

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02576

研究課題名（和文）プロスタノイドの肝線維化進展における役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of prostanoids in the development of liver fibrosis

研究代表者

牛首 文隆（Ushikubi, Fumitaka）

旭川医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：50243035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：肝線維化におけるプロスタノイドの役割解明のため、本研究ではプロスタノイド受容体欠損マウスを用い、いくつかの非アルコール性脂肪肝炎（NASH）動物モデルの解析を行った。その結果、NASH発症時の肝線維化に対し、プロスタグランジン（PG）I2が線維化抑制に働き、PGF2は線維化促進に働く可能性が示唆された。しかし、マイクロアレイを用いた解析の結果、PGF2の受容体であるFPの刺激は、肝線維化促進因子の亢進だけでなく肝線維化改善因子も亢進する可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食の欧米化や生活習慣の変化により、日本人の肥満率は上昇し、メタボリックシンドロームとなる患者が増加している。非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、メタボリックシンドロームの患者において肝臓で現れる病気の状態であり、飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝疾患に類似した肝組織像を示す。NASHは、放置すると肝臓のダメージの指標である線維化が進行し、肝硬変、肝がんと病状が悪化していく。しかし効果的な治療薬は存在せず、その発生メカニズムの解明は、学術的にも社会的にも意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of prostanoids in liver fibrosis, we analyzed several animal models of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using prostanoid receptor-deficient mice. In this study, prostaglandin (PG) I2 was suggested to suppress liver fibrosis and PGF2 to promote liver fibrosis during the development of NASH. An analysis using a microarray, however, indicated that the stimulation of FP, which is a receptor for PGF2, enhances not only the factors promoting hepatic fibrosis but also the factors suppressing hepatic fibrosis.

研究分野：プロスタノイド

キーワード：プロスタノイド

## 1. 研究開始当初の背景

肝線維化は、慢性肝疾患において肝硬変、肝がんに至る共通経路である。肝線維化は、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)、B 型・C 型肝炎ウイルスの持続感染、アルコールの過剰摂取、自己免疫性肝炎、胆汁うっ滞、薬物、寄生虫など、様々な原因により引き起こされる。従来、肝線維化は不可逆的であると思われていた。しかし近年、その一部は可逆的で治療可能である可能性が示され始めている。現在、直接作動型抗ウイルス薬など、抗ウイルス療法の進歩により、ウイルス性肝炎を基に発症する肝がんは減少している。しかし、NASH においては、臨床試験での線維芽細胞増殖因子 21 (FGF21) やアポトーシスシグナル調節キナーゼ (ASK1) の肝線維化改善効果が報告されてはいるが、未だ承認された薬物療法は存在しない。本邦において現在 NASH 患者は 200 万人以上と推定されているが、メタボリック症候群の患者増加により、今後ますます増加すると予想されており、今後 NASH に起因する肝がん患者の増加が危惧されている。よって、肝線維化病態形成に関与する因子の解明は、新規臨床応用の展開に資することが期待され非常に重要である。

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る生理活性脂質であり、各プロスタノイドに特異的な受容体を介して非常に多彩な作用を示す。現在まで、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>、TXA<sub>2</sub> の受容体として DP、EP、FP、IP、TP が知られており、EP には EP<sub>1</sub>~EP<sub>4</sub> の 4 種類のサブタイプが存在する。我々は、プロスタノイド受容体欠損マウスとメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食負荷による NASH 病態モデルを用い、プロスタノイドの NASH 病態進展に対する関与を解析した。その結果、プロスタノイドの中で、PGI<sub>2</sub> が炎症性細胞の浸潤を強く抑制することにより NASH 病態進展を有意に遅延させることを見いだした。また、MCD 食負荷後のプロスタノイド受容体の発現変化を解析したところ、PGF<sub>2</sub> 受容体 FP の著明な発現増加を認めた。一方、肝線維化の進展には、様々な刺激により活性化し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを過剰に産生する活性型星細胞が中心的な役割を果たす。肝星細胞は、正常時には、ビタミン A を貯蔵している静止型肝星細胞の状態である。しかし、炎症時に傷害肝から放出される HMGB1 (High-mobility group box 1) などにより刺激されると、静止型肝星細胞は活性型になり、さらに TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) の刺激により、コラーゲンなどの細胞外マトリックス産生を亢進し、傷害により脱落した肝実質細胞のスペースを埋める (線維化) 働きをする。その後、肝実質細胞が再生すると、不必要になった細胞外マトリックスは MMPs (matrix metalloproteinases) に分解され、肝臓は正常に戻る。しかし、NASH のような慢性炎症状態では、肝星細胞は活性化状態を維持し、コラーゲンだけでなくコラーゲン分解酵素であるコラーゲナーゼの阻害物質 TIMPs (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) をも産生し続け、結果、過剰な細胞外マトリックス蓄積状態 (線維化状態) が進行し、肝硬変、肝がんへと病態が悪化していく。従来、プロスタノイドが様々な星細胞の機能に影響を与えるという報告がある。しかし、どのタイプのプロスタノイド受容体に関与するかなど、その詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

