

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：25301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11515

研究課題名（和文）血小板型12-リポキシゲナーゼはNASH進展における肝線維化に関与するか

研究課題名（英文）Does platelet-type 12-lipoxygenase play any role in the development of fibrosis in NASH?

研究代表者

高橋 吉孝（Takahashi, Yoshitaka）

岡山県立大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：10236333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼを安定形質発現するヒト肝星細胞TWNT-1を樹立した。この細胞は、コントロールのMock細胞あるいは野生型細胞と比較して、I型コラーゲン遺伝子の発現レベルが低下していた。また、血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスにメチオニン・コリン欠損食を8週間給餌することにより作成したNASHモデルマウスにおいては、野生型マウスで作成したモデルマウスと比較して肝線維化がより進行することが示された。ヒト肝星細胞TWNT-1において、血小板型12-リポキシゲナーゼの過剰発現によりI型コラーゲン遺伝子の発現を抑制する遺伝子がいくつか見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MCDマウスを用いて、肝線維化の進展過程における肝星細胞の活性化と筋線維芽細胞への分化によるコラーゲン産生増加の過程において、血小板型12-リポキシゲナーゼの果たす役割の一端が解明された。今後、血小板型12-リポキシゲナーゼ生成物の何が線維化の抑制に関わるか明らかになれば、NASHを含む多くの慢性炎症性肝疾患の進展における肝線維化進行抑制のメカニズムの解明につながるのみならず、新たな治療法の発見につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）： We established the human hepatic stellate TWNT-1 cells stably expressing human platelet-type 12-lipoxygenase. The expression levels of type I collagen mRNA were decreased in the human platelet-type 12-lipoxygenase-expressing TWNT-1 cells as compared with mock cells or wild-type cells. The level of liver fibrosis in NASH model mice prepared by feeding methionine-choline deficient diet for 8 weeks using platelet-type 12-lipoxygenase-deficient mice was more progressed as compared with that in the model mice developed using wild-type mice. We found genes that suppressed the expression level of type I collagen mRNA in human hepatic stellate TWNT-1 cells by overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase.

研究分野：脂質生化学

キーワード：血小板型12-リポキシゲナーゼ 肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、生活習慣の欧米化に伴い我が国の肝疾患の中でも最も高頻度となった非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) に含まれる、慢性炎症性肝疾患である。NASH の予後不良を決定する独立因子として、早期から認められる肝線維化が重要であることが明らかにされている。肝線維化において中心的な役割を果たす細胞は、過剰なコラーゲン産生を担う活性化した肝星細胞 (筋線維芽細胞) であり、NASH 進展においてこの肝星細胞を活性化する因子として、TGF $\beta$  や PDGF をはじめとする多くのサイトカインや、活性酸素種などが知られている。これらの因子は、細胞内シグナル伝達を介して遺伝子発現のパターンを大きく変化させることにより、肝星細胞の活性化と筋線維芽細胞への分化を誘導すると考えられている。

12-リポキシゲナーゼは不飽和脂肪酸であるアラキドン酸に酸素を添加して過酸化脂質である12-ヒドロペルオキシ酸を生成する酵素で、多くのアイソザイムが知られている。正常肝ではほとんど検出されない12-リポキシゲナーゼ活性が、メチオニン・コリン欠乏食投与により作製したNASHモデルマウス肝において明確に検出できるレベルまで上昇すること、活性の免疫沈降によりそのアイソザイムが血小板型であることを突き止めた申請者らは、さらにこの血小板型12-リポキシゲナーゼが肝星細胞に局在しており、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を明らかにした。以上の結果から、本酵素がNASHの進展における肝線維化において、何らかの役割を果たしていると考え、その全容解明に向けて研究を開始した。

