

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08322

研究課題名(和文) IVA型ホスホリパーゼA2活性の細胞種選択的制御によるNASH新規治療戦略の確立

研究課題名(英文) Inhibition of group IVA phospholipase A2 as a therapeutic strategy for non-alcoholic steatohepatitis

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、起炎関連酵素であるIVA型ホスホリパーゼA2(PLA2)が非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の治療標的分子となることを、本酵素を介した細胞応答を担う病態責任細胞の同定を含めて明確にする。この目的を達成するために、IVA型PLA2の全身欠損マウスや、肝細胞やマクロファージなど病態の進展を担う各細胞種でのみ特異的にIVA型PLA2を欠損させたマウスを作成し、そのNASHモデルにおける病態を解析した。その結果、NASHの病態形成に関与する肝実質細胞や、マクロファージ、肝類洞内皮細胞、肝星細胞などの主要な肝構成細胞のうち、肝類洞内皮細胞のIVA型PLA2が病態形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎は、肝線維化を伴う生活習慣病であり、死因となる肝硬変や肝癌へと移行するが、未だ効果的な治療薬はない。本研究は、炎症の制御が治療に繋がると考え、炎症を担うIVA型ホスホリパーゼA2(IVA-PLA2)という酵素のはたらきを止めることが新規の治療方針となる可能性を示した。肝臓の全ての種類の細胞中のIVA-PLA2のはたらきを止めなくても、肝臓の血管を構成する細胞のIVA-PLA2だけを抑制する治療薬があれば、副作用が少ない安全な肝線維化の治療薬となることが予想された。

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 in NASH 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 initial step of the generation of lipid mediators, in the progression of hepatic fibrosis. We showed that a lack of IVA-PLA2 alleviates hepatic fibrosis in NASH model mice, suggesting the contribution of IVA-PLA2-mediated cellular responses. We further explored which types of cells in the liver are involved in IVA-PLA2-mediated hepatic fibrosis using cell-specific IVA-PLA2 knockout mice. The preliminary results suggest that IVA-PLA2 in endothelial cells plays a role, in part, in the hepatic stellate cell-mediated progression of hepatic fibrosis. Thus, IVA-PLA2 may be a pharmacotherapeutic target for NASH.

研究分野：病態生化学

キーワード：脂肪肝炎 炎症 ホスホリパーゼA2

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肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) は、過度の飲酒歴がなくとも、脂肪肝に加えて肝組織における炎症性細胞浸潤や線維化をきたすことで肝硬変や肝がんへと進展する生活習慣病であり、炎症や線維化を伴わない良性な病変である非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver: NAFL) とともに、非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の病態の1つである。NASH の発症過程では、過食や高脂肪食に起因した内臓脂肪細胞の肥大化や内臓脂肪組織での炎症に伴い産生されたアディポサイトカインや遊離脂肪酸が肝臓を構成する種々の細胞に作用し、また、腸管や腸内細菌に由来した因子が肝臓の細胞に作用する場合もある。これらの因子により、肝細胞での脂肪蓄積が必ずしも先行するとは限らないが、肝細胞をはじめ他の肝臓構成細胞 (肝類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞、ピット細胞など) における様々な細胞応答がほぼ同時に並行して誘起され、これに伴い浸潤してきた細胞 (単球由来マクロファージ、好中球、種々の T 細胞など) の応答も加わることで、炎症が生じることになる。さらには、これらの細胞応答で産生された種々の因子による各細胞の増幅的な活性化が肝臓でのインスリン抵抗性や酸化ストレスとともに慢性的な炎症をもたらすが、この過程での肝星細胞におけるコラーゲン線維の産生亢進が肝線維化の直接的な要因となると考えられている。このような NASH の発症過程は、multiple parallel hits hypothesis と呼ばれている。

