

2023年度 独創的研究助成費 実績報告書

2024年2月13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	遺伝子改変動物ならびに細胞を用いた肝血小板型12-リポキシゲナーゼの役割解明					
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	栄養学科・助教	脂質生化学	動物実験	
研究実績の概要	<p>12-リポキシゲナーゼは不飽和脂肪酸に酸素分子を部位特異的かつ立体特異的に添加して過酸化脂質を生成する酵素で、いくつかのアイソザイムが知られている。一般に過酸化脂質は炎症や癌などの病態増悪にはたらくことが知られているが、近年になって特にω3系不飽和脂肪酸から生成する過酸化脂質を中間代謝産物として、Specialized Pro-resolving Mediators (SPM) と呼ばれる一群の炎症緩解物質が作られることが明らかになり、注目されている。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、単純性脂肪肝に酸化ストレスなどが加わって発症すると考えられている慢性炎症性肝疾患であるが、その予後に大きく関わる線維化のメカニズムについては十分に解明されていない。申請者らは、正常マウス肝ではほとんど検出されない血小板型 12-リポキシゲナーゼの発現レベルがNASHモデルマウス肝で40倍以上上昇すること、本酵素は肝星細胞に局在し、肝星細胞から筋線維芽細胞に分化する過程で発現レベルが上昇することを明らかにした (Mori Y et al. <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> 2020)。肝星細胞は筋線維芽細胞に分化することで、肝線維化において中心的な役割を果たす細胞である。本計画では炎症緩解物質であるSPMの産生にも関わることが知られている血小板型 12-リポキシゲナーゼが肝線維化にどのように関わるか、遺伝子改変動物である本酵素のノックアウトマウス、ならびに遺伝子改変動物細胞として作製した本酵素を過剰発現するヒト肝星細胞株を用いてそのメカニズムとともに解明することを目的として実験を進めた。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、本酵素を安定的に過剰発現するヒト肝星細胞株を作成し、I型コラーゲンをコードする <i>COL1A1</i>、<i>COL1A2</i> 遺伝子の発現レベルを調べたところ、意外なことに、コントロールのMock細胞と比較していずれも低下していた。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を用いて作成したNASHモデルマウスでは、野生型マウスを用いて作成したNASHモデルマウスと比較して、線維化のレベルはより進行していることも示された。以上の結果は、肝星細胞が筋線維芽細胞に分化する過程で発現が上昇する血小板型 12-リポキシゲナーゼは、肝線維化を抑制する方向に働くことを強く示唆している。そこで、NASH進行における肝星細胞の活性化の過程で上昇する血小板型12-リポキシゲナーゼ活性がどのような仕組みで肝線維化の抑制にどのように関わるか、そのメカニズムを解明することを目的とした。ω3系の脂肪酸中で、血小板型12-リポキシゲナーゼ生成物が基質とするのはほぼドコサヘキサエン酸(DHA)のみであったため、DHAを血小板型12-リポキシゲナーゼ過剰発</p>					

※ 次ページに続く

<p>研究実績 の概要</p>	<p>現 TWNT-1 ヒト肝星細胞株と反応させて、その培養上清を、野生型 TWNT-1 肝星細胞に作用させ、COL1A1 と COL1A2 遺伝子の発現レベルを調べたが、変化が認められなかった。そこで、SPMの中でDHA由来のMaresin 1を購入し、野生型 TWNT-1 肝星細胞に添加し、COL1A1とCOL1A2 遺伝子の発現レベルを調べたが、やはり効果が認められなかった。リポキシゲナーゼ生成物の中には不安定なものも多く、培養後の培養上清中では 24 時間で分解されてしまった可能性も考えられる。そこで、野生型 TWNT-1 細胞を培養している 6well プレートの上、物質が通過する膜上に培養した血小板型 12S-LOX 過剰発現細胞を吊り下げ、膜上の細胞に血小板型 12S-LOX の基質であるアラキドン酸あるいは DHA を添加するトランスウェルを用いた実験を試みた。膜上の細胞で生成された生成物はすぐ下の 6well プレートにリアルタイムで移動するので、6well プレートで培養されている野生型 TWNT-1 細胞から totalRNA を回収し、リアルタイム PCR を用いて確認したところ、アラキドン酸添加と DHA 添加のいずれにおいてもコラーゲン遺伝子の発現レベルが低下傾向にあることが観察された。</p>
<p>成果資料目録</p>	<p>なし</p>