

非アルコール性脂肪肝炎における肝線維化過程への類洞内皮細胞および
肝星細胞の IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の関与の解明

2023 年
尾崎 健芳

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。

- 1) Eri Kawashita, Takeyoshi Ozaki, Keiichi Ishihara, Chihiro Kashiwada, Satoshi Akiba.
Endothelial group IVA phospholipase A₂ promotes hepatic fibrosis with sinusoidal capillarization in the early stage of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Life Sci.* **2022**, 294, 120355. [第 1 章]

- 2) Takeyoshi Ozaki, Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Satoshi Akiba.
Deficiency of group IVA phospholipase A₂ in collagen-producing cells alleviates the aggravated hepatic fibrosis in high-fat diet-fed mice after returning to a normal diet. *Biol. Pharm. Bull.* in press. [第 2 章]

目次

序章1
第1章 NASH 肝線維化進展における類洞内皮細胞の IVA-PLA ₂ の関与	
1-1. 緒言4
1-2. 実験方法5
1-2-1. IVA-PLA ₂ -CKO マウスの作製・作出	
1-2-2. 高脂肪食誘発性 NASH マウスモデルの作製	
1-2-3. 血清中 AST および ALT 値の測定	
1-2-4. 肝トリグリセリド量の測定	
1-2-5. シリウスレッド染色	
1-2-6. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色	
1-2-7. 免疫組織染色	
1-2-8. ウェスタンブロット解析	
1-2-9. 総 RNA 抽出および定量 PCR による mRNA 発現量解析	
1-2-10. 走査型電子顕微鏡による観察	
1-2-11. 統計解析	
1-3. 実験結果9
1-3-1. 細胞種選択的 IVA-PLA ₂ -CKO マウスの作出と Cre 酵素による IVA-PLA ₂ 欠損の確認	
1-3-2. CDAHFD 誘発性 NASH モデルにおける細胞種選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による肝障害および脂肪肝に及ぼす影響	
1-3-3. 全身および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による CDAHFD 誘発性肝線維化の軽減	
1-3-4. 全身および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による CDAHFD 誘発性肝星細胞の活性化の軽減	
1-3-5. 内皮細胞/類洞内皮細胞 IVA-PLA ₂ 選択的欠損による CDAHFD 誘発性の類洞内皮毛細血管化の抑制	
1-4. 考察20
第2章 食餌療法開始後にみられる肝線維化進展への肝星細胞の IVA-PLA ₂ の関与	
2-1. 緒言22
2-2. 実験方法23
2-2-1. 実験動物	
2-2-2. 高脂肪食誘発性 NASH マウスモデルの作製および、食餌療法の処置	
2-2-3. 血清中 AST および ALT 値の測定	

2-2-4.	シリウスレッド染色	
2-2-5.	HE 染色	
2-2-6.	免疫組織染色	
2-2-7.	ウェスタンブロット解析	
2-2-8.	ヒト肝星細胞不死化細胞株の TWNT-1 細胞の培養	
2-2-9.	総 RNA 抽出および定量 PCR による mRNA 発現量解析	
2-2-10.	統計解析	
2-3.	実験結果25
2-3-1.	NASH 初期または進展モデルにおいて食餌療法開始後にみられる肝線維化の悪化	
2-3-2.	NASH 初期モデルにおける食餌療法後の肝線維化悪化の肝星細胞選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による軽減	
2-3-3.	NASH 進展モデルにおける食餌療法後の肝線維化悪化の肝星細胞選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による軽減	
2-3-4.	肝星細胞選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による白血球浸潤の抑制	
2-3-5.	肝臓における MCP-1 mRNA 発現の肝星細胞選択的 IVA-PLA ₂ 欠損による抑制	
2-3-6.	肝星細胞における MCP-1 mRNA 発現の IVA-PLA ₂ 阻害剤による抑制	
2-4.	考察32
	総括34
	謝辞36
	引用文献37

略語一覧表

ALT: alanine aminotransferase
ANOVA: analysis of variance
AST: aspartate aminotransferase
CD34: cluster of differentiation34
CDAHFD: choline-deficient L-amino-acid-defined high-fat diet
CKO: conditional knockout
Colla2: collagen 1a2
EC: endothelial cell
ES: embryonic stem cell
GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HE: hematoxylin and eosin
HRP: horseradish peroxidase
IVA-PLA₂: group IVA phospholipase A₂
LPS: lipopolysaccharide
LSEC: liver sinusoidal endothelial cell
MCP-1: monocyte chemotactic protein-1
NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease
NASH: non-alcoholic steatohepatitis
ND: normal diet
PBS: phosphate-buffered saline
PFA: paraformaldehyde
PG: prostaglandin
PLA₂: phospholipase A₂
QD: quantum dot
Rplp0: ribosomal protein lateral stalk subunit p0
SDS: sodium dodecyl sulfate
SE: standard error
TBS: tris-buffered saline
TG: triglyceride
TGF- β 1: transforming growth factor- β 1
TNF- α : tumor necrosis factor- α
VLDL: very-low-density lipoprotein
 α -SMA: smooth muscle α -actin

