

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460110

研究課題名(和文) IVA型PLA2を病態制御標的分子とした脂肪肝の発症機構と進展阻止に関する研究

研究課題名(英文) Involvement of group IVA phospholipase A2 in the development and progression of 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：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)の発症進展因子となることを、本酵素を介した細胞応答を担う病態責任細胞の同定をも含めて明確にし、実践的な応用として、特異的阻害薬による本酵素の抑制が病態の進展阻止に繋がることを検証した。IVA型PLA2を全身で欠損させたマウスでは肝線維化などの病変が軽減されたが、単球または内皮細胞での特異的な欠損マウスでは病変の軽減は見られなかった。一方、経口性IVA型PLA2阻害薬の投与はNASHモデルにおいて治療効果を示した。したがって、肝実質細胞や肝星細胞のIVA型PLA2が病態進展に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated a possible involvement of group IVA phospholipase A2 (PLA2), an inflammatory enzyme, in the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). The results showed that the development of NASH was suppressed in PLA2-knockout mice but not monocyte- or endothelial cell-specific conditional PLA2 knockout mice. A specific inhibitor of PLA2 ameliorated liver fibrosis in NASH model mice. The present results suggest that the development and progression of NASH is mediated by PLA2 probably in hepatocytes and/or hepatic stellate cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 ホスホリパーゼA2 マクロファージ 炎症

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、過度の飲酒歴なしに脂肪肝から肝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、高脂肪食・過食に起因した肝細胞での脂肪蓄積と酸化ストレスの亢進により発症し、マクロファージ等の集積した炎症細胞による慢性炎症と、これに続く肝星細胞の活性化により肝線維化をきたす肝疾患である。特に、肝線維化は肝硬変・肝癌へと進展していくことから、肝線維化阻止を目指した治療戦略の確立が国内外を問わず重要視されている。しかしながら、現在、NASH の治療としては第一に食事・運動療法であるが、脂肪肝から肝線維化へと至る過程では無症状のためコンプライアンス不良となりやすい。そのため、病態進展に関与する分子に作用する治療薬の使用や開発が望まれるが、NASH での酸化ストレスの抑制を狙った抗酸化性ビタミンや、肝脂肪蓄積の改善を期待した脂質異常症治療薬の臨床上的効果は低く、肝線維化阻止に有効な薬物療法は未だ確立されていないことが現状の問題点である。したがって、効果的な治療薬の開発には、これまでとは異なる創薬観点が必須となる。本研究では、炎症を担う分子として着目した IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (IVA-PLA₂) が NASH における肝線維化過程に関与すると考え、IVA-PLA₂ 欠損マウスおよび新規 IVA-PLA₂ 特異的阻害剤を用いて本酵素を介した進展機構や阻害剤の有効性について検証することとした。

2. 研究の目的

NASH では肝脂肪蓄積と炎症反応の繰り返しにより肝線維化へと進展すると捉えられることから、申請者は、脂肪蓄積と炎症の両過程に共通する因子の阻害が効果的な NASH の進展阻止に繋がると考え、両過程に関与するプロスタグランジン E₂ 等の脂質性生理活性物質の産生初発酵素である IVA-PLA₂ に着目した。既に申請者は、本酵素の全身欠損マウスでは、高脂肪食誘発性の肝脂肪蓄積と線維化のみならず、酸化ストレス誘発性 (四塩化炭素の投与) の脂肪蓄積を伴わない肝線維化も、単球遊走因子 (MCP-1) や transforming growth factor-β1 (TGF-β1) 等の発現増大も含めて、野生型に比し軽減していることを国内外に先駆けて報告した (FASEB J., 2012; PLoS ONE, 2009)。このことから、IVA-PLA₂ が肝細胞での脂肪蓄積およびマクロファージが担う肝線維化の両過程に関与すると考えられる。

しかしながら、この欠損マウスでの NASH の病態軽減が肝細胞またはマクロファージが有する IVA-PLA₂ の欠損に起因するとは、本酵素の全身欠損マウスの実験結果からは必ずしも結論付けられない。一方で、肝組織内の内皮細胞やコラーゲン産生を担う肝星細胞の IVA-PLA₂ が関与する可能性も否定で

