

## 平成30年度 独創的研究助成費 実績報告書

平成31年3月5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	リポキシゲナーゼを標的とした非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の新規予防法開発を目指す基礎研究					
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	総括・細胞への遺伝子導入	
	分担者	川上 祐生 山本登志子	栄養学科・准教授 栄養学科・教授	分子生物学 組織学	酵素活性調節機構 免疫染色	
研究実績の概要	非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、非アルコール性脂肪性肝疾患の病態の一型であり、アルコール性肝炎に組織像が類似する肝炎である。本疾患は、栄養過剰による肥満が原因となる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、いわゆる単純性脂肪肝に、セカンドヒットとして酸化ストレス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が、どのような酸化ストレスが加わることにより、どのようにして肝炎に至るのかについての詳細なメカニズムはまだ明らかにはされていない。これまでの国外の研究において、セカンドヒットに、酸素添加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、					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>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は、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、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モデルマウスで活性が上昇する酵素は、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血小板型12-リポキシゲナーゼに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。本計画ではこの血小板型12-リポキシゲナーゼがどのようにNASHの進行に関わるか、そのメカニズムの一端を解明することにより、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>これまでの本研究室での研究で、NASHモデルマウスの肝において、血小板型12-リポキシゲナーゼの肝臓における非活性がきわめて低いことから、限られた細胞での発現であることを予測し、実際に組織を構成する細胞を密度勾配遠心法で分画して、それぞれから可溶性画分を調製し、上記の抗体を用いたウエスタンブロットを行うことにより、本酵素が肝実質細胞ではなく、非実質細胞に発現していることを明らかにした。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肝星細胞に発現していること証明した。驚くべきことに、本酵素蛋白は、12-リポキシゲナーゼ活性が検出されないコントロールマウスから調製した肝非実質細胞でもウエスタンブロットでほぼ同じレベルの発現が認められること、リアルタイムPCRにより mRNA レベルで比較しても、コントロールマウス肝と NASH モデルマウス肝の間で、血小板型12-リポキシゲナーゼの発現量に有意差がないこと、コントロールマウスの肝星細胞でも血小板型12-リポキシゲナーゼが免疫染色されることが示された。大腸菌で発現させた血小板型12-リポキシゲナーゼが活性を持つことから、本酵素は活性の発現に翻訳後修飾が必要でないことが示されている。従って、コントロールマウスの肝臓で酵素蛋白が存在するにも関わらず活性が検出できないことは、コントロールマウスの肝において、本酵素を不活化する機構が働いていることが示唆される。そこでまず、コントロールマウスの肝の可溶性画分の血小板型12-リポキシゲナーゼを免疫沈降して活性が現れるかどうかを確認したところ、抗体量に応じて沈殿で血小板型12-リポキシゲナーゼ活性が検出されることを明らかにした。そこで、コントロールマウスで酵素活性をマスクしているものとしてグルタチオンペルオキシダーゼを考え、MASHモデルマウスとコントロールマウスの肝からそれぞれ調製したサイトゾルのグルタチオンペルオキシダーゼ活性を測定したところ、NASHモデルマウスにおいて有意に低かった。しかしながら、コントロールマウス肝サイトゾルのグルタチオンペルオキシダーゼをヨード酢酸で阻害しても、血小板型12-リポキシゲナーゼ活性は検出されなかった。以上より、コントロールマウス肝において血小板型12-リポキシゲナーゼはグルタチオンペルオキシダーゼ以外のメカニズムでマスクされていることが示唆された。</p>
<p>成果資料目録</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kawakami Y, Otsuki A, Mori Y, Kanzaki K, Suzuki-Yamamoto T, Fang DZ, Ito H, Takahashi Y. Involvement of the Hydroperoxy Group in the Irreversible Inhibition of Leukocyte-Type 12-Lipoxygenase by Monoterpene Glycosides Contained in the Qing Shan Lu Shui Tea. <i>Molecules</i>. 2019 Jan 15;24(2). pii: E304.</li> <li>2. Tsukayama I, Toda K, Takeda Y, Mega T, Tanaka M, Kawakami Y, Takahashi Y, Kimoto M, Yamamoto K, Miki Y, Murakami M, Suzuki-Yamamoto T. Preventive effect of <i>Dioscorea japonica</i> on squamous cell carcinoma of mouse skin involving down-regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> synthetic pathway. <i>J Clin Biochem Nutr</i>. 2018 Mar;62(2):139-147.</li> </ol>