

## 2021年度 独創的研究助成費 実績報告書

2022年2月16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	ノックアウトマウスを活用した12-リポキシゲナーゼの肝における病態生理学の解明					
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	病態生化学	研究総括・細胞実験	
	分担者	戸田 圭祐 田中 龍舞	栄養学科・助教 博士前期課程栄養学 専攻・2年次生	脂質生化学 栄養学	動物実験 酵素活性測定	
研究実績の概要	<p>非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の病型の一つである非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は、メタボリック症候群を基盤として発症する単純性脂肪肝に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ある。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酸化ストレスとして、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ことを明らかにした。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-リポキシゲナーゼのノックアウトマウスならびに過剰発現系を活用して、本酵素のNASH進行に関わる病態生理学を解明し、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実施した。</p> <p>肝線維化において中心的な役割を果たす肝星細胞で、この血小板型12-リポキシゲナーゼがどのように働いているかを解明するために、ヒト肝星細胞株にヒト血小板型12-リポキシゲナーゼを導入し、酵素活性を検出できるレベルの安定形質発現株を複数得ることに成功した。さらに、DNAマイクロアレイ解析により肝星細胞株において血小板型12-リポキシゲナーゼの存在によりコラーゲン遺伝子の発現レベルの低下が示された。さらに、リアルタイムPCRで調べたところ、血小板型12-リポキシゲナーゼを過剰発現させた複数の肝星細胞株のクローンのいずれにおいても、コラーゲン遺伝子の発現レベルは低下していた。このうち、酵素活性の最も高いクローンにsiRNAを導入して血小板型12-リポキシゲナーゼをノックダウンすると、コラーゲン遺伝子の発現レベルはほぼ野生型レベルにまで回復した。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MCD食を給餌してNASHモデルマウスを作成したところ、野生型マウスと比較して線維化のレベルが有意に上昇していることが確認された。コラーゲン遺伝子の上昇に関わるサイトカインの一つとしてTGF<math>\beta</math>が知られている。TGF-<math>\beta</math>はTGF-<math>\beta</math>受容体2に結合すると、TGF-<math>\beta</math>受容体1の細胞膜直下に存在するGSドメインがリン酸化され、セリン/スレオニンキナーゼが活性</p>					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>化により Smad2、Smad3 がリン酸化される。リン酸された Smad2 と Smad3 は Smad4 と複合体を形成し、核内へ移行して転写因子として TGF-<math>\beta</math> 応答エレメントに結合し、COL1A1、COL1A2 の発現を上昇させると考えられている。そこで、血小板型 12-リポキシゲナーゼを過剰発現させた複数の肝星細胞株のクローンにおいて、TGF <math>\beta</math> 受容体 2 の発現レベルをリアルタイム PCR で調べたところ、いずれのクローンにおいてもその発現レベルは低下していた。また、酵素活性の最も高いクローンに TGF-<math>\beta</math> 1 を添加して、コラーゲン遺伝子の発現レベルがどのように変化するかを調べたところ、野生型細胞と Mock 細胞においては TGF-<math>\beta</math> 1 を添加すると、添加していない細胞と比較してコラーゲン遺伝子の発現量が有意に増加したが、血小板型 12S-LOX 過剰発現細胞ではどちらも TGF-<math>\beta</math> 1 を添加してもコラーゲン遺伝子の発現量に有意な変化はなく、TGF-<math>\beta</math> 1 への反応性が低下していることが示唆された。以上より、NASH モデルマウスにおける肝線維化進行の血小板型 12S-LOX による抑制は TGF <math>\beta</math> 受容体 2 の発現抑制を介している可能性が示唆された。</p>
<p>成果資料目録</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 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. 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. 第75回日本栄養・食糧学会大会. 2021年7月3日～4日. オンライン開催(東京)</li> <li>2. 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. 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. 第 63 回脂質生化学会. 2021 年 6 月 9 日～10 日. オンライン開催(高松)</li> <li>3. 津嘉山泉、爲延麻子、川上祐生、戸田圭祐、長崎祐樹、丸岡紗也、高橋吉孝、三木寿美、村上誠、山本登志子. ナツメグ含有成分 Malabaricone C による 5-リポキシゲナーゼ活性阻害と乾癬予防効果. 第 62 回日本生化学会 中国・四国支部例会. 2021 年 9 月 10 日～12 日. オンライン開催(岡山)</li> </ol> <p>ほか 2 件</p>