きない。この点を明らかにすることが本研究の目的であり、IVA-PLA₂ を介した細胞応答を担う病態責任細胞を明確化することで、本酵素が関与する NASH の発症機構を解明する。また、IVA-PLA₂ の全身欠損マウスでの結果を踏まえると、本酵素の阻害が NASH での肝線維化阻止に繋がる可能性は高い。それゆえ、本研究では、臨床応用への基礎的知見を得る目的で、新規経口性 IVA-PLA₂ 阻害薬を用いた実験系にて、本酵素が臨床応用可能な肝脂肪蓄積・線維化の阻止標的分子となることを実証する。

3. 研究の方法

(1) 全身または細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでの検討

単球や、内皮細胞、肝実質細胞、肝星細胞での特異的な IVA-PLA₂ 欠損マウスの作出に関して、各細胞特異的な IVA-PLA₂ 欠損マウスを Cre-loxP システムにて作出した。当該マウスは、IVA-PLA₂^{fllox/fllox} マウス (IVA-PLA₂ コンディショナルノックアウトマウス) と、各細胞でのみ Cre リコンビナーゼを発現するマウスとの交配を経て作出することを計画した。この特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスおよび全身欠損マウスに、高脂肪食 (16 週間) または四塩化炭素 (6 週間: 酸化ストレス誘発性) の投与をした後、対照マウスとの比較下に肝を試料とした組織学的 (HE 染色、シリウスレッドによる線維の染色) な解析をはじめ、種々の病態進展因子の発現変動の有無について検討した。また、血中脂質組成や、肝障害マーカー (ALT、AST)、肝組織中の中性脂質量を測定した。これらの結果から、肝細胞中の IVA-PLA₂ が NASH の発症進展において鍵となる細胞応答を担っていることを検証した。

(2) 阻害薬での検討

IVA-PLA₂ 全身欠損マウスでは、高脂肪食投与による脂肪肝形成・肝線維化が野生型に比し軽減されていること (FASEB J., 2012; PLoS ONE, 2009) から、本酵素の阻害薬は NASH での脂肪肝・肝線維化に対して抑制作用を示すと推察される。この点を明確にするため、高脂肪食または四塩化炭素投与下の野生型マウスに、新規 IVA-PLA₂ 特異的阻害薬である ASB14780 (3-[1-(4-phenoxyphenyl)-3-(2-phenylethyl)-1H-indol-5-yl]propanoic acid 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol salt) を経口投与 (~300 mg/kg/day) し、肝線維化に対する本阻害薬の効果を検証した。また、16 週間の高脂肪食投与での 10 週間の投与終了時から、阻害薬の投与を開始する系でも検討した。これらマウスの肝等を試料として、項目(1)に記載した解析を行った。

(3) 細胞系での検討

NASH での肝臓における酸化ストレスの蓄積や、肝実質細胞における細胞死、肝星細胞

胞の活性化における IVA-PLA₂ の役割を明らかにするため、肝実質細胞や、マクロファージ、肝星細胞などの各培養細胞を用いた系にて、各細胞における脂肪酸刺激下および酸化ストレス誘発状態での、酸化ストレスの蓄積、細胞死、炎症性サイトカインの発現、コラーゲンの産生などに対する IVA 型 PLA₂ の欠損・阻害による影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 全身または細胞特異的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでの検討