NASH の治療としては、食事・運動療法は必要ではあるが、NASH における肝線維化の過程は無症状のためコンプライアンス不良となりやすい。一方、薬物療法に関しては、現在、ビタミン E の投与をはじめ、併発する生活習慣病・代謝性疾患の治療薬が NASH の病態にも奏効することが期待され、高 LDL コレステロール血症を有する場合はスタチンやエゼチミブが、インスリン抵抗性を伴う 2 型糖尿病を有する場合はピオグリタゾンが、高血圧症を有する場合はアンジオテンシン 受容体拮抗薬が、それぞれ投与されている。しかしながら、これらの薬物療法の効果は顕著ではなく、肝線維化に対する効果的な治療薬はないのが現状である。このような中、NASH における肝線維化に関与する分子が新規治療標的となる可能性を考え、本研究では、炎症を担う IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (IVA-PLA₂) に着目した。PLA₂ は、グリセロリン脂質の sn-2 位のエステル結合に作用して脂肪酸とリゾリン脂質へと加水分解する酵素であり、数多くのアイソフォームが存在している。それらのうち、IVA-PLA₂ はほぼ普遍的に細胞質に存在しており、細胞の刺激応答に伴い小胞体などの細胞膜グリセロリン脂質からのアラキドン酸やリゾリン脂質の遊離・生成を担う。これら IVA-PLA₂ の生成物やエイコサノイドなどの代謝産物が起炎症物質として作用することから、本酵素は炎症に関与する疾患の進展因子であり、治療標的分子となることが示唆されている。これらのごとを踏まえ、本研究では、IVA-PLA₂ が NASH における肝線維化に関与する可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、起炎関連酵素である IVA-PLA₂ が NASH の治療に関わる標的分子となることを、本酵素を介した細胞応答を担う病態責任細胞の同定を含めて明確にする。このことは、将来の実践応用として、細胞指向性を付加した本酵素の特異的阻害薬が、副作用が少ない安全な新規 NASH 治療薬として病態の進展阻止に繋がる可能性を示す根拠となるものである。

この目的を達成するために、IVA-PLA₂ を全身で欠損させたマウスや、世界で初めての試みとなる肝細胞やマクロファージなど病態の進展を担う各細胞種でのみ特異的に IVA-PLA₂ を欠損させたマウスを作出し、その NASH モデルにおける病態解析から、病態責任細胞を明確にする。効果的な NASH の治療戦略の確立が望まれている中、本研究は、IVA-PLA₂ を NASH の病態制御標的分子とした新規の薬物療法や創薬の観点の提示を目指す。

3. 研究の方法

NASH における肝線維化への IVA-PLA₂ の関与を検討するために、IVA-PLA₂ の全身欠損マウス (IVA-PLA₂-KO マウス) および同腹の野生型マウスを用い、高脂肪高コレステロール飼料 (HD; 20%脂肪、1.25%コレステロール) または対照としての普通飼料 (ND; 5.3%脂肪、コレステロール不含) を 16 週間の自由摂食させる系にて肝線維化を伴う脂肪肝モデルを作製し、種々のパラメーターを測定した。

IVA 型 PLA₂ 遺伝子領域が Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP で挟まれた遺伝子座を持つ、IVA-PLA₂-floxed マウスを作出した。IVA-PLA₂-floxed マウスと細胞種特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (理研リソース) を交配し、肝実質細胞や肝星細胞、単球/マクロファージ、血管内皮細胞などの各細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを作出する。同時に、ポジティブコントロールとして、全身性に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配し、全身性 IVA-PLA₂ 欠損マウスも作出する。得られた IVA-PLA₂ コンディショナルマウスおよび対照マウスについて、コレステロール含有高脂肪食 (D16010101, Research Diets) あるいはメチオニン減量コリン欠乏高脂肪食 (A06071302, Research Diets) を投与することにより、高脂肪食誘発性 NASH 肝線維化モデルを作製し、種々のパラメーターを測定した。