肝線維化は、慢性肝疾患において肝硬変、肝がんに至る共通経路であり、疾患予後に大きな影響を与える。近年、肝線維化は可逆性であることが示され、肝線維化を改善できる治療法の開発が切望されている。我々は、従来の研究過程で、プロスタノイドの心臓や腎臓線維化の病態形成における役割を解明し、様々な臓器の線維化にプロスタノイドが関与していると想定してきた。本研究では、プロスタノイド受容体欠損マウスと肝線維化を伴う *in vivo* 疾患モデルを用いた解析を行い、肝線維化に関与するプロスタノイドの同定とその作用機構の解明を行うことを目的としていた。

## 3. 研究の方法

### (1) コリン欠損高脂肪食負荷による遺伝子変化のマイクロアレイによる解析

これまでの研究で、メチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食負荷によるマウス NASH 様モデルの解析より、PGF<sub>2</sub> 受容体 FP の著明な発現増加を認めていた。しかし、このモデルは、体重減少や、軽度の線維化などヒトの NASH とは大きく異なっている。そこで、より NASH 病態に近いコリン欠乏-高脂肪 (CD-HFD) 食 (A06071302、リサーチダイエツト社) 負荷を 12 週間行い、経時的に血液を採取し肝臓傷害の指標としてトランスアミナーゼを測定した。また、負荷後 3 週で野生型マウスと FP 欠損マウスの肝臓を摘出し、マイクロアレイを行い、線維化関連遺伝子の発現変化を解析した。

### (2) MC4R/プロスタノイド受容体ダブル欠損マウスを用いた NASH モデルの解析

メラノコルチン 4 受容体 (MC4R) 欠損マウス、及び MC4R とプロスタノイド受容体 IP もしくは FP を欠損した MC4R/IP、MC4R/FP ダブル欠損マウスに、20 週間、高脂肪食 (D12492、リサーチダイエツト社) あるいはウェスタンダイエツト (D12079B、リサーチダイエツト社) を与えた。その後、血液や肝臓を採取し各種解析をおこなった。血液については、肝機能障害の指標としてトランスアミナーゼ (ALT、AST) 値を測定し、内因性 PGI<sub>2</sub>-IP 系あるいは内因性 PGF<sub>2</sub> -FP 系が欠損したことによる肝機能障害の進行度を解析した。さらに、肝組織染色のためにパラホルムアルデヒド固定した肝組織より切片を作製した。一方、肝組織より RNA を抽出・逆転写反応し、mRNA 発現変化をリアルタイム RT-PCR により解析した。

### (3) MC4R/プロスタノイド受容体ダブル欠損マウスを用いた短期 NASH モデル

MC4R および MC4R/IP、MC4R/FP ダブル欠損マウスに高脂肪食負荷を 6 週間行い、その後、四塩化炭素を 0.2 ml/kg 腹腔内に単回投与した。このマウスを 10 日間高脂肪食で飼育することにより短期 NASH モデルとし、経時的に血液と肝臓を摘出し、(2) と同様の解析を行った。