IVA-PLA₂ の全身欠損マウスにおいては、既に報告したように、高脂肪食や、脂肪肝を経由せずに酸化ストレスを初発とした肝線維化を誘起する四塩化炭素の投与による肝線維化や、コラーゲン線維の蓄積、これを産生する肝星細胞の活性化が減少していた。また、肝星細胞の活性化に關与する炎症細胞の変動を調べたところ、IVA-PLA₂ 全身欠損マウスでは単球やマクロファージのマーカーである F4/80 や CD11b の mRNA 発現量およびこれらの遊走因子である MCP-1 の mRNA 発現量が減少していた。一方、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞や NKT 細胞は、定量的 RT-PCR 解析や FACS 解析では野生型において見られた肝組織への集積は欠損型では抑制されなかった。したがって、IVA-PLA₂ は NASH において肝線維化形成に關与しており、それに単球やマクロファージの浸潤を促進させる機構が關与することが示唆された。そこで、MCP-1 の産生を担うマクロファージや内皮細胞の IVA-PLA₂ を特異的に欠損させたマウスを作出し、高脂肪食を投与したが、残念ながら、これらのコンディショナルノックアウトマウスでは、病変の軽減は見られなかった。

(2) 阻害薬での検討

肝線維化過程への IVA-PLA₂ の關与が示唆されたことから、その阻害が病態の進展阻止に繋がる可能性を新規経口活性型 IVA-PLA₂ 特異的阻害薬 (ASB14780) を用いて検証した。この阻害薬を四塩化炭素誘発性の NASH モデルマウスに連日投与した結果、肝組織でのコラーゲン線維の蓄積、単球/マクロファージの集積、MCP-1 の mRNA 発現増加が抑制された。一方、高脂肪食の摂取下でも、ASB14780 の連日投与は肝での SREBP1c などの脂質合成關連分子の mRNA 発現増加を抑え、脂肪肝形成を抑制した。さらに、四塩化炭素 (図 1) または高脂肪食の投与による病変が形成された状態に ASB14780 を投与し、その治療効果を検証した結果、ASB14780 は肝線維化や脂肪肝の進行を抑え、肝組織障

害の回復を促した。したがって、IVA-PLA₂ は NASH の進展阻止に有効な標的分子となる可能性が示された。

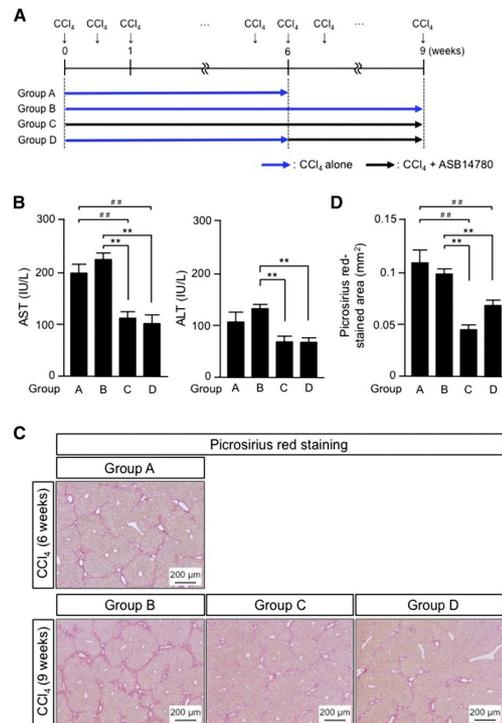


図 1 四塩化炭素投与による肝障害 (B) 肝線維化 (C, D) に対する IVA-PLA₂ 特異的阻害薬 (ASB14780) の抑制および治療効果: A に四塩化炭素および ASB14780 の投与条件を示した。

(3) 細胞系での検討

肝実質細胞における IVA-PLA₂ の役割

NASH において、肝実質細胞における細胞死に細胞内分解系であるオートファジーが關与することが示唆されていることから、野生型マウスおよび IVA-PLA₂ 欠損マウス由来肝実質細胞を初代培養し、オートファジーのマーカーである LC3- の発現量を解析した。その結果、IVA-PLA₂ の欠損により LC3- が増加したことから、IVA-PLA₂ の欠損によりオートファジーが誘起されることが明らかとなった (図 2)。さらに、IVA-PLA₂ の欠損によるオートファジーの亢進が、酸化ストレスによる肝実質細胞の細胞死を抑制している可能性を考え、酸化ストレス誘発物質であるパラコートによる細胞死に対する IVA-PLA₂ 欠損の影響を解析したが、酸化ストレス誘発性細胞死は IVA-PLA₂ の欠損により抑制されなかった。