4. 研究成果

4-1) IVA-PLA₂ 全身欠損マウスでの検討

野生型マウスに HD を摂取させると、普通飼料の摂取に比し肝組織にコラーゲン線維が増加していることが組織学的な解析から観察されたが、HD を摂取させた IVA-PLA₂-KO マウスでは、そのような増加はほとんど見られなかった。また、野生型マウスでの HD 摂取による肝脂肪蓄積と考えられる空胞化も、IVA-PLA₂-KO マウスでは顕著に軽減されていた。肝線維化の過程では、クッパー細胞やマクロファージなどから産生・放出されるトランスフォーミング増殖因子 1 (transforming growth factor-1: TGF-1) が、肝星細胞の線維芽細胞様への形質転換を誘起し、この活性型肝星細胞からの I 型コラーゲン 2 鎖 (collagen 1a2: Col1a2) の産生を亢進させると考えられている。本実験系においても、これらの肝線維化関連因子の mRNA 発現量が、HD を摂取させた野生型マウスでは普通飼料の摂取に比し増大しており、IVA-PLA₂-KO マウスでは HD 摂取に伴う mRNA 発現量の増大が見られなかった。

この肝線維化の軽減は肝組織への脂肪蓄積を抑制した結果である可能性も考えられることから、肝脂肪蓄積を介さずに肝線維化を誘導する四塩化炭素 (CCl₄) を用いた肝線維化モデルにて、酸化ストレス誘発性の肝線維化形成に対する IVA-PLA₂ の関与を検討した。その結果、野生型マウスへの 6 週間の CCl₄ 投与により、コラーゲン線維の染色部位が増加し肝線維化が誘起される事が確認できたが、IVA-PLA₂-KO マウスへの CCl₄ 投与では、コラーゲン線維の増加する程度は低かった。また、肝線維化マーカー分子である TGF-1 および Col1a2 の mRNA 発現量も同様に、野生型マウスでは CCl₄ 投与により増大したが、IVA-PLA₂-KO マウスで見られた増大は少なかった。さらに、肝星細胞は TGF-1 により活性化されると平滑筋アクチン (smooth muscle -actin: -SMA) の発現量が高くなるが、-SMA の mRNA 発現量や免疫組織染色での -SMA 陽性細胞数は CCl₄ 非投与の野生型マウスに比し CCl₄ 投与下では顕著に増加しており、その一方で、IVA-PLA₂-KO マウスでは CCl₄ の投与による -SMA の mRNA 発現量や -SMA 陽性細胞数の増加はわずかであった。このように、高脂肪高コレステロール飼料や CCl₄ 誘発性の肝線維化において、IVA-PLA₂ がその発症過程の一端を担っていると考えられる。

CCl₄ 誘発性の肝線維化の進展には肝組織中の常在性マクロファージであるクッパー細胞や肝組織に浸潤した単球由来のマクロファージの関与が報告されており、これらは TGF-1 の産生細胞でもある。本実験系において、肝組織中のマクロファージの表面抗原である F4/80 を免疫組織染色にて検出したところ、CCl₄ を投与した野生型マウスでは中心静脈周辺に F4/80 陽性細胞の集積が確認されたのに対し、IVA-PLA₂-KO マウスでは野生型マウスに比し陽性細胞が少なかった。なお、F4/80 の mRNA 発現量も、野生型マウスでは CCl₄ 投与により増大したが、IVA-PLA₂-KO マウスでの増加は野生型マウスの半分程度であった。また、単球およびマクロファージの表面抗原である CD11b の mRNA 発現量に関しても F4/80 と同様の結果であった。これらの結果から、浸潤した単球由来のマクロファージが、IVA-PLA₂ 依存的な肝線維化過程に関与する可能性が示された。さらには、単球走化性因子 (monocyte chemotactic protein-1: MCP-1) の発現量を調べた結果、MCP-1 の mRNA 発現量は野生型マウスでは CCl₄ 投与により顕著に増加したのに対し、IVA-PLA₂-KO マウスでは、このような増加は全く誘起されていなかった。これらのことから、CCl₄ 投与による酸化ストレスを介した肝線維化の形成は、肝組織中のいずれかの細胞での IVA-PLA₂ を介した MCP-1 の発現増大により肝組織内への単球の浸潤が亢進し、結果的にマクロファージやクッパー細胞から産生された TGF-1 により肝星細胞が活性化されたことによると推察される。一方、単球以外の炎症に関与する細胞として、CD8 陽性 T 細胞や、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー T 細胞も、肝線維化過程に促進的または抑制的に関与することが推察されている。しかしながら、CCl₄ 投与により線維化した肝組織でのこれらの細胞の存在比率をフローサイトメトリーにて解析したが、CCl₄ 投与下の野生型マウスと IVA-PLA₂-KO マウスとでは差は見られなかった。また、肝組織における CD8 mRNA および CD8 陽性 T 細胞の遊走因子である regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) の mRNA 発現量は、野生型マウスにおいて CCl₄ 投与により増大したが、IVA-PLA₂-KO マウスにおいても野生型マウスと同程度の発現量の増大が見られた。したがって、IVA-PLA₂-KO マウスにおいて見られた CCl₄ 誘発性肝線維化の軽減には、これらの細胞が担う細胞応答は無関係であり、MCP-1 の発現抑制に伴う単球由来のマクロファージの集積の低下が関与すると思われる。

