

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890221

研究課題名（和文） NASH の肝線維化進展におけるプラスミンを介した炎症細胞浸潤の役割
解明研究課題名（英文） The role of the infiltration of inflammatory cells through plasmin
activation in the development of NASH-induced fibrosis

研究代表者

田村 行識 (TAMURA YUKINORI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40580262

研究成果の概要（和文）：メタボリックシンドロームを基盤病態として発症する非アルコール性脂肪肝炎（Non alcoholic steatohepatitis: NASH）は線維化を伴う脂肪肝炎を経て、肝硬変や肝癌に至る病態で、その病態解明と新たな治療戦略の確立は急務である。本研究課題では、血栓溶解に中心的な役割を果たす線溶系因子プラスミノゲン/プラスミンの非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病態進展における役割を、プラスミノゲンの欠損マウスやプラスミン阻害剤を用いて検討した。その結果、プラスミンによるマクロファージの浸潤増加およびその活性化促進が NASH の病態に対して増悪的に働いており、プラスミン阻害剤が NASH の新たな治療法として有効である可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Non alcoholic steatohepatitis (NASH), which is occurred on the basis of metabolic disorders such as metabolic syndrome, can progress to the fibrotic steatohepatitis, cirrhosis and hepatocarcinoma. Therefore, it is very important to clarify the mechanisms of the pathogenesis of NASH and establish the therapeutic strategy for this pathological state. In the present study, the role of plasminogen/plasmin, which plays a central role of fibrinolysis, in the development of NASH was examined using plasminogen-deficient mice or plasmin inhibitor. Our study demonstrated that plasmin contributes to the development of NASH presumably through promoting the macrophage infiltration and its activation, and also showed the possibility of plasmin inhibitor as therapeutic agent for NASH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,020,000	306,000	1,326,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,220,000	666,000	2,886,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：NASH、プラスミン、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪肝を基盤病態とし、炎症細胞の

浸潤・活性化による炎症と、組織の線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）という病態が、メタボリックシンドロームの蔓延と

ともに我が国でも患者が急増しており、注目されている。NASHの進展機序は未だに不明な点が多いが、肝細胞における異常な脂肪蓄積によって酸化ストレスなどの刺激による細胞障害が惹起され、炎症細胞浸潤を伴った炎症と線維化を引き起こす病態である。この病態における最大の問題点は、組織の線維化により、肝硬変や肝がんが誘発されることであり、NASHにおける線維化のメカニズムの解明とその治療法の確立は急務である。

線維化は、異常な組織修復による細胞外マトリックス (ECM) の過剰な蓄積によって起こるが、そのECMの蓄積にマクロファージが重要であることが報告されている (Duffield et al. J Clin Invest 2005)。さらに肝マクロファージの活性化が NASH の進展につながることを示唆されている (Rivera et al. J Hepatol 2007)。これらのことから、マクロファージの過剰な浸潤および活性化が、NASHにおける線維化の進展につながると考えられる。しかし、NASHにおける肝臓組織の炎症部位局所へのマクロファージの集積およびその活性化機序は明らかではない。

プラスミンは、血栓溶解に関わるセリンプロテアーゼで、肝臓で生成されるプラスミノゲンを前駆体とし、組織型、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (tPA, uPA) で活性化され、 $\alpha 2$ アンチプラスミンにより阻害される。tPA, uPAはプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) で阻害される。

近年の研究においてプラスミンがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化による ECM の分解を介して、炎症細胞の遊走・浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Gong et al. J Clin Invest 2008)。そしてマウスにおける光化学肝障害モデルにおいて、プラスミノゲンおよび uPA 欠損マウスでは、マクロファージと好中球の傷害部位への浸潤が著しく減少し正常な組織修復およびその過程で起こる線維化がほとんど起こらないことが報告されている (Kawao et al. Thromb Res 2010)。さらにプラスミンがマクロファージの活性化に直接関与していることも報告されている (Ward et al. BBRC 2006)。そして、線維化モデルマウスの肝臓において tPA, uPA の活性化が認められること (Montfort et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010)、NASH 患者の肝臓における MMP の発現増加が認められていることから (D' Amico et al. Acta histochemica 2009)、NASH における線維化進展過程においてもプラスミンが関与している可能性が極めて高い。しかしながら、NASH 病態におけるプラスミンの役割は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、NASHの病態進展および肝線維化におけるプラスミンを介した炎症細胞の浸潤・活性化の役割を検討し、本病態の新たな機序解明と、新たな治療法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

同腹子より得たプラスミノゲン欠損マウスとプラスミノゲン野生型マウス、およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PA) 欠損マウスとその野生型マウスを用いた。これらのマウスにメチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) およびコントロール食を2ヶ月間与えた。また、C57BL/6 マウスに MCD 食を2ヶ月間与え、その後、プラスミンの特異的阻害剤であるトラネキサム酸を5mg/mlの濃度で飲水に混ぜ、2週間投与した。