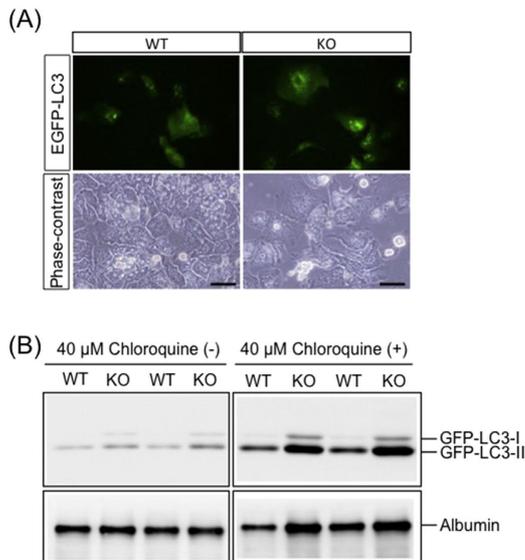


図2 IVa-PLA₂欠損下の肝実質細胞でのLC3- (オートファジー・マーカー)の発現亢進:野生型(WT)またはIVa-PLA₂欠損(KO)マウス由来の初代培養肝実質細胞にGFP-LC3を発現ベクターにて強制発現させた後、オートファゴソーム/リソソームでの分解を抑制するクロロキン存在下にLC3-の量的変動をGFPの蛍光やGFPに対する抗体にて検出した(アルブミンは内部標準)。

マクロファージにおけるIVa型PLA₂の役割

野生型マウス由来腹腔内マクロファージを初代培養し、酸化ストレス誘発物質であるパラコート処理下でのMCP-1の発現誘導に対するIVa-PLA₂阻害薬の影響を検討した。パラコート未刺激の細胞におけるMCP-1の発現に対し、IVa-PLA₂阻害薬はほとんど影響を及ぼさなかった。次に、パラコートを6時間あるいは24時間暴露することにより誘導されたMCP-1の発現量に対するIVa型PLA₂阻害剤の影響を解析したが、パラコートによるMCP-1の発現誘導に対してIVa-PLA₂阻害薬はほとんど影響せず、酸化ストレスによるMCP-1の発現にIVa-PLA₂は関与していないことが示唆された。

肝星細胞におけるIVa-PLA₂の役割

ヒト由来不死化肝星細胞であるTWNT-1細胞における α -SMA(活性化マーカー)の発現やコラーゲンおよびMCP-1産生に対するIVa-PLA₂阻害薬の影響を検討した。その結果、IVa-PLA₂阻害薬存在下では、TWNT-1細胞における α -SMAの発現量が減少しており、また、コラーゲンおよびMCP-1の発現も有意に抑制された。

(4) まとめ

本研究での成果をまとめると、肝実質細胞や肝星細胞のIVa型PLA₂を標的とした阻害薬が、それぞれ脂肪肝や、これに起因した肝

線維化に伴うNASHへの進展を抑制する治療薬となりうることを示唆された。しかしながら、本研究期間では検討しきれなかった肝実質細胞や肝星細胞での特異的なIVa-PLA₂欠損マウスを用いた検討が必須であることから、今後も、このような観点からの検討を継続したい。

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3件)

Shiho Kanai, Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Toshiyuki Tomoo, Kazuhiro Nagahira, Yasuhiro Hayashi, and Satoshi Akiba: ASB14780, an orally active inhibitor of group IVA phospholipase A₂, is a pharmacotherapeutic candidate for nonalcoholic fatty liver disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **356**, 604-614 (2016). 査読有
<https://doi.org/10.1124/jpet.115.229906>

Keiichi Ishihara, Shiho Kanai, Kikuko Tanaka, Eri Kawashita, and Satoshi Akiba: Group IVA phospholipase A₂ deficiency prevents CCl₄-induced hepatic cell death through the enhancement of autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **471**, 15-20 (2016). 査読有
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.186>