4-2) 細胞種特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでの検討

CCl₄ 誘発性の肝線維化過程において、CCl₄ 投与により肝細胞での酸化ストレスが生じた後、いずれかの細胞での MCP-1 の放出が起こり、これによるマクロファージの活性化や、これに伴い放出された TGF-1 による肝星細胞の活性化というように順次的に肝線維化が進展していくと捉えると、本研究での結果からは、IVA-PLA₂ は、肝臓を構成するいずれかの細胞での MCP-1 の産生亢進を介して CCl₄ 誘発性の肝線維化を担う可能性が考えられる。しかしながら、必ずしも活性化していく細胞種に順次性があるとは限らない。CCl₄ 投与の実験系では肝細胞での酸化ストレスがモデル形成の初発ではあるが、NASH の発症過程としての multiple parallel hits hypothesis の観点のように、肝細胞での酸化ストレスに伴う細胞応答は、自身も含めた全ての肝臓構成細胞に何らかの影響を及ぼし、肝臓外から集積した細胞も含め肝臓に存在する細胞からは、おそらく種々の因子が産生・放出されることになり、それらの因子を介してパラクリン・オートクリン的に様々な細胞応答がさらに誘起されることで肝線維化が増幅的に進行していくものと考えられる。つまりは、CCl₄ の長期間の投与終了後のように肝線維化がある程度進行し

た時点では、どの細胞のどの細胞応答が初発・上流であり、どの細胞のどの細胞応答が下流かという捉え方には意味はなくなり、少なくとも肝線維化の直接的な要因となる肝星細胞でのコラーゲン産生には、様々な細胞での種々の細胞応答が関与していると考えられる。このような観点で捉えると、本研究での IVA-PLA₂ 全身欠損マウスを用いた結果からは、肝線維化に關与する IVA-PLA₂ 依存的な細胞応答や、それを担う細胞種を明確にはできない。しかし、これらを明確にすることは、肝線維化機構の解明や、より効果的・効率的かつ副作用回避・安全面も踏まえた肝線維化に対する治療観点の提示に繋がると考えている。

そこで、IVA-PLA₂ 依存的な肝線維化機構を解明する目的で、cre-loxP システムを用いて細胞特異的に IVA-PLA₂ を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの作出を試みた。肝線維化に關与する細胞種は多々存在するが、肝実質細胞や肝星細胞、単球/マクロファージ、血管内皮細胞の IVA-PLA₂ をそれぞれ特異的に欠損させたマウスと、このシステムにより全身性に IVA-PLA₂ を欠損させたマウスをも作出した。なお、IVA-PLA₂-floxed マウスと細胞種特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスの系統は C57BL/6 であるが、実際には C57BL/6 の亜型である C57BL/6J と C57BL/6N が混在していることが判明し、また、両者で高脂肪食による脂肪肝や肝線維化の形成に關する感受性が異なることにも気づいた。結果的に後者の亜型は統一するために、バッククロスの期間が必要となり、その間、研究の遂行が滞った。

