

2020年度 独創的研究助成費 実績報告書

2021年2月19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	非アルコール性脂肪性肝炎における線維化の進行のメカニズムの解明			
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 川上 祐生 戸田 圭祐	栄養学科・准教授 栄養学科・助教	食品生化学 脂質生化学	動物実験 遺伝子実験
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。</p> <p>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モデルマウスで血小板型12-リポキシゲナーゼが上昇すること、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。さらに、ヒト肝星細胞株に血小板型12-リポキシゲナーゼを安定形質発現させることに成功し、昨年度の独創的研究費でこの細胞とコントロール細胞のDNAマイクロアレイ解析を行うことにより、血小板型12-リポキシゲナーゼにより肝星細胞で発現レベルが変化する遺伝子を同定することに成功した。</p>			

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>本計画では血小板型12-リポキシゲナーゼによりこの遺伝子が肝星細胞で発現レベルが変化するメカニズムとその病態形成における意義を明らかにすることにより、NASH 進行による肝線維化を予防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、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発現レベルが変化する遺伝子が同定された。</p> <p>これらの結果に基づき、本年度は siRNA により導入した血小板型 12-リポキシゲナーゼをノックダウンすることにより、上記の遺伝子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した。また、上記遺伝子の発現レベルが血小板型 12-リポキシゲナーゼのどの生成物により引き起こされるかを彰隆にするために、各種不飽和脂肪酸を添加してその効果を調べたところ、基質とはならない不飽和脂肪酸では添加前後で発現レベルに有意な変化は認められなかったが、基質となる不飽和脂肪酸ではいずれも発現レベルが変化したことから、特定の生成物によるのではなく、peroxide のトーンの上昇がもたらしている可能性が示唆された。</p>
<p>成果資料目録</p>	<p>1. Tetsuo Mitsui, Satoshi Makino, Gen Tamiya, Hiroko Sato, Yuki Kawakami, <u>Yoshitaka Takahashi</u>, Toru Meguro, Hiroko Izumino, Yosuke Sudo, Ikuo Norota, Kuniaki Ishii, Kiyoshi Hayasaka. ALOX12 mutation in a family with dominantly inherited bleeding diathesis. <i>Journal of Human Genetics</i>, in press (2021)</p> <p>2. Mori Y, Kawakami Y, Kanzaki K, Otsuki A, Kimura Y, Kanji H, Tanaka R, Tsukayama I, Hojo N, Suzuki-Yamamoto T, Kawakami T, <u>Takahashi Y</u>. Arachidonate 12S-lipoxygenase of platelet-type in hepatic stellate cells of methionine and choline-deficient diet-fed mice. <i>J Biochem</i>. 168 (5) :455-463. (2020)</p> <p>ほか 2 件</p>