### (4) 培養星細胞におけるプロスタノイドの役割

野生型マウスより肝星細胞を単離・培養し、TGF- $\beta$  で刺激し肝星細胞を活性化させた。その際に、プロスタノイド関連薬物を添加し、遺伝子発現に対するその効果をリアルタイム RT-PCR により解析した。

## 4. 研究成果

(1) CD-HFD 食負荷後、1、3、6、12 週で血中トランスアミナーゼ量を測定した結果、両群の ALT、AST 値は、CD-HFD 食負荷が進むに従って上昇し、CD-HFD 食負荷 3 週で、FP 欠損マウスは野生型マウスより有意に ALT の低値を示した。しかし、さらに CD-HFD 食負荷が進むと両群間に有意な差は認められなくなった。これは PGF<sub>2</sub> がこのモデル病態進展の早期に関与していることを示している。そこで CD-HFD 食負荷 3 週で肝臓を摘出し、遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。結果、FP 欠損マウスの肝臓は、野生型マウスよりも MCP-1、タイプ I コラーゲン、タイプ III コラーゲン、MMP-12、SMA 等の mRNA 発現が低下していた。これらの遺伝子のコードするタンパク質は、肝臓の炎症や線維化の促進因子である。一方、肝保護作用が報告されている PPAR- $\alpha$  や ATF3 の発現も低下していた。よって、NASH における肝線維化に対し、PGF<sub>2</sub> がその受容体 FP を介して進展と改善の両方に関与している可能性が示唆された。

(2) MC4R 欠損マウス及び MC4R/IP ダブル欠損マウスに 20 週間の高脂肪食負荷を行い、体重、肝重量、精巣上体周囲脂肪量、血漿トランスアミナーゼ量について解析した。体重増加、肝重量/体重比、精巣上体周囲脂肪/体重比については、両群間で差が認められなかったが、MC4R/IP ダブル欠損マウスにおいて一部有意な脾腫を認めた。また、トランスアミナーゼ AST/ALT 値も両群間で有意な差を認めなかった。さらに肝組織をシリウスレッド染色し、線維化の程度を観察したが、高脂肪食負荷 20 週で線維化は確認されたが両群間に大きな差を認めなかった。次に高脂肪食負荷をウェスタンダイエツトに変えて 20 週間飼育後に肝臓を摘出し、プロスタノイド受容体 mRNA 発現を解析したところ、PGF<sub>2</sub> 受容体 FP の著明な発現増加を認めた。しかし、体重増加、肝重量/体重比、精巣上体周囲脂肪/体重比については、両群間に差を認めなかった。一方、血中 ALT 値は、匹数が少なく有意差は認められないが、MC4R/IP ダブル欠損マウスにおいて MC4R 欠損マウスより高値を示した。さらに肝組織をシリウスレッド染色し、線維化の程度を観察したところ、ばらつきがあるものの、MC4R 欠損マウスよりも MC4R/IP ダブル欠損マウス肝臓の方が線維化の程度が強く表れていた。

MC4R/FP ダブル欠損マウスについては、動物実験施設の改修工事による飼育環境・場所の変更、およびこれに伴う出産数の低下により、使用個体数を確保できなかった。今後引き続き解析を行っていく予定である。

(3) 6 週間のウェスタンダイエツトにより、MC4R 欠損マウス、MC4R/IP あるいは MC4R/FP ダブル欠損マウスの血中 ALT は、いずれも約 20 IU/L から約 200 IU/L まで上昇したが、3 群間で有意な差は認められなかった。四塩化炭素投与 1 日後、3 群とも著明な ALT 量の増加を認めたが、MC4R/FP 欠損マウスにおいて有意差はないものの他の 2 群より低値を示した。リアルタイム RT-PCR 解析の結果、CTGF mRNA の発現量は、MC4R/FP ダブル欠損マウスの肝臓で、他の 2 群より有意に低値を示した。タイプ 1 コラーゲン、タイプ 3 コラーゲン mRNA は、有意差はないものの MC4R/FP ダブル欠損マウスの肝臓で、他の 2 群より低値を示した。一方、TGF- $\beta$  については 3 群間で発現変動に大きな差を認めなかった。さらに、シリウスレッド染色により線維化の程度を解析したところ、MC4R 欠損マウスと比較して MC4R/IP ダブル欠損マウスの肝線維化が進展していることが観察され、MC4R/FP ダブル欠損マウスの肝線維化は減弱していることが観察された。これらの結果、以前 MCD 食負荷の時に認められた PGI<sub>2</sub> の NASH 病態進展遅延作用が、よりヒトの NASH 症状に近い MC4R 欠損マウスを用いた解析でも認められた。またこれらの結果は、プロスタノイドが、PGI<sub>2</sub> と PGF<sub>2</sub> で肝線維化に対し相反する働きをすることを示唆している。

