

2019年度 独創的研究助成費 実績報告書

2020年3月23日

報告者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	高橋 吉孝
研究課題	NASH予防に向けた血小板型12-リポキシゲナーゼの肝星細胞における役割の解明					
研究組織	氏名	所属・職		専門分野	役割分担	
	代表	高橋 吉孝	栄養学科・教授	病態栄養学	総括・酵素実験	
	分担者	川上 祐生	栄養学科・准教授	分子生物学	細胞実験・動物実験	
研究実績の概要	<p>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) の病型の一つである。NASH はメタボリック症候群を基盤として肝臓に脂肪が蓄積した単純性脂肪肝にセカンドヒットとして酸化ストレスなどが加わることによって引き起こされると考えられている慢性炎症性肝疾患で、高率に肝硬変から肝臓癌に進行する。NASHの発症・進展のメカニズムについては国内外において多くの研究がなされているが、未だに不明な点が多く、確立した予防法も薬物療法も知られていない。これまでの国外の研究でセカンドヒットに、過酸化脂質生成酵素であるリポキシゲナーゼが関与することを示唆する報告がなされているが、ノックアウトマウスを使った研究などから、その分子種は白血球型12-リポキシゲナーゼであるとされてきた。しかしながら、本研究室で科学研究費を獲得して進めてきた昨年度までの研究により、NASHモデルマウスで上昇する酵素は、白血球型ではなく血小板型12-リポキシゲナーゼである可能性が示唆された。さらに、この酵素が肝線維化において中心的な役割を果たす活性化肝星細胞 (筋線維芽細胞) に局在することを明らかにした。</p> <p>本計画ではこの血小板型12-リポキシゲナーゼが筋線維芽細胞においてどのような役割を果たすかを解明することにより、NASH発症メカニズムの一端を解明し、NASHに対する新規予防法を確立するための基盤的知見を得ることを目的として行った。</p>					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>これまでの本研究室での研究により、メチオニン・コリン欠損食を給餌することにより作成した NASH モデルマウス肝において過酸化脂質生成酵素である 12-リポキシゲナーゼ活性がコントロールマウスに比べて 40 倍以上上昇し、上昇する酵素活性のすべてが血小板型 12-リポキシゲナーゼであることを、特異的な抗体を用いて酵素活性を免疫沈降させることにより明らかにした。さらに、同じ抗体を用いた免疫染色により、本酵素が肝非実質細胞の中でも、コラーゲンを過剰産生することにより肝線維化に直接関与する筋線維芽細胞に発現していることを証明した。本酵素は免疫染色により、この筋線維芽細胞の前駆細胞である肝星細胞にも検出されたが、これ以外の細胞には検出されなかった。</p> <p>そこで、血小板型 12-リポキシゲナーゼを持たないことを確認済であるヒト肝星細胞株 TWNT-1 に、血小板型 12-リポキシゲナーゼ発現ベクターを導入して血小板型 12-リポキシゲナーゼを過剰発現する安定形質発現株を樹立した。この細胞にアラキドン酸を添加して過酸化脂質を産生させたときに、コラーゲン遺伝子である COL1A1 および COL1A2、あるいはコラーゲン分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 に対して強力な阻害因子としてはたらく TIMP-1 遺伝子の発現レベルが上昇するかどうかをリアルタイム PCR で調べたが、一貫した結果が得られなかった。そこで、血小板型 12-リポキシゲナーゼ過剰発現 TWNT-1 細胞と、発現していないコントロール細胞である Mock 細胞をアラキドン酸で処理し、それぞれから抽出した RNA を用いてそれぞれの細胞における遺伝子発現プロファイルを網羅的に調べる DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、アラキドン酸処理をした Mock 細胞と比較して、アラキドン酸処理をした血小板型 12-リポキシゲナーゼ過剰発現 TWNT-1 細胞においては、発現レベルが有意に変化している遺伝子が複数存在することが明らかとなった。今後、これらの遺伝子の発現レベルの変化の生理学的意義、ならびに本酵素生成物によるこれらの遺伝子の発現調節機構について、細胞ならびにノックアウトマウスを用いた詳細な解析が必要となる。</p>
<p>成果資料目録</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Toda K, Tsukayama I, Nagasaki Y, Konoike Y, Tamenobu A, Ganeko N, Ito H, Kawakami Y, Takahashi Y, Miki Y, Yamamoto K, Murakami M, Suzuki-Yamamoto T. Red-kerneled rice proanthocyanidin inhibits arachidonate 5-lipoxygenase and decreases psoriasis-like skin inflammation. <i>Arch Biochem Biophys</i>. in press. (2020) 2. Toda K, Ueyama M, Tanaka S, Tsukayama I, Mega T, Konoike Y, Tamenobu A, Bastian F, Akai I, Ito H, Kawakami Y, Takahashi Y, Suzuki-Yamamoto T. 2020 Ellagitannins from <i>Punica granatum</i> leaves suppress microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and induce lung cancer cells to undergo apoptosis. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 84 (4) :757-763. (2020)