Dong Ju Son, Satoshi Akiba, Jin Tae Hong, Yeo Pyo Yun, Seock Yeon Hwang, Young Hyun Park, and Sung Eun Lee: Piperine inhibits the activities of platelet cytosolic phospholipase A₂ and thromboxane A₂ synthase without affecting cyclooxygenase-1 activity: different mechanisms of action are involved in the inhibition of platelet aggregation and macrophage inflammatory response. *Nutrients*, **6**, 3336-3352 (2014). 査読有
<https://doi.org/10.3390/nu6083336>

[学会発表](計12件)

今田百南、河下映里、石原慶一、江川奈生、木原望、倉田麻未、種草大貴、秋葉 聡:細胞培養系を用いたNASH病態進展におけるIVa型phospholipase A₂の機能解析. 日本薬学会第137年会、2017.3.26、「仙台国際センター(宮城県・仙台市)」

福本紗与、河下映里、石原慶一、泰地健芳、秋葉 聡:酸化ストレス誘発性肝線維化の進展過程におけるIVa型ホスホリパーゼA₂の役割の解明. 日本薬学会第137年会、2017.3.25、「仙台国際セン

ター (宮城県・仙台市)」

種草大貴、河下映里、石原慶一、秋葉聡 : NASH 進展に關与する肝細胞及びマクロファージにおける IVA 型 phospholipase A₂ の役割 . 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016.10.15、「大阪薬科大学 (大阪府・高槻市)」

藤井美恵子、河下映里、石原慶一、秋葉聡 : 酸化ストレス誘発性肝障害における IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の役割 . 日本薬学会第 136 年会、2016.3.29、「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

木原 望、金井志帆、厚味巖一、河下映里、石原慶一、秋葉 聡 : 動脈硬化症における M2 型マクロファージ極性化への IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の關与 . BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015.12.1、「神戸ポートアイランド (神奈川県・横浜市)」

田中紀久子、和田尚子、吉田彩奈加、河下映里、石原慶一、秋葉 聡 : IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の欠損による肝細胞オートファジーの促進 . 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015.10.17、「大阪大谷大学 (大阪府・富田林市)」

金井志帆、倉井悠貴、石原慶一、秋葉聡 : IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の阻害による非アルコール性脂肪肝炎の抑制作用 . 日本薬学会第 135 年会、2015.3.27、「神戸学院大学 (兵庫県・神戸市)」

Satoshi Akiba: Amelioration of oxidative stress-induced liver injury and fibrosis by cPLA₂ α deficiency. 6th international conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators (PLM2015), 2015.2.11、「京王プラザホテル (東京都・新宿区)」

Shiho Kanai, Keiichi Ishihara, and Satoshi Akiba: Suppressive effects of group IVA phospholipase A₂-deficiency on the liver injury and hepatic fibrosis induced by oxidative stress in mice. The Liver Meeting 2014, 2014.11.8, 「Boston, MA, (USA)」

和田尚子、金井志帆、石原慶一、秋葉聡 : IVA 型 Phospholipase A₂ 欠損による薬剤誘発性肝障害の抑制 . 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、「京都薬科大学 (京都府・京都市)」

松岡秀明、大西健太、石原慶一、金井志帆、秋葉 聡 : 肝線維化誘発 IVA 型 Phospholipase A₂ 欠損マウスにおける脾臓肥大 . 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2014.10.11、「京都薬科大学 (京

都府・京都市)」

金井志帆、倉井悠貴、古庄由佳、西川瑞稀、石原慶一、秋葉 聡 : 脂肪肝形成に対する経口性 IVA 型ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤の抑制効果 . 第 61 回日本生化学会近畿支部例会、2014.5.17、「京都産業大学 (京都府・京都市)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byoutai/byoutai-j.html>

6. 研究組織

(1) 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 : 7 0 2 3 1 8 2 6

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

石原慶一 (ISHIHARA, Keiichi)
京都薬科大学・薬学部・講師
研究者番号 : 8 0 3 4 0 4 4 6

河下映里 (KAWASHITA, Eri)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 : 8 0 5 0 9 2 6 6

(4) 研究協力者

該当者なし