(2) 血中脂質と血中 ALT の測定

血漿コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸および血漿 ALT はそれぞれキットを用いて測定した。

(3) 肝臓組織脂質含量の測定

肝臓組織トリグリセリド含量は、以前報告されている方法に従い測定を行った

(Tamura et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008)。トリグリセリド含有量は、組織タンパク量で補正し、単位は mg/mg protein で表した。

(4) フィブリンザイモグラフィ法

u-PA と t-PA の活性はフィブリンザイモグラフィ法を用いて測定した。すなわち、ウシ由来プラスミノゲンリッチフィブリノゲンと 0.056 NIH U/ml のトロンビンを含んだ10%のポリアクリルアミドゲルを用い、タンパク質試料を泳動し、その後、2.5%のトリトン X 溶液中に60分間浸漬した。そして反応液 (0.5 M Glycine-HCl, pH 8.4) にて37°Cで18時間インキュベートした。ゲルをクマシーブルーR250液で1時間染色し、青い背景に白いバンドが検出されるまで、脱色液で数回洗浄した。

(5) 遺伝子発現量解析

肝臓組織50mgからRNAをRNeasy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。そして、逆転写酵素にてcDNAを合成し、ABI PRISM 7900T (Applied Biosystems)を用いて、リアルタイムPCR法による遺伝子発現解析を行った。

(6) 免疫組織学的解析

マウスをソムノペンチルによって麻酔し、心臓から生理食塩水 20ml を灌流した後、4% パラホルムアルデヒド溶液 30ml を灌流して肝臓を固定し採取した。次に採取した肝臓をパラフィンに包埋し、4 μ m の切片を作製した。切片をマクロファージの抗原 (F4/80) に対する抗体と反応させ、TSA 法によって可視化して顕微鏡下で観察した。

(7) アポトーシス解析

アポトーシスを起こした細胞は TUNEL 染色により検出した。そして、TUNEL 陽性の核をカウントして、全体の核の数に対する割合を算出した。

4. 研究成果

(1) MCD 食による肝臓におけるプラスミン活性の亢進効果

NASH を誘導した肝臓における線溶動態を評価するために、MCD 食を与えた野生型マウスの肝臓における t-PA 活性および u-PA 活性をフィブリンザイモグラフィ法で評価した。その結果、t-PA 活性および u-PA 活性は両者とも、MCD 食群ではコントロール食群に比べて約 4 倍の増加が認められた。また、肝臓における t-PA と u-PA mRNA の発現量をリアルタイム PCR で評価したところ、両者ともに著明な発現増加を認めた。このことから、NASH の病態においてプラスミン活性が亢進していることが示唆された。

(2) MCD 食による肝障害に対するプラスミノゲン遺伝子の欠損効果

NASH の病態進展に対するプラスミンの役割を検討するために、その前駆体プラスミノゲンの遺伝子欠損マウスに MCD 食を与え、NASH を誘導し、野生型マウスと比較検討を行った。MCD 食を与えた野生型マウスとプラスミノゲン遺伝子欠損マウスでは、体重および摂食量、血中脂質濃度 (総コレステロール、トリグリセライド、遊離脂肪酸) に差は認められなかった。また、MCD 食により、野生型マウスおよびプラスミノゲン遺伝子欠損マウス共に、著明な脂肪蓄積を示した。しかしながら、プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおいて、血中 ALT の上昇が、野生型マウスに比べて有意に抑制されていた。この結果より、プラスミノゲン遺伝子の欠損により、NASH 病態における肝傷害が抑制されていることが示唆された。

(3) MCD 食によるアポトーシス誘導に対するプラスミノゲン遺伝子の欠損効果

アポトーシス誘導は、肝障害に深く関わっているため、MCD 食によるアポトーシス誘導に対するプラスミノゲン遺伝子の欠損効果を検討した。MCD 食を与えた野生型マウスでは、TUNEL 陽性細胞が著明に増加しており、アポトーシスの著明な誘導が認められた。しかし、MCD 食を与えたプラスミノゲン遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、有意に TUNEL 陽性細胞が減少しており、プラスミノゲン遺伝子欠損によって NASH 誘導性のアポトーシスが抑制されることが示唆された。

(4) MCD 食による肝線維化進展に対するプラスミノゲン遺伝子の欠損効果

NASH 誘導性の肝線維化に対するプラスミンの役割を解明するために、MCD 食を与えたプラスミノゲン遺伝子欠損マウスと野生型マウスにおいて、線維化に関連する遺伝子の発現と、シリウスレッド染色による線維化の組織学的な評価を行った。線維化に関わる因子である 1 型コラーゲンと TGF β の発現は、野生型マウスにおいて MCD 食により、それぞれ約 8 倍、3 倍の増加を認めた。しかし、プラスミノゲン欠損マウスでは、その増加が有意に抑制されていた。また、シリウスレッド染色による組織学的解析の結果においても、線維化がプラスミノゲン欠損により抑制されていることが明らかとなった。また、線維化には肝星細胞の活性化が深く関与するため、そのマーカーである alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) の遺伝子発現量の比較を行った。その結果、プラスミノゲン遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比較して、MCD 食による alpha-SMA の増加の著明な抑制が認められた。このことから、NASH 病態で誘導される肝星細胞の活性化が、プラスミノゲン欠損により抑制されていることが示唆された。