## 2. 研究の目的

当初は、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の過程で、その発現レベルが上昇する血小板型12-リポキシゲナーゼが、肝線維化の進行にどのように関わるか、血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現ヒト肝星細胞、ならびに血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスを用いてその全体像を解明し、申請者らがこれまで明らかにしてきた本酵素を阻害する機能性食品、あるいはその成分の中に、NASH 進展における肝線維化に対する抑制効果を示すものを見出すことを目的として研究を開始した。しかしながら、血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現ヒト肝星細胞とコントロールのMock細胞を樹立して最初に実施したDNAマイクロアレイ解析により、血小板型12-リポキシゲナーゼの過剰発現が、 $\alpha 1$ 型コラーゲン遺伝子COL1A1とCOL1A2をいずれも低下させることが示され、この結果は細胞から抽出したRNAのリアルタイムPCR分析でも支持された。これらの結果から、研究の目的を、血小板型12-リポキシゲナーゼがNASH進展に伴う線維化を実際に抑制する方向に働くかどうかの証明、ならびにその機構の解明に変更して、研究を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現ヒト肝星細胞株 (TWNT-1) の作製

ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ遺伝子をpCXN2とライゲーションして作製した発現プラスミドpCXN2-Alox12を、Lipofectamine2000を用いてヒト肝星細胞株TWNT-1にトランスフェクションし、G418で選択して安定形質発現株を複数得た。このうち2つのクローンと、空のpCXN2ベクターのトランスフェクションとG418による選択により得られたMock細胞を実験に用いた。最も比活性の高かったクローンとMock細胞からtotal RNAを抽出し、遺伝子発現レベルの解析に用いた。

### (2) 血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスを用いて作製したNASHモデルマウス肝の組織染色

すべての動物実験は岡山県立大学動物実験指針に基づいて岡山県立大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。血小板型12S-LOX遺伝子のエキソン8をネオマイシン耐性のカセットに置き換えて導入した血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウス (B6.129S2-Alox12tm1Fun/J、ジャクソン研究所) を購入し、バッククロスを7回以上繰り返した後に得たホモ接合体を普通固形飼料および水を自由摂取させて7週間飼育した。このマウスに8週間メチオニン・コリン欠損 (MCD) 食 (オリエンタル酵母工業社)、あるいはコントロールとして普通固形飼料を水とともに自由摂取させ、NASHモデルマウスの一つであるMCDマウスとコントロールマウスを作製した。また、もう一つのNASHモデルマウスとしてSTAMマウスは、生後2日齢でストレプトゾトシン200 mgを皮下投与し、4週齢から高脂肪食を水とともに自由摂取させて9週間飼育し

て作製した。メドトミジン・ミダゾラム・ブトルファノールによる麻酔下でと殺したマウスを開腹し肝門脈からPBSによる灌流後、肝臓を単離した。MCDマウスおよびSTAMマウスはいずれも、NASHとしての組織学的特徴を挺していることを確認した。線維化の程度は、単離した肝臓を4%パラホルムアルデヒドで固定した後にパラフィンに包埋して薄切し、飽和ピクロシリウスレッド液を用いてシリウスレッド染色を行い、染色された面積を測定した。

### (3) 遺伝子ノックダウンとリアルタイムPCR分析

マウス肝臓あるいは培養細胞からRNeasy Plus Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出し、cDNA合成を行った。SsoAdvanced SYBR Green Supermixを用いて遺伝子発現を解析し、18S RNAをハウスキープ遺伝子として相対的発現量を比較した。遺伝子ノックダウンは40nMのsiRNAをTWNT-1細胞株へLipofectamine2000を用いて24時間トランスフェクションし、培地交換してさらに48時間経過後の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより測定した。

### (4) 酵素活性測定方法

マウスから単離した肝臓あるいは培養細胞は、TE緩衝液中で破砕し、超遠心によりサイトソルを調製した。これをアラキドン酸と37℃で30分間反応させ、生成物を還元後、逆相のHPLCで分析して酵素活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 血小板型12-リポキシゲナーゼの発現は線維化を抑制する

ヒト肝星細胞株 TWNT-1 において、血小板型12-リポキシゲナーゼは、活性でもウエスタンでも検出可能なレベルでは発現していなかったため、ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ発現プラスミドを構築してこれをトランスフェクションし、G418で選択して、安定形質発現株を複数得た。このうち最も比活性の高かったクローンと、空のベクターをトランスフェクションして得たMock細胞からtotal RNAを抽出し、型コラーゲン遺伝子をコードするCOL1A1とCOL1A2の発現レベルをリアルタイムPCR分析で比較したところ、いずれの遺伝子の発現レベルも、ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ発現株において低下していることが示された(図1)。この結果は、活性が低い他のヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ発現株においても確認された。