序章

非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD）は、過度な飲酒やウイルス感染に起因しない脂肪肝疾患の総称であり、単純性脂肪肝と進行性の非アルコール性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis: NASH）に分類される。NASHは、肝での脂肪蓄積にはじまり、炎症反応および肝実質細胞風船化、線維症を伴う進行性の慢性肝炎である（1）。線維症の病態は、生活習慣の改善により軽減する例があることから、線維化の程度によっては可逆的な場合もあるが、多くの患者の線維症は改善しないことから不可逆的であり、その治療は困難である（2）。疫学的調査によると全世界のNAFLDの有病率は約25%と報告されており、本邦における有病率は男性が32-41%、女性が8.7-18%であり、男性の有病率が高い（3-5）。全世界のNAFLDの有病率は、本邦を含め年々増加傾向にあり、推定有病率は2000-2005年で20%、2006-2010年で24%、2011-2015年で27%と経年的に増加している（3）。NASHの診断では、Matteoni分類およびBrunt分類が基準とされる。Matteoni分類ではNAFLDを4つタイプ（Type 1-4）に分類しており、脂肪沈着（Type 1）や炎症を伴う脂肪肝（Type 2）の所見に加えて肝実質細胞の風船様変性がみられるType 3と、さらに、これらの所見に加えて肝線維化あるいはマロニー小体がみられるType 4の2つのタイプがNASHに該当する（6）。Brunt分類ではNASHの線維化の程度を分類し、小葉中心部の線維化がStage 1、小葉中心部と門脈域の線維化がStage 2、中心静脈と門脈を繋ぐように線維化が現われる架橋形成がStage 3、肝硬変がStage 4と定義される（7）。これらのNASHの確定診断には侵襲的検査である肝生検が必要であり、NAFLDの患者全員に肝生検を実施することは非現実的であることから、正確なNASH有病率の把握は不明であるが、約3~5%と推定されている（8, 9）。なお、超音波により肝弾性を測定するフィブロスキャン検査が肝線維化に対する低侵襲的診断として有用であるが、進行した線維化しか検出できない欠点がある（10）。

NASH患者は自覚症状に乏しいため、NASHの早期発見は困難であり、線維化の進展に伴い予後不良の肝硬変や肝がんの発症リスクが上昇することや、線維化の重症度が上がるごとに肝疾患に関連した死亡率が指数関数的に増加することから、NASHでの線維症に対する治療が重要となる（11）。NASHの病態進展メカニズムとして、以前は、肝実質細胞に脂肪が蓄積して脂肪肝を形成するファーストヒットに始まり、引き続き、炎症反応や、肝障害、コラーゲン線維の沈着に伴い肝線維化をきたすセカンドヒットによりNASHへと進展すると説明される2ヒット仮説が提唱されていた。近年では、NASH進展は必ずしもすべての症例が脂肪肝を経由して進行せず、多くの要因が同時に影響してNASHを発症するというマルチヒット仮説が受け入れられている（図1）。この説では、遺伝的な先天的要因に加え、生活習慣などの後天的な要因による脂質代謝異常やインスリン抵抗性による肝臓での遊離脂肪酸の蓄積や、酸化ストレスによるミトコンドリア機能障害、肝細胞死、炎症性サイトカインおよびケモカインの産生に伴う単球浸潤をはじめとした炎症反応、さらには線維症といった、これら複数の要因が複雑に影響し、NASHの病態は進展すると考えられている（1, 12, 13）。現在、NASHの第一選択療法としては、運動や食事療法による生活習慣の改善が推奨されている。しかしながら、本療法には長期間を要するため、患者のコンプライアンスの不良が大きな障害となっている。さらには、個々の患者のコンプライアンスは明らかではないが、本療法を

1年間継続しても、80%以上の患者では線維症改善されないのが現状である (2)。一方、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ 作動薬であるピオグリタゾンや抗酸化薬であるビタミン E の投与が試みられたが、線維症に対する治療効果はみられていない (14)。それゆえ、NASH での線維症に対する新規薬物療法の確立が求められており、そのなかで、当分野では、リン脂質水解酵素であるホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) の種々のアイソザイムのうち、IVA 型に分類される PLA₂ (IVA-PLA₂) が NASH における線維症の治療標的分子となる可能性について検証している。