(5) MCD 食誘導性のマクロファージ浸潤および炎症性変化に対するプラスミノゲン遺伝子の欠損効果

マクロファージの浸潤とそれに伴う炎症は肝障害や肝線維化に密接に関与している。そこで、MCD 食による肝臓へのマクロファージの浸潤を免疫組織学的手法にて評価を行った。野生型マウスにおいて、MCD 食の投与により、F4/80 陽性マクロファージはコントロール食に比べて約 2 倍に増加した。また、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現量解析においても同様に F4/80 mRNA の増加が認められた。しかしながら、プラスミノゲン欠損マウスでは、野生型マウスで見られたような、MCD 食による F4/80 陽性マクロファージの増加がほとんど認められなかった。

さらに、肝臓における炎症性変化を評価するために、TNF- α や IFN- γ の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて評価した。その結果、野生型マウスにおいて、これらの遺伝子発現の著明な増加が認められたが、プラスミノゲン欠損マウスにおいては、この増加が著明に抑制されていた。これらのことから、プラスミンは、NASH 病態におけるマクロファージの浸潤およびその活性化に伴う炎症に深く関与していることが示唆された。

(6) MCD 食誘導性の肝障害に対する u-PA 遺伝子の欠損効果

組織においてプラスミンを活性化する u-PA 遺伝子の NASH における役割を検討するため、u-PA 遺伝子欠損マウスに MCD 食を与え、野生型マウスと肝障害の程度を比較した。その結果、MCD 食を与えた u-PA 欠損マウスでは野生型マウスと比較して、血中 ALT の増加抑制傾向が認められたが、有意な差は認められなかった。これらのことから、u-PA の活性化が一部、プラスミンの活性化に関与していることが考えられるが、それ以外に t-PA の関与もプラスミン活性の機序として示唆された。

(7) MCD 食誘導性の肝障害に対するプラスミン阻害剤の効果

プラスミンの薬理的な阻害が、NASH の治療薬として有効かどうかを検討するために、NASH を誘導した野生型マウスに、プラスミンの特異的阻害剤トラネキサム酸を経口投与し、その肝障害に対する効果を解析した。その結果、コントロール群では、MCD 食により血中 ALT が著明に増加したが、トラネキサム酸投与群では、血中 ALT の有意な抑制が認められた。このことから、トラネキサム酸が NASH 病態を改善しうることが示唆された。

(8) 成果のまとめ

本研究において、線溶系因子のプラスミンが、肝臓の炎症および線維化を引き起こす NASH 病態の進展において重要な役割を果たしていることが示された。その機序として、プラスミンによる肝臓へのマクロファージ浸潤および活性化亢進が考えられる。また、プラスミンの特異的阻害剤であるトラネキサム酸が、本病態の治療薬として有効である可能性を示した。本研究で得られた知見は、NASH の病態解明に大きく貢献するものであり、また、トラネキサム酸などのプラスミンを標的とした NASH の新たな治療法の確立につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Okada K, Suzuki Y, Umemura K, Yano M, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen mediate activation of macrophage phagocytosis during liver repair in vivo. *Thromb Haemost.* 査読あり 2012;107(4):749-59

② Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator contributes to heterogeneity of macrophages at the border of damaged site during liver repair in mice. *Thromb Haemost.* 査読あり 2011. 105(5):892-900.

③ Tamura Y, Murayama T, Minami M, Yokode M, Arai H. Differential effect of statins on diabetic nephropathy in db/db mice. *Int J Mol Med.* 査読有. 2011. 28(5):683-7.

④ Tamura Y, Okada K, Kawao N, Yano M, Ueshima S, Nagai N, Matsuo O. Profibrinolytic effect of Enzamin, an extract of metabolic products from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus*. *J Thromb Thrombolysis.* 査読有. 2011. 32(2):195-200.

⑤ Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Ueshima S, Nagai N, Matsuo O. Spatiotemporal differences in vascular permeability after ischaemic brain damage. *Neuroreport.* 査読有. 2011. 22(9):424-7.

[学会発表] (計 1 件)

① Tamura Y. Potentiation of plasmin activity by Enzamin, an extract of metabolite from *Bacillus subtilis* AK and *Lactobacillus* in vitro and in vivo. 23th Congress of the International Society on Thrombosis Haemostasis. July 26, 2011, Kyoto.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：血栓性疾患予防食品
発明者：松尾理，岡田清孝，田村行識，後藤謙治
権利者：松尾理，株式会社エンザミン
種類：特許
番号：特願 2011-003856
出願年月日：2011年1月23日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/physio2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 行識 (TAMURA YUKINORI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40580262