(4) 単離した肝星細胞におけるプロスタノイド受容体 mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR で解析

したところ、IPの発現を認めた。そこで、単離した肝星細胞にTGF- $\beta$ を加えて活性化させた後にIPアゴニストを添加し、タイプ1コラーゲンとCTGFの発現変化を解析した。その結果、タイプ1コラーゲン、CTGFのmRNA発現は、TGF- $\beta$ 添加により有意に上昇するが、IPアゴニストは、その発現を抑制することはできなかった。この結果は、活性化した肝星細胞における線維化関連因子の発現抑制にPGI<sub>2</sub>は直接的には関与していない可能性を示唆している。

本研究において、よりヒトの病態に近いMC4R欠損マウスを用いたNASHモデルにおいてもPGI<sub>2</sub>に肝線維化抑制作用がある可能性が示された。一方で、PGF<sub>2</sub>は、肝線維化促進作用がある可能性が示された。以前の研究で、プロスタノイド産生を阻害するCOX-2阻害薬投与は、肝線維化に対して相反する結果が報告されていた。これは、各研究条件によりPGI<sub>2</sub>とPGF<sub>2</sub>の関与のバランスが異なったために起こったのかもしれない。COX-2阻害薬は、様々な病態時に解熱・鎮痛・消炎効果を期待して世界中で非常に多く服用されている。しかし、慢性的にCOX-2阻害薬を服用しプロスタノイド産生を抑制すると、場合によっては肝線維化を促進してしまうかもしれない。これからも研究を重ね、肝線維化に対する効果的な治療薬開発に貢献していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 結城幸一、桑井志麻、柏木仁、今道力敬、牛首文隆	4. 巻 26
2. 論文標題 非アルコール性脂肪肝炎におけるプロスタノイドの役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 24-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kashiwagi H, Yuhki K, Imamichi Y, Kojima F, Kumei S, Tasaki Y, Narumiya S, Ushikubi F.	4. 巻 119
2. 論文標題 Prostaglandin F2 Facilitates Platelet Activation by Acting on Prostaglandin E2 Receptor Subtype EP3 and Thromboxane A2 Receptor TP in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis and Haemostasis	6. 最初と最後の頁 1311 ~ 1320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/s-0039-1688906	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Imamichi Y, Yuhki K, Kashiwagi H, Kumei S, Kojima F, Nakanishi K, Narumiya S, Ushikubi F.
2. 発表標題 Role of prostaglandin E2-EP4 system in Concanavalin A-induced hepatitis
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuhki K, Hirata T, Imamichi Y, Kashiwagi H, Narumiya S, Ushikubi F.
2. 発表標題 Role of the prostaglandin I2-IP system in liver regeneration in mice
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuhki K, Hirata T, Imamichi Y, Kashiwagi H, Nakayama K, Narumiya S, Ushikubi F.
2. 発表標題 Roles of prostaglandin I2 and TNF-alpha in liver regeneration in mice
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
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
研究分担者	今道 力敬  (Imamichi Yoshitaka)  (00570194)	旭川医科大学・医学部・助教    (10107)	
研究分担者	結城 幸一  (Yuhki Koh-ichi)  (80302420)	旭川医科大学・医学部・准教授    (10107)	
研究分担者	柏木 仁  (Kashiwagi Hitoshi)  (60510609)	旭川医科大学・医学部・助教    (10107)	

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