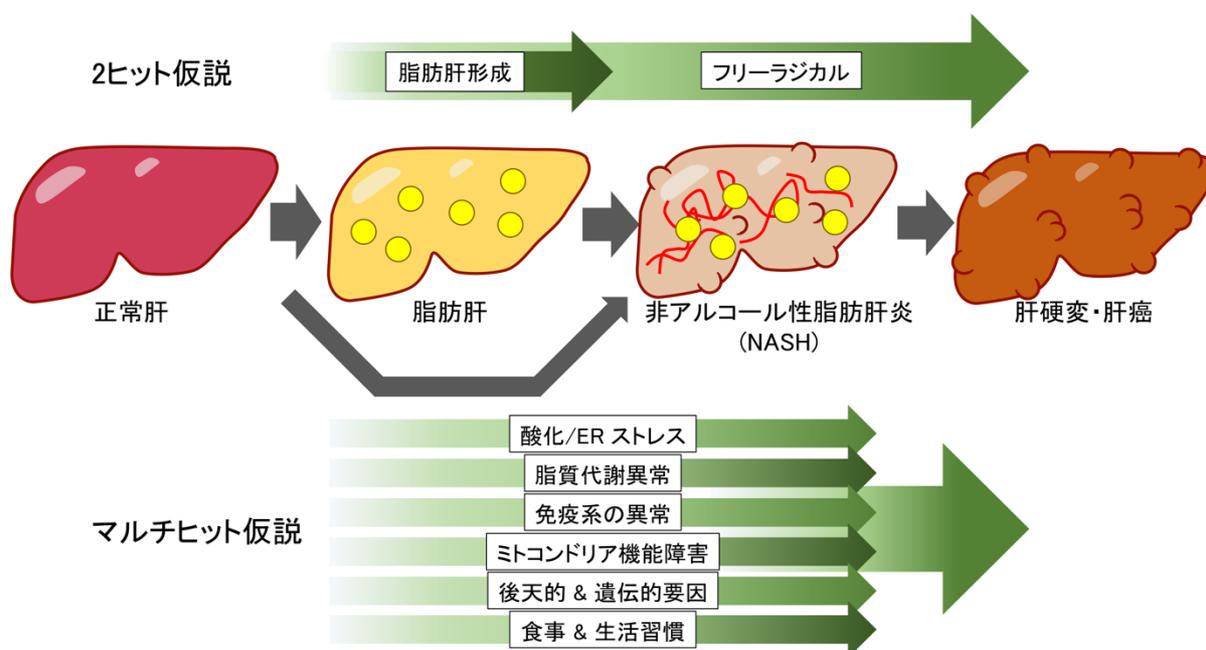


図 1. NASH 進展過程機構の仮説 (2 ヒット仮説とマルチヒット仮説)。

Xu et al., *Front Mol Biosci.* 2021. 8. 792667. (15) の Figure 1 を参考に作成した。

PLA₂は、グリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を水解し、遊離脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素であり、多数のアイソザイムが存在するが、それらは 16 のグループ (group I ~XVI) に分けられ、グループの中には A~F 型など、さらに細分されているグループもある (16, 17)。哺乳類に存在する 30 種類以上の PLA₂ のアイソザイムのうち、IVA-PLA₂ は group IV の A 型であり、cytosolic PLA₂ α とも呼ばれ、特にアラキドン酸を含有するグリセロリン脂質に選択的に作用する PLA₂ である (16)。IVA-PLA₂ による生成物として、リゾリン脂質の 1 つであるリゾホスファチジルコリンはリゾホスファチジン酸 (LPA) に代謝され、アラキドン酸はプロスタグランジン (PG) やロイコトリエンなどに代謝されるが、これら代謝産物は起炎性の脂質メディエーターとして機能することから、IVA-PLA₂ は PLA₂ の中で最も炎症反応に寄与すると考えられる。NASH の進展過程における PGE₂ の役割については、まだ議論の余地があるが (18)、PGE₂ および EP₂/EP₄ アゴニストが肝臓でのトリグリセリドの蓄積を促進することが明らかにされている (19)。一方、リゾホスファチジルコリンは肝実質細胞に毒性および細胞死を誘発し (20, 21)、LPA はコラーゲン線維の産生細胞であるラット肝星細胞の増殖を促進する (22)。このように IVA-PLA₂ による生成物が NASH の病態の進展に関与するこ

とから、当分野では、線維症の治療標的分子として起炎分子産生の初発反応を担う IVA-PLA₂ に着目しており、全身性 IVA-PLA₂ 欠損マウスにおいて、高脂肪食誘発性のコラーゲン線維の蓄積量が対照マウスに比し減少すること (23)、さらに、IVA-PLA₂ の阻害剤の経口投与により四塩化炭素誘発性の肝線維化が軽減することが明らかにした (24)。それゆえ、IVA-PLA₂ の阻害は NASH での肝線維化の進展阻止に繋がる可能性が考えられる。しかしながら、IVA-PLA₂ は全身の細胞に普遍的に発現しており、本酵素を介した炎症の制御や恒常性の維持を担う細胞も存在することから、全身のあらゆる細胞の IVA-PLA₂ 活性を阻害することは、IVA-PLA₂ を介した炎症の制御や恒常性の維持のバランスが崩れることが予想され、NASH での線維症に対する治療効果の低下や副作用の発現リスクの上昇に繋がる可能性が危惧される。

NASH の病態においては、肝組織を構成する肝実質細胞での脂肪蓄積および脂肪毒性、血管 (類洞) を構成する類洞内皮細胞の形態変化や機能不全、単球の浸潤・マクロファージからの種々のメディエーターの分泌、さらには、活性化肝星細胞からのコラーゲン線維の分泌といった様々な細胞応答や機能変化が肝線維化過程に寄与している (25-29)。これらのすべての肝構成細胞が IVA-PLA₂ を発現しているが、どの細胞の IVA-PLA₂ が LPA や PG を含む脂質メディエーターを介して、肝星細胞を活性化させ、肝線維化を引き起こしているかは明らかになっていない。それゆえ、IVA-PLA₂ を介した肝線維化の責任細胞種を明確にすることは、IVA-PLA₂ の阻害するうえでの標的細胞を特定することになり、線維症に対して治療効果が高く、かつ、副作用が少ない薬物療法の考案に繋がる。そこで本研究では、NASH での肝線維化における各種肝構成細胞の IVA-PLA₂ の関与を検証することを目的とした。

第 1 章では、Cre-loxP システムでの条件依存的な遺伝子組換え実験系により、全身、内皮細胞/類洞内皮細胞、単球・マクロファージ、肝実質細胞および肝星細胞のそれぞれにおいて選択的に IVA-PLA₂ を欠損させた 5 種類の IVA-PLA₂ コンディショナル欠損 (IVA-PLA₂-CKO) マウスを作出した。これらの細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスに対し、短期間で脂肪肝および肝線維化を誘発することができるコリン欠乏メチオニン減量高脂肪食飼料 (choline-deficient, L-amino-acid-defined, high-fat diet with 0.1% methionine: CDAHFD) を 3 週間摂食させることで、CDAHFD 誘発性 NASH モデルを作製し、肝障害、肝線維化および脂肪肝形成を組織学的および生化学的に解析した。その結果から、NASH での肝線維化における各種肝構成細胞の IVA-PLA₂ の関与を検証した。

第 2 章では、炎症を伴う肝線維の形成に重要な役割を果たす活性化肝星細胞に着目した。肝星細胞の活性化は、形質転換増殖因子-β (TGF-β) や腫瘍壊死因子-α (TNF-α) などの炎症性メディエーターによって誘起されるが、TGF-β1 によるラット由来肝星細胞の活性化が、IVA-PLA₂ の阻害剤によって抑制されることから、肝星細胞の活性化への IVA-PLA₂ の関与が示唆されている (30)。このことと、NASH の治療には生活習慣の改善策の 1 つとして食餌療法が推奨されていることを踏まえ、この食餌療法を想定した実験系において肝星細胞の IVA-PLA₂ の治療標的としての可能性を検証した。