肝実質細胞や肝星細胞、単球/マクロファージ、血管内皮細胞の各細胞腫で特異的に IVA-PLA₂ を欠損させたマウスに HD を投与する実験系を開始する前に、比較的短期間での高脂肪食で肝線維化を作製できるとされている高脂肪・コリン欠乏・メチオニン減量飼料を摂取させ、予備的に検討した。その結果、各コンディショナルノックアウトマウスの対照マウスにおいて、この飼料の摂取により肝臓内でのトリグリセライド量および α -SMA が増加し、組織学的にコラーゲン線維の蓄積が見られ、一方、全身 IVA-PLA₂ 欠損および内皮細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損の各マウスでは、いずれのパラメーターも有意に同程度に軽減されていた。しかしながら、単球/マクロファージ、肝実質細胞、肝星細胞の各細胞腫特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは、そのような軽減は見られなかった。また、コレステロール含有の高脂肪食を 24 週間投与した NASH モデルにおいても同様な結果であった。なお、培養細胞を用いた実験系ではあるが、IVA-PLA₂-KO マウス由来の初代培養肝細胞や腹腔マクロファージにおいて、それぞれオレイン酸刺激下での脂肪蓄積または MCP-1 産生は野生型マウス由来の細胞での応答と何ら変化は見られなかった。また、活性型肝星細胞のモデルとしてのヒト由来不死化肝星細胞の培養下でのコラーゲンや MCP-1 の mRNA 発現量は IVA-PLA₂ 特異的阻害剤により減少した。

4-3) 結論

本研究での結果からは、NASH の病態形成に關与する肝実質細胞や、単球/マクロファージ、肝星細胞、肝類洞内皮細胞などの主な肝構成細胞のうち、肝類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が病態形成に關与することが示唆された。今後の研究の展開としては、肝類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が NASH の治療標的分子となることを、より明確に立証するために、時期選択的に、全身性または血管内皮細胞特異的に IVA-PLA₂ を欠損させることができる遺伝子改変マウスを用いて、NASH の病態を形成させた後に本酵素を欠損させる系にて検討していく予定である。

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 Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Madoka Nomoto, Mika Taniguchi, Satoshi Akiba	4. 巻 9
2. 論文標題 A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 204
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-36862-7	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10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 細胞種特異的IVA型ホスホリパーゼA2欠損による非アルコール性脂肪肝炎の病態軽減効果
3. 学会等名 第9回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2019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 秋葉 聡
2. 発表標題 IVA型ホスホリパーゼA2に着目した肝線維化の進展機構の解明
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野本真斗香, 河下映里, 石原慶一, 谷口実花, 秋葉 聡
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎マウスモデルにおけるC57BL/6JおよびC57BL/6N亜系統間での表現型の相違
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納菜瑠実, 河下映里, 石原慶一, 柏田千紘, 泰地健芳, 長尾美奈, 米岡那夏子, 村岡理沙子, 親川奈未, 秋葉 聡
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎の新規治療標的としての内皮細胞のIVA型ホスホリパーゼA2の可能性
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氏家真梨子, 河下映里, 金井志帆, 石原慶一, 田川 南, 苅田紗季, 秋葉 聡
2. 発表標題 高脂肪食誘発性動脈硬化の病変形成に対する単球・マクロファージおよび血管内皮細胞特異的IVA-PLA2欠損の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中本彩奈、中西李澄、今田百南、河下映里、石原慶一、秋葉 聡
2. 発表標題 各種肝構成細胞での脂肪酸刺激によるmonocyte chemotactic protein-1発現誘導へのIVA型PLA2の関与
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 河下映里、石原慶一、柏田千紘、泰地健芳、長尾美奈、加納菜瑠実、米岡那夏子、金井志帆、秋葉 聡
2. 発表標題 IVA型PLA2欠損下でのNASH病態軽減に関与する細胞種の特定
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋葉 聡、河下映里、石原慶一
2. 発表標題 NASHの新規治療観点としてのIVA型ホスホリパーゼA2の阻害
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都薬科大学・病態生化学分野
<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byoutai/byoutai-j.html>

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