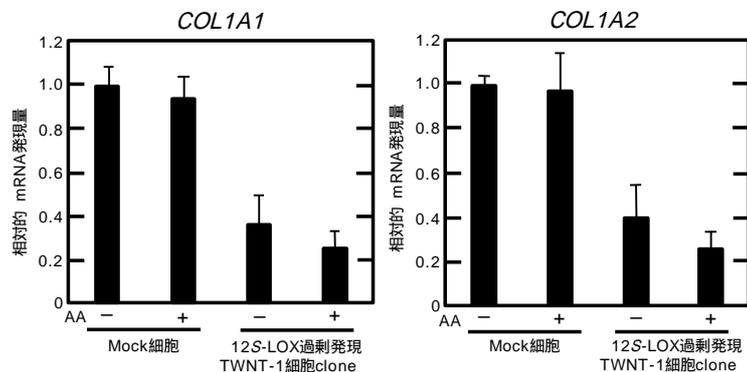


図1 ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現細胞におけるコラーゲン遺伝子の発現レベル

この結果を *in vivo* でも確認するため、野生型マウスと血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスにMCD食を摂取させて、NASHモデルマウスとしてのMCDマウスを作製した。いずれのマウスから作製したモデルマウスも、コントロールマウスと比較してシリウスレッドで染色される線維化の面積は増加していたが、野生型マウスから作製したMCDマウスと比較して、血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスから作製したMCDマウスでは、線維化面積が有意に高かった。(図2)

この結果をさらに確認するため、NASHモデルマウスとしてMCDマウスよりもNASHの病態をより反映していると考えられるSTAMマウスを、野生型マウスと血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスを用いて作製した。野生型マウスから作製したMCDマウスと比較して、血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスから作製したSTAMマウスでは、線維化面積が有意に高かった。また、それぞれのマウスから肝臓を単離してtotal RNAを抽出し、リアルタイムPCRで型コラーゲン遺伝子の発現レベルを比較したところ、血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスから作製したSTAMマウスでは発現レベルが有意に高かった。

以上の結果より、肝星細胞における血小板型12-リポキシゲナーゼの発現は、コラーゲン遺伝子の発現抑制を介して肝線維化を抑制する方向にはたらくことが示された。

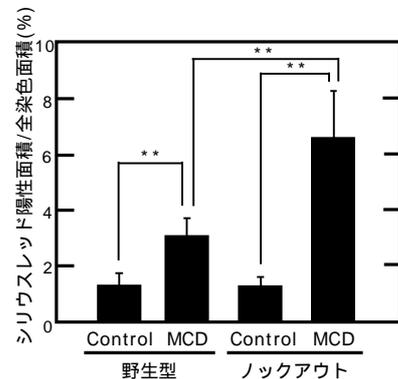


図2 血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスと野生型マウスから作製したNASHモデルマウスにおける線維化レベルの比較

## (2) 肝星細胞におけるコラーゲン遺伝子の発現抑制メカニズム

ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現肝星細胞TWNT-1とMock細胞、ならびに野生型細胞において、コラーゲン遺伝子以外にも線維化に関わる遺伝子の発現レベルが変化している遺伝子があるかどうかをリアルタイムPCRで調べたところ、ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現ヒト肝星細胞TWNT-1において有意に低下している遺伝子が複数見つかった。さらに血小板型12-リポキシゲナーゼノックアウトマウスにおいて、これらの遺伝子の肝での発現レベルは上昇していることも示された。そこで、野生型TWNT-1細胞において、siRNAを用いてこれらの遺伝子の特異的なノックダウンを行ったところ、いずれのノックダウンにおいても型コラーゲン遺伝子の発現レベルは低下傾向にあり、そのうち1つは有意な低下であった。しかしながらいずれのノックダウン細胞においても、コラーゲン遺伝子の発現抑制のレベルは、ヒト血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発現肝星細胞TWNT-1で観察されたレベルまでには至らなかった。このことから、肝星細胞における型コラーゲン遺伝子の遺伝子の抑制には、さらに多くの遺伝子が関与することが示唆された。