第1章 NASH 肝線維化進展における類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ の関与

1-1. 緒言

NASH は、高脂肪食などの高カロリー食の過食に起因した脂肪肝形成、炎症および線維化を伴う進展性の肝疾患である。肝線維化は可逆的な場合もあるが、運動や食餌療法といった原因治療を行っても改善する患者は少なく、治療が困難な病態である (2)。NASH での肝線維化は深刻な肝硬変や肝がんの要因となるため、効果的な治療が求められているが、有効な薬物療法は未だに確立されていない。所属分野では、起炎分子産生の初発反応を担う IVA-PLA₂ が NASH の進展因子であることを明らかにした (23) が、本酵素を介した NASH 進展の責任細胞種は特定できていない。そこで本章では、内皮細胞/類洞内皮細胞、単球・マクロファージ、肝実質細胞および肝星細胞において選択的に IVA-PLA₂ を欠損させた IVA-PLA₂-CKO マウスを用い、IVA-PLA₂ を介した肝線維化の責任細胞種の特定を試みた。

一方、マウスでの NASH モデルの作製に関しては、腹腔内投与での四塩化炭素やトランス型不飽和脂肪酸含有の高脂肪食飼料が用いられる場合がある。しかしながら、四塩化炭素誘発性 NASH モデルでは、肝実質細胞で CYP2E1 により代謝された四塩化炭素由来のラジカルにより肝障害や肝線維化が引き起こされるが、脂肪の蓄積は起こらないため、ヒトでの高カロリー摂取による NASH の病態とは異なる病態モデルである。一方、トランス型不飽和脂肪酸含有の高脂肪食飼料誘発性のモデルでは、NASH 病態形成に 16 週間以上の比較的長い摂取期間を要することや、欧米におけるヒトの現在の食生活ではトランス型不飽和脂肪酸の摂取が規制されていることを踏まえると、NASH モデルを作製する飼料としては不適切であると考えられる。そこで、比較的短期間の摂取で NASH モデルを作製可能な飼料として、コリン/メチオニン欠乏食飼料に着目した。本飼料は、肝臓から末梢へとトリグリセリドの運搬を担う超低比重リポタンパク質 (very-low-density lipoprotein: VLDL) の肝実質細胞での生成過程を抑制することで肝実質細胞にトリグリセリドを蓄積させ、結果的に脂肪肝の形成を介して NASH を発症させる。本飼料での VLDL の生成抑制は、その主な構成リン脂質であるホスファチジルコリンの合成に必要となるコリンやメチオニンを欠乏させることで VLDL の生成を低下させることによる。しかしながら、コリン/メチオニン欠乏食飼料による NASH モデルでは、著しい体重減少が生じることから、持続的な観察が困難となると予想される。そこで、この点を改良した飼料として、コリン/メチオニン欠乏食飼料にメチオニンを補充した飼料である CDAHFD を本研究での NASH モデルの作製に用いた。

本章では、肝線維化の形成過程に肝構成細胞の IVA-PLA₂ の関与を検証するにあたり、まずは、肝線維化の初期段階への関与を解明するために、各細胞種選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスに CDAHFD を 3 週間投与した NASH モデルでの肝線維化の程度などについて、対照マウスと比較検討した。

1-2. 実験方法

1-2-1. IVA-PLA₂-CKO マウスの作製・作出

既存の IVA-PLA₂ 欠損マウスの作製方法と同様に (31)、*Pla2g4* 遺伝子の活性中心をコードする exon 8 を標的配列とし、この配列を loxP 配列で挟んだ IVA-PLA₂^{lox/lox} マウスを作製した。ターゲティングベクターを作製するために、適切な制限酵素認識配列を付加した exon 8-loxP 断片 (XmaI-NotI)、short arm となる exon 8 上流の 2.5-kb 断片 (NotI-XhoI)、long arm となる exon 8 下流の 5.0-kb 断片 (NotI-SacII) を、BAC クローン (ID : RP23-47517 or RP23-55024) を鋳型として PCR により増幅し、各制限酵素で切断した断片をそれぞれ pBSIISK (+)、pBS-FRT-neo-FRT-loxP および pBS-DTA に挿入した (Figure. 1-1A)。構築した 3 つのプラスミドを制限酵素 (Sal I、Not I、Xma I) で消化した後、切断断片をライゲーションにより結合し、ターゲティングベクターを作製した。制限酵素 Sal I で切断して得た、直鎖状のターゲティングベクターを C57BL/6J 由来の胚性幹細胞 (ES 細胞) に電気穿孔法により導入した。ネオマイシン耐性 ES 細胞を注入した BALB/c 由来の胚盤胞期胚を野生型の代理母マウスの子宮に移植し、ターゲットアリルを持つキメラマウスを作製した。このキメラマウスを野生型マウスと交配して得た F1 子孫の生殖系列移行の確認は、2 つのプライマーセットを用いた PCR 遺伝子型判定により行った (Figure 1-1A, B)。用いたプライマーの配列は、5'-ATATGAGTGCCATGTTCTAAGCAAT-3' (P1)、5'-TTAATCACAGAATCTGTTCAAAGG-3' (P2)、5'-GAGCTCAGAATAAAATGACTGAAGAC-3' (P3) および 5'-CTTCCTCGCTTTACGTATC-3' (P4) である。F1 ヘテロ接合体マウスと CAG-FLP マウスを交配することにより、標的アリル中のネオマイシン耐性遺伝子を除去した。PCR により、F2 子孫におけるネオマイシン耐性遺伝子の除去を判定した (Figure. 1-1A, C)。用いたプライマー配列は、5'-GAACAAGATGGA TTGCACGCAGGTTCTCCG-3' (P5)、5'-GTAGCCAACGCTATGTCCTGATAG-3' (P6)、5'-GGCATTAGTTGTACCTTAGCTTGAG-3' (P7) および 5'-CTCCAAACATCCATAAAGACCTA-3' (P8) である。その後、C57BL/6J マウス (CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan) と交配することでもう一方のアリルの FRT 配列を除去し、5'-TAGTTTGCAATTACAGTTTCGAATCA-3' (sense) および 5'-AGCCTTGTTGTACGATCTGACTAAG-3' (antisense) をプライマーとして用いた PCR により FRT 除去を確認した。

