

## 2022年度 独創的研究助成費 実績報告書

2023年2月8日

申請者	学科名	栄養学科	職名	教授	氏名	高橋 吉孝
研究課題	血小板型12-リポキシゲナーゼによる肝線維化抑制機構の解明					
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 玉井 玲名	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 遺伝子解析実験	
研究実績の概要	<p>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非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病型の一つで、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。本疾患は進行すると肝の線維化を引き起こし、最終的に肝硬変に至ることが知られているが、その進展のメカニズムについては多くの研究がなされているにも関わらず未だに不明な点が多く、確立した予防法も治療法も知られていない。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、本研究室で作成した NASH モデルマウスにおいて血小板型12-リポキシゲナーゼ活性が上昇すること、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、国際誌において発表した。</p> <p>科学研究費を獲得してこれまでの本研究室で行った研究成果として、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ほぼすべてが血小板型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>12-リポキシゲナーゼは過酸化脂質を生成する酵素であり、過酸化脂質は肝線維化において中心的な役割を果たす肝星細胞の強力な活性化因子となることが報告されているため、当初、肝星細胞はオートクリン的に過酸化脂質を産生して自身を活性化すると考えていた。しかしながら、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のクローン複数を獲得することに成功したため、その一つについて DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、血小板型12-リポキシゲナーゼの発現によりコラーゲンをコードしている <i>COL1A1</i> と <i>COL1A2</i> の発現レベルは、コントロールである Mock 細胞と比較して、意外なことに低下していることが示された。実際、siRNA を用いて、導入した血小板型12-リポキシゲナーゼをノックダウンすることにより、<i>COL1A1</i> と <i>COL1A2</i> の発現レベルが回復するかどうか検討したところ、ほぼ野生型レベルにまで回復することも示された。</p>					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>そこで クローン化した血小板型 12-リポキシゲナーゼ過剰発現ヒト肝星細胞株において、酵素を導入していない Mock 細胞と比較して発現が上昇、あるいは低下している遺伝子の中で、特に線維化の促進あるいは抑制に関わるものを、DNA マイクロアレイを用いて網羅的にピックアップした。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、コントロールである野生型マウスに MCD 食を給餌して作成したモデルマウスと比較して、線維化のレベルが有意に上昇していることが示されたが、同様の結果が、ノックアウトマウスと野生型マウスのそれぞれから、ヒトの NASH の病態モデルにより近いとされる STAM マウスを作成した場合にも得られた。このことから血小板型 12S-LOX は肝線維化を抑制する方向に働くことが、<i>in vivo</i>と <i>in vitro</i>の両方で示されたことになり、そのメカニズムの解明に向けさらに研究を進めて行く予定である。</p>
<p>成果資料目録</p>	<p>1. Izumi Tsukayama, Yuki Kawakami, Asako Tamenobu, Keisuke Toda, Saya Maruoka, Yuki Nagasaki, Yoshiko Mori, Risa Sawazumi, Kensuke Okamoto, Keita Kanzaki, Hideyuki Ito, Yoshitaka Takahashi, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, Makoto Murakami, and Toshiko Suzuki-Yamamoto. Malabaricone C derived from nutmeg inhibits arachidonate 5-lipoxygenase activity and ameliorates psoriasis-like skin inflammation in mice. <i>Free Radic Biol Med.</i>193(Pt 1):1-8 (2022)</p> <p>2. Yuki Nagasaki; Erika Kawai; Saya Maruoka; Miho Osumi; Izumi Tsukayama; Yuki Kawakami; Yoshitaka Takahashi; Yuka Okazaki; Yoshimi Miki; Yoshitaka Taketomi; Kei Yamamoto; Makoto Murakami, and Toshiko Suzuki-Yamamoto. Lipid profiling reveals the presence of unique lipid mediators in human milk from healthy and mastitic subjects. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 630 :84-91 (2022) 他 1 件</p>