を明らかにすることである。そのために、以下の 2 点について実現することを目指す。 様々な脂肪酸の分子種により引き起こされる生体反応が、変動する LysoPS により説明できるか明らかにする。 ヒトにおいても脂肪酸分子種と疾患の関連に LysoPS が関与していることを明らかにする。これらを解明することは、臨床検査および創薬の対象として大きな意義があると考えられる。

**本研究で何をどのように、どこまで明らかにしようとするのか** 本研究では、脂肪酸の分子種とヒト疾患の関連の機序を明らかにするために、 様々な脂肪酸の分子種により引き起こされる生体反応が、変動する LysoPS により説明できるか検討する。 ヒトにおいても脂肪酸分子種と疾患の関連に LysoPS が関与していることを検討する。

### LysoPS の変動が脂肪酸による生体反応に関与することについての検討

本研究では、広くその疫学的な関連が証明されている脂肪酸分子種と申請者が専門にする肝疾患、長期の慢性肝炎から引き起こされる肝線維化および肝細胞癌について次のように検討する。特に近年わが国で問題となっている、世に数多く存在する脂肪肝を有する者のなかで、どのような方が非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)へと進展するか、決め手となる機序を、NASH から肝硬変・肝発癌へと病態が進行することを阻止するために、脂質の分野から解明することを最終目標とする。

**肝炎、肝線維化に関する実験** 活性化した肝星細胞を想定して、培養肝筋線維芽様細胞(CSF-8B)を用いて市販の 18:0 および 18:1 由来の LysoPS を投与したところ、 $\alpha$ -SMA の強発現を認めた。また同細胞に LysoPS 受容体の agonist を投与したところ、GPR34、P2Y10 の受容体 agonist 投与にて  $\alpha$ -SMA の強い発現を認めた。これらの知見から LysoPS が肝臓の線維化に関与することが推察された。産生経路については、siRNA により各リゾリン脂質アシル基転移酵素群活性を抑制し液体クロマトグラフ/質量分析計(LC-MS)を用いて LysoPS 分子種の変動を解析する。次に NASH モデルラットを作成し、血漿および肝臓中の脂肪酸比とエイコサノイドおよび LysoPS 分子種の関係を見る。同様に胆汁鬱滞が脂肪酸比に及ぼす影響を確認するため原発性胆汁性肝硬変モデルラットを作成し比較検討を行う。線維化の相違について検討を重ねるため CCl4 マウス作成も検討する。

### ヒトにおける検討

慢性 B 型肝炎から発生した高分化型肝細胞癌のヒト組織を用い in situ hybridization (ISH)法にて LysoPS の受容体について検討したところ非癌部のうち癌周囲の線維性被膜の近傍において GPR174、GPR34、P2Y10 の強発現を認めた。同部位の肝構成細胞について肝細胞および胆管細胞、 $\alpha$ -SMA および vimentin および desmin など静止期から活動期の肝星細胞、Kupffer 細胞、内皮細胞などを免疫染色にて検討していく予定である。また関連があるとされる T 細胞、特に CD8 の発現について検討を行う。また、該当箇所の脂肪酸の組成

分析を検討する。肝疾患、担癌患者の血漿および血清を採取し LC/MS を用いて、肝線維化の重症度とエイコサノイドおよび新規リゾリン脂質との関連について検討する。

### 3. 研究の方法

(1)培養細胞による検討；肝線維化に関する実験；培養肝筋線維芽様細胞 (CSF-8B) を用いて市販の 18:0 及び 18:1 由来の LysoPS を投与し、 $\alpha$ -SMA の発現について検討した。薬理的機序については、Western blotting 法にて解析した。(2)線維化モデルマウスによる検討；次に線維化モデルマウスである CCl<sub>4</sub> マウスを作成した。肝臓における LysoPS の受容体の発現について ISH 法にて検討した。また、血漿と肝臓中の脂肪酸比と LysoPS 分子種の間を LC-MS を用いて解析した。(3)ヒトにおける検討；慢性 B 型肝炎から発生した高分化型肝細胞癌のヒト組織を用い ISH 法にて LysoPS の受容体について検討した。また、免疫染色にてこれら受容体を発現する構成細胞について検討した。次に肝線維化を有する慢性肝疾患患者の血漿と血清を採取し、LC/MS を用いて肝線維化の重症度とエイコサノイドおよび新規リゾリン脂質との関連について検討した。

### 4. 研究成果

(1)培養肝星細胞を用いて 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M の 18:0 及び 18:1 LysoPS を投与し、24 時間後に  $\alpha$ -SMA を Western Blotting 法にて検討したところ、10  $\mu$ M の 18:0 及び 18:1 LysoPS 投与にて  $\alpha$ -SMA の発現が有意に増加した。薬理的には Smad3、p38、Rho kinase の阻害薬により、LysoPS による  $\alpha$ -SMA の発現増強が阻害され、これらの関与が考えられた。(2)CCl<sub>4</sub> 投与肝硬変モデルマウスの肝組織において ISH 法にて LysoPS の受容体を検討したところ、グリソン稍に一致して LysoPS 受容体である GPR174、GPR34、P2Y10 の発現を認めた。また、同モデルマウスの血漿において、18:1、24:5 LysoPS の上昇を認めた。(3)慢性 B 型肝炎から発生した高分化型肝細胞癌のヒト組織において、ISH 法にて LysoPS の受容体を検討したところ、癌部では非癌部の大部分よりもこれら 3 つの受容体の発現が増加していたが、非癌部のうち癌周囲の線維性被膜の近傍においてこれら 3 つの受容体の最も強い発現を認めた。これらの受容体は、免疫染色にて肝線維芽細胞および肝星細胞において強発現していることが考えられた。また、肝線維化の進行したヒト血漿において、16:0 LysoPS の上昇を認めた。今回の培養細胞を用いた検討にて LysoPS は肝臓の線維形成に関与していると推察された。またヒト検体でも、線維性被膜の近傍にある肝筋線維芽細胞において、LysoPS 受容体の発現亢進が認められ、LysoPS はヒトの肝線維化にも関与している可能性が示唆された。今後 LysoPS の肝線維化への関与を明らかにすることで、LysoPS の肝線維化マーカーとしての検査医学的応用の可能性、LysoPS 受容体アンタゴニストによる肝線維化の治療法の開発、LysoPS 受容体アゴニストによる癌進展抑制剤の開発などが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西川 尚子、蔵野 信、池田 均、矢富 裕、小池 和彦
2. 発表標題 リゾホスファチジルセリンは新規肝線維化マーカーの可能性はある
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takako Nishikawa, Makoto Kurano, Hitoshi Ikeda, Nobutake Yamamichi, Yutaka Yatomi, Kazuhiko Koike
2. 発表標題 LYSOPHOSPHATIDYLSERINE MAY BE INVOLVED IN LIVER FIBROSIS
3. 学会等名 AASLD, The Liver Meeting; 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takako Nishikawa, Makoto Kurano, Hitoshi Ikeda, Nobutake Yamamichi, Yutaka Yatomi, Kazuhiko Koike, Mitsuhiro Fujishiro
2. 発表標題 LYSOPHOSPHATIDYLSERINE MAY STIMMURATE LIVER FIBROSIS
3. 学会等名 EASL, The International liver Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川 尚子、蔵野 信、池田 均、山道 信毅、矢富 裕、小池 和彦、藤城 光弘
2. 発表標題 リゾホスファチジルセリンは新規肝線維化促進因子および線維化マーカーの可能性はある
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------