細胞種選択的に IVA-PLA₂ を欠損したマウスを作出するために、本研究で新規に作製した IVA-PLA₂^{fox/fox} マウスを、全身性、肝実質細胞、単球/マクロファージ、内皮細胞/類洞内皮細胞、および肝星細胞において選択的に Cre を発現するマウス (それぞれ CAG-cre^{KI/+} マウス (B6.Cg-Tg(CAG-cre)CZ-MO2Osb, RBRC01828, RIKEN BRC)、Alb-cre^{KI/+} マウス (B6N.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J, stock number 018961, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)、LysM-cre^{KI/+} マウス (B6.129P2-Lyzs<tm1(cre)Ifo>, RBRC02302, RIKEN BRC, Tsukuba, Japan)、Tie2-cre^{KI/+} マウス (B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa, RBRC04495, RIKEN BRC) および Colla1-cre^{KI/+} マウス (B6.Cg-Tg(Coll1a1-cre)1Haak, RBRC05524, RIKEN BRC) と交配した。すべてのマウスは 25°C の恒温において 1 ケージあたりの収容数を 5 匹までとして飼育し、水や餌は自由に摂取させた。照明は 12 時間サイクルとした (8:00~20:00 : 照明あり、20:00~8:00 : 照明なし)。すべての動物実験は、京都薬科大学の動物実験委員会の承認の下 (承認番号: 17-077, A22-019)、京都薬科大学動物実験実施規程に従って実施した。

1-2-2. 高脂肪食誘発性 NASH マウスモデルの作製

雄性 6 週齢の各細胞種選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスおよびその同腹対照マウスを別々に飼育し、CDAHFD (A06071302; Research Diets, Inc., NJ, USA) または標準飼料 (ND) として MF (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を 3 週間摂取させた。マウスは絶食させず解剖し、下大静脈から血液を採取後、心臓から生理食塩水を灌流し、肝組織を採取した。採取した血液は、室温で 1 時間放置後、10,000 ×g、室温で 10 分間遠心分離し、その上清を血清とした。

1-2-3. 血清中 AST および ALT 値の測定

血清中のアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) およびアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) 値の測定には、トランスアミナーゼ C-II テストワコーキット (Cat. No. 431-30901, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いた。

1-2-4. 肝トリグリセリド量の測定

肝組織 (50 mg) を cOplete プロテアーゼインヒビターカクテル錠 (Cat. No. 11836153001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む精製水中で破碎した。クロロホルム-メタノール (2 : 1, v/v) および 0.1 M KCl を用いて、肝組織中の脂質を抽出し、2-メチル-2-プロパノールとトリトン X-100/メタノール (1:1, v/v) を混合し、トリグリセライド E テストワコーキット (Cat. No. 432-40201, Wako Pure Chemical Industries) を用いて肝トリグリセリド量を測定した。

1-2-5. シリウスレッド染色

マウスを生理食塩水および 10% 中性緩衝化ホルムアルデヒド液で灌流し、摘出した肝組織を 10% 中性緩衝化ホルムアルデヒド液で 48 時間固定した。固定した肝組織をパラフィンで包埋し、マイクロームを用いて 5 μm の切片に切り出した。切片を MAS コーティング加工されたスライドガラス (Cat. No. MAS-03, MAS コートスライドガラス Matsunami glass Industries) にマウントし、脱パラフィン処理を行った後、ピクリン酸/シリウスレッドで染色した。染色した切片を倒立型顕微鏡 (model IX71; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて、1,360×1,024 ピクセルの解像度で撮影した。赤く染色された面積、ImageJ version. 1.53 (U.S. National Institutes of Health) を用いて定量し、肝切片全体に対する面積の割合を算出した。

1-2-6. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

厚さ 5 μm のパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理した後、ヘマトキシリン (Cat. No. 131-09665, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) および、エオジン (Cat. No. 051-06495, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) により染色し、倒立型顕微鏡 (model IX71) を用いて 1,360×1,024 ピクセルの解像度で撮影した。

1-2-7. 免疫組織染色

厚さ 5 μm のパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理した後、0.3% H_2O_2 含有 PBS で 15 分間、室温でインキュベートし、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。切片を PBS で洗浄した後、Retrievagen A (pH 6.0) (Cat. No. 550524, BD Biosciences, MA, USA) に浸し 90°C で 10 分間、抗原不活化処理を行った。切片を Mouse-on-Mouse ブロッキング試薬 (Cat. No. BMK-2202, Vector Laboratories, CA, USA) で 1 時間処理した後、10% ウマ血清 (Cat. No. S-2000, Vector Laboratories) および 0.3% トリトン X-100 含有 PBS に室温にて 1 時間浸し、ブロッキング反応を行った。さらに、アビジン/ビオチンブロッキング溶液 (Cat. No. SP-2001, Vector Laboratories, CA, USA) で 1 時間室温にてインキュベートした。切片を PBS で洗浄後、抗 α -平滑筋アクチン (α -SMA) 抗体 (Cat. No. A2547, Lot No. 084M4795M, 1:1000; Sigma-Aldrich, MO, USA) で、4°C で一晩インキュベートした。その後切片を PBS で洗浄し、ビオチン標識ウマ抗マウス IgG 抗体 (Cat. No. BA-2000, Lot. No. X0702, 1:200; Vector Laboratories) を 30 分間インキュベートした。抗原抗体複合体の検出には、Vectastain Elite ABC kit (Cat. No. PK-6100, Vector Laboratories) と Metal-Enhanced DAB Substrate kit (Cat. No. 34065, Thermo Scientific, IL, USA) を用いた。免疫染色された切片を、倒立型顕微鏡 (model IX71) を用いて 1,360 \times 1,024 ピクセルの解像度で撮影した。 α -SMA 陽性面積は ImageJ を用いて測定し、肝切片全体に対する面積の割合を算出した。