今後はメカニズムの解明に向け、これらの遺伝子の探索を進めるとともに、血小板型12-リポキシゲナーゼのどの生成物が線維化の抑制に関わっているかを明らかにしていく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagasaki Yuki, Kawai Erika, Maruoka Saya, Osumi Miho, Tsukayama Izumi, Kawakami Yuki, Takahashi Yoshitaka, Okazaki Yuka, Miki Yoshimi, Taketomi Yoshitaka, Yamamoto Kei, Murakami Makoto, Suzuki-Yamamoto Toshiko	4. 巻 630
2. 論文標題 Lipid profiling reveals the presence of unique lipid mediators in human milk from healthy and mastitic subjects	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 84 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.051	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 -

1. 著者名 Tsukayama Izumi, Kawakami Yuki, Tamenobu Asako, Toda Keisuke, Maruoka Saya, Nagasaki Yuki, Mori Yoshiko, Sawazumi Risa, Okamoto Kensuke, Kanzaki Keita, Ito Hideyuki, Takahashi Yoshitaka, Miki Yoshimi, Yamamoto Kei, Murakami Makoto, Suzuki-Yamamoto Toshiko	4. 巻 193
2. 論文標題 Malabaricone C derived from nutmeg inhibits arachidonate 5-lipoxygenase activity and ameliorates psoriasis-like skin inflammation in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.028	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 -

1. 著者名 Mitsui Tetsuo, Makino Satoshi, Tamiya Gen, Sato Hiroko, Kawakami Yuki, Takahashi Yoshitaka, Meguro Toru, Izumino Hiroko, Sudo Yosuke, Norota Ikuo, Ishii Kuniaki, Hayasaka Kiyoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 ALOX12 mutation in a family with dominantly inherited bleeding diathesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 753 ~ 759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-020-00887-6	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 -

1. 著者名 Tsukayama Izumi, Mega Takuto, Hojo Nana, Toda Keisuke, Kawakami Yuki, Takahashi Yoshitaka, Suzuki-Yamamoto Toshiko	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 & Other Lipid Mediators	6. 最初と最後の頁 106580 ~ 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 -

1. 著者名 Mori Yoshiko, Kawakami Yuki, Kanzaki Keita, Otsuki Akemi, Kimura Yuka, Kanji Hibiki, Tanaka Ryoma, Tsukayama Izumi, Hojo Nana, Suzuki-Yamamoto Toshiko, Kawakami Takayo, Takahashi Yoshitaka	4. 巻 168
2. 論文標題 Arachidonate 12S-lipoxygenase of platelet-type in hepatic stellate cells of methionine and choline-deficient diet-fed mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 455 ~ 463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa062	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 -

1. 著者名 Toda Keisuke, Tsukayama Izumi, Nagasaki Yuki, Konoike Yuka, Tamenobu Asako, Ganeko Natsuki, Ito Hideyuki, Kawakami Yuki, Takahashi Yoshitaka, Miki Yoshimi, Yamamoto Kei, Murakami Makoto, Suzuki-Yamamoto Toshiko	4. 巻 689
2. 論文標題 Red-kerneled rice proanthocyanidin inhibits arachidonate 5-lipoxygenase and decreases psoriasis-like skin inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108307 ~ 108307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2020.108307	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 -

1. 著者名 Toda Keisuke, Ueyama Mai, Tanaka Shomu, Tsukayama Izumi, Mega Takuto, Konoike Yuka, Tamenobu Asako, Bastian Februadi, Akai Iria, Ito Hideyuki, Kawakami Yuki, Takahashi Yoshitaka, Suzuki-Yamamoto Toshiko	4. 巻 84
2. 論文標題 Ellagitannins from Punica granatum leaves suppress microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and induce lung cancer cells to undergo apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 757 ~ 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1706442	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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 川上祐生、伊澤歩、岩岡裕二、戸田圭祐、津嘉山泉、山本登志子、伊東秀之、高橋吉孝
2. 発表標題 チェリー・オブ・ザ・リオ・グランデ葉に含まれる5-リボキシゲナーゼ阻害成分の探索
3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中龍舞、森香子、川上祐生、神崎圭太、津嘉山泉、川上貴代、山本登志子、高橋吉孝
2. 発表標題 NASHモデルマウス肝で発現上昇する血小板型12S-リポキシゲナーゼ
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021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

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 4- ISPMF (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020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	川上 祐生  (Kawakami Yuki)  (30453202)	岡山県立大学・保健福祉学部・准教授   (25301)	

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