1-2-8. ウェスタンブロット解析

肝組織 (50 mg) を、cComplete プロテアーゼインヒビターカクテル錠 (Roche Diagnostics) およびホスファターゼインヒビターカクテル錠 (Wako Pure Chemical Industries) を含む RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) 中でホモジネートした。得られた溶液を 10,000 \times g、4°C で 20 分間遠心分離した後、上清を回収した。タンパク質濃度はプロテインアッセイ CBB 溶液 (Cat. No. 29449-15, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて Bradford 法により測定した。同じタンパク質濃度に調製した溶液を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、セミドライ式転写装置を用いてニトロセルロース膜に転写した。3% スキムミルク (Cat. No. 190-12865, Wako Pure Chemical Industries) 含有 TBS-T (0.1% Tween-20 を含む Tris-buffered saline) に転写膜を浸しブロッキングした後、抗 α -SMA 抗体 (1:1000; Sigma-Aldrich) および抗グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH, Cat. No. 016-25523, Lot No. PTJ3996, 1:4000; Wako Pure Chemical Industries) で 4°C 下一晩処理した。TBS-T 洗浄後、各々西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Cat. No. sc-2030, Lot. No. L1015, 1:5000; Santa Cruz Biotechnology) または HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cat. No. sc-516102, 1:2500; Santa Cruz Biotechnology) を 1 時間反応させた。その後、TBS-T で洗浄し、目的のタンパク質を Chemi-Lumi One Super (Cat. No. 02230-30, Nacalai Tesque) と反応させ LAS-3000mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いてバンドを検出した。バンド強度は、ImageJ を用いて定量した。

1-2-9. 総 RNA 抽出および定量 PCR による mRNA 発現量解析

肝組織を RNAiso 溶液 (Cat. No. 9109, Takara Bio, Shiga, Japan) 中でホモジネートし、クロ

ロホルムを用いて総 RNA を抽出した。5 μ g の総 RNA を dNTPs、ランダムプライマー (Cat. C1181, Promega, Madison, WI, USA) および ReverTra Ace (Cat. No. TRT-101, Toyobo, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA、SYBR-Green I (Cat. No. RR420A, Takara Bio) およびプライマーを混合し、LightCycler 96 System (Cat. No. 05815916001, Roche) または Nano System (Cat. No. 06407773001, Roche) を使用して定量 PCR を行った。使用したプライマーは、Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) に作製を依頼した。プライマーの詳細は Table 1-1 に示す。PCR は変性を 95°C で 15 秒、アニーリング/伸長を 63°C で 34 秒、55 サイクル行い、遺伝子発現量は 36B4 をハウスキーピング遺伝子として $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法により算出した。

1-2-10. 走査型電子顕微鏡による観察

マウスを生理食塩水と 4% paraformaldehyde (PFA) 含有 PBS で灌流した後、肝組織をハーブカルノフスキー溶液で 24 時間後固定した。その後、肝組織を PBS に浸し、さらに 30 分ごとに 2 回 PBS を交換して洗浄した。組織標本の作製および走査型電子顕微鏡を用いた撮影は、Applied Medical Research Laboratory (Osaka, Japan) に委託した。無作為に選択した中心静脈周囲の類洞内皮細胞の表面を 10,000 倍で撮影した。単位面積 (μm^2) あたりの小孔の計数には、ImageJ を用いた。

1-2-11. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。独立した 3 群以上の比較では、一次元分散分析 (one-way analysis of variance: ANOVA) および最小有意差検定を行った。独立した 2 群間での比較では Student の *t* 検定を用いた。両側検定での危険率が 5%未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意差あると判定した (Table 1-3 参照)。

Table 1-1. Sequences of primers used for qPCR.

Species	Target genes		Sequence
Mouse	Mcp-1	sense	5'- AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'
		antisense	5'- TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3'
	CD34	sense	5'- TGGTAGCTCTGCCTGAT-3'
		antisense	5'- GCTGTGGTCTTACTGCT-3'
	36B4	sense	5'- TGTGTGTCTGCAGATCGGGT-3'
		antisense	5'- TGGATCAGCCAGGAAGGCCT-3'

1-3. 実験結果

1-3-1. 細胞種選択的 IVA-PLA₂-CKO マウスの作出と Cre 酵素による IVA-PLA₂ 欠損の確認

Cre-loxPシステムを利用して、IVA-PLA₂を介したNASH進展を担う責任細胞種を特定するため、始めにIVA-PLA₂^{flx/flx}マウスを作製した。Exon 8をloxP配列で挟み、FRT配列でネオマイシン耐性遺伝子を挟んだ配列を組み込んだターゲティングベクターを作製し (Figure 1-1A)、ES細胞に導入した後、組換えES細胞を、ネオマイシン耐性遺伝子をマーカーに単離した。キメラマウスと野生型マウスとの交配により得たF1子孫での生殖系列移行、およびF2子孫でのFLP-FRTシステムによるネオマイシン耐性遺伝子の除去をPCRにより確認した (Figure 1-1B, C)。本研究で新規作製したIVA-PLA₂^{flx/flx}マウスをCAG-cre^{KI/+}マウスと交配することで、全身性IVA-PLA₂-CKOマウス (CAG-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx}マウス) を作出し、本IVA-PLA₂-CKOマウスの肝組織におけるIVA-PLA₂の欠損をWestern blottingにより確認した (Figure 1D)。対照マウスの肝組織におけるIVA-PLA₂のタンパク発現量はCDAHFD摂取により顕著に増加したが、CAG-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx}マウスでは、肝組織におけるIVA-PLA₂の発現はみられなかった。

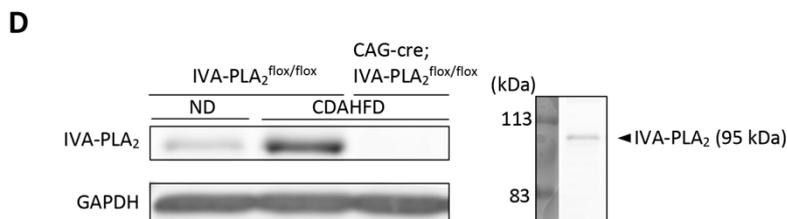
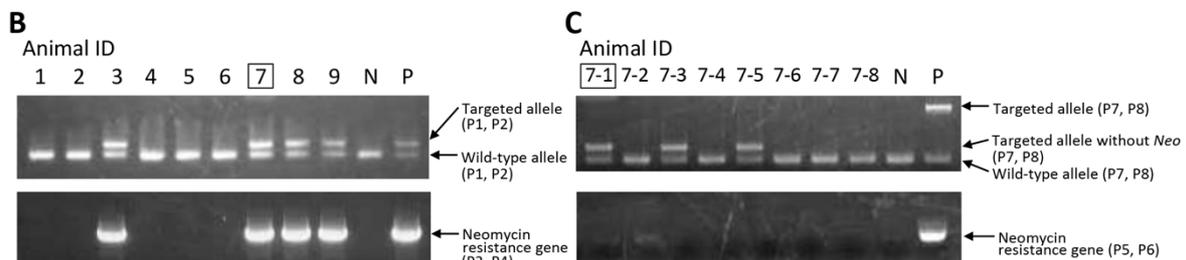
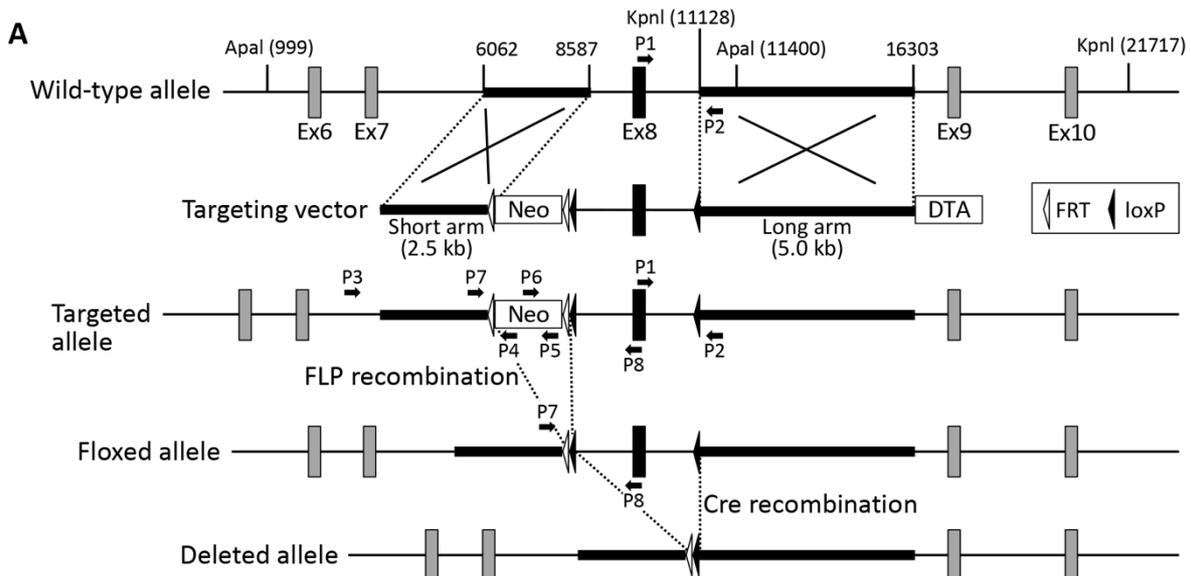


Figure 1-1. Generation of IVA-PLA₂ cKO mice.

(A) A schematic illustration of the wild-type IVA-PLA₂ allele, the targeting vector with 5' and 3' homology arms; the targeted allele is shown. The locations at which loxP sites and FRT sites were inserted on intron regions in the IVA-PLA₂ allele are indicated with the black and white arrow heads, respectively. At the bottom of the image, the mutant allele without Neo after Flp-FRT recombination and the IVA-PLA₂Δ allele with deletion of the exon 8 after Cre-loxP recombination are shown. Neo, neomycin cassette; DTA, diphtheria toxin A gene; P1-P8, primers. (B) Germ-line transmission was confirmed by PCR genotyping of the F1 offspring. (C) Removal of the Neo gene in the targeted allele was removed by the Flp-FRT recombination was confirmed by PCR genotyping of the F2 offspring. (D) The systemic deficiency of IVA-PLA₂ in the liver was confirmed by Western blotting of liver tissues from mice fed an ND or CDAHFD. The blots were probed with an anti-IVA-PLA₂ antibody (top blot) and an anti-GAPDH antibody (bottom blot). Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Figure 1.

1-3-2. CDAHFD 誘発性 NASH モデルにおける細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損による肝障害および脂肪肝に及ぼす影響

NASH 病態に対する細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損の影響を明らかにするため、全身性 IVA-PLA₂ 欠損マウス (CAG-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス)、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウス (Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス)、単球/マクロファージ選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウス (LysM-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス)、肝実質細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウス (Alb-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス)、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウス (Col1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス) およびこれらの対照マウスとしての同腹の IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスまたは IVA-PLA₂^{flx/+} マウスを無作為に 2 群に分け、ND あるいは CDAHFD を 3 週間摂取させた。5 種類の IVA-PLA₂-CKO マウスとその対照マウスの間で、飼料の消費量に顕著な差はなく、IVA-PLA₂ 欠損による飼料の消費量への影響はなかった (Table 1-2)。

Table 1-2. Comparison of food consumption between the IVA-PLA₂ cKO mice and their littermate control mice.

The amount of food consumption was measured every week, and the daily amount in each mouse was shown (g/day/mouse). The data represent the mean ± S.E. Statistical significance was evaluated using Student's *t*-test. **P < 0.01 versus each CDAHFD-fed littermate control.

Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Supplementary Table 1.

ND		CDAHFD	
IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 4)	CAG-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 3)	CAG-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 3)
3.37 ± 0.25	3.80	2.91 ± 0.26	3.76 ± 0.50
IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)	Tie2-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 3)	Tie2-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 3)
3.07	2.99	3.05 ± 0.15	4.22 ± 0.04**
IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)	LysM-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)	LysM-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 2)
3.01	3.15	3.85	3.50
IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 1)	Alb-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 1)	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx, or flx/+} (no. of cages = 4)	Alb-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 4)
3.54	4.21	2.76 ± 0.31	2.46 ± 0.14
IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 1)	Col1a1-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 1)	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx, or flx/+} (no. of cages = 4)	Col1a1-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} (no. of cages = 3)
3.43	3.53	2.66 ± 0.15	3.43 ± 0.46

細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損による CDAHFD 誘発性肝障害への影響を検討するために、血清肝逸脱酵素である血清 AST および ALT を測定した結果、全ての IVA-PLA₂-CKO マウスおよびその対照マウスにおいて、血清 AST および ALT 値は CDAHFD 摂取により著しく増加した。LysM-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスおよび Alb-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスにおいて、血清 AST および ALT 値はそれぞれの対照マウスより高い傾向にあったが、有意な差ではなかった (Table 1-2)。HE 染色の結果、CAG-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスとその対照マウスの間で、肝細胞の風船様変性および白血球浸潤の程度に差はなかったことや (Figure 1-2A)、単球走化性因子 (MCP-1) の mRNA 発現量に有意な差がなかった (Figure 1-2B) ことから、全身性 IVA-PLA₂ 欠損により、CDAHFD 誘発性の肝障害および炎症反応が軽減されないことが示唆された。CDAHFD を摂取させた Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウス、LysM-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウス、Alb-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスおよび Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスにおいて、肝組織重量は対照マウスと同程度であった。一方、Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスでは、肝トリグリセリド量はその対照マウスよりも高値であったが (Table 1-2)、これは飼料摂取量の多さに起因すると考えられる (Table 1-2)。

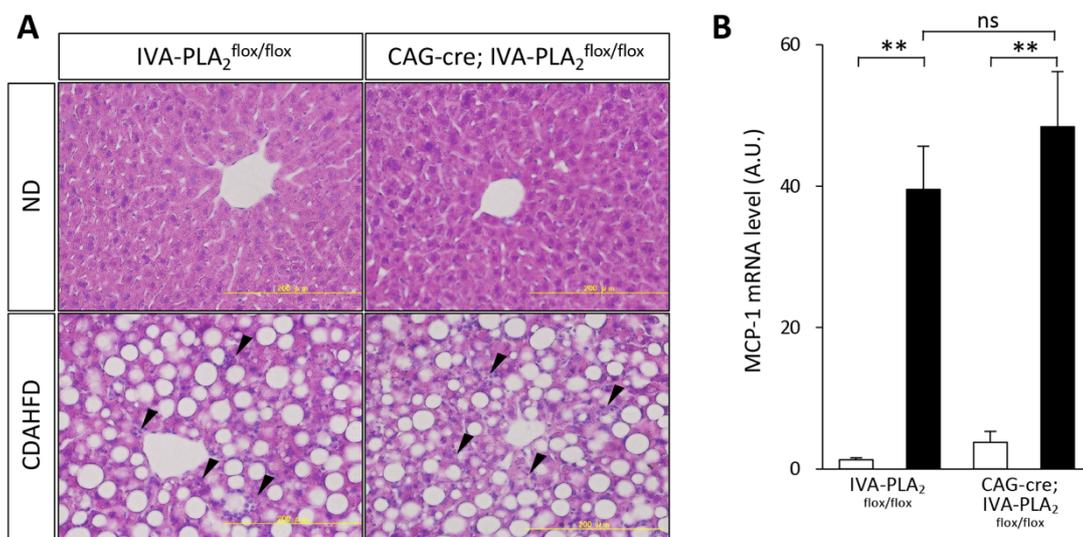


Figure 1-2. The degree of hepatic inflammatory responses in systemic IVA-PLA₂ cKO mice and their control mice on a CDAHFD.

(A) Paraffin-embedded liver sections were stained with HE. The scale bar corresponds to 200 μ m. (B) The mRNA levels of MCP-1 in the liver were determined by real-time PCR. The expression was normalized to that of 36B4 mRNA. ND-fed mice, white bars; CDAHFD-fed mice, black bars. The numbers of the CAG-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice and its control mice on a CDAHFD (on an ND) were n=9 (n=9) and n=7 (n=5), respectively. Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test. **P < 0.01. Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Supplementary Figure 1.

Table 1-2. Effects of cell type-specific IVA-PLA₂ deficiency on the body weight, liver-to-body-weight ratio, epididymal fat-to-body-weight ratio, AST, ALT and the amount of hepatic TG.

The data represent the means ± S.E. Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test or Student's *t*-test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 versus each CDAHFD-fed littermate control.

Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Table 1.

	ND		CDAHFD	
	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	CAG-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	CAG-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}
Body weight (g)	25.71 ± 0.48 (n=9)	27.86 ± 0.77 (n=5)	22.44 ± 0.47 (n=9)	21.18 ± 0.58 (n=7)
Liver weight (% of BW)	4.77 ± 0.12 (n=9)	5.37 ± 0.22 (n=5)	7.07 ± 0.27 (n=8)	6.17 ± 0.13** (n=7)
Epididymal fat pad (% of BW)	0.78 ± 0.05 (n=9)	0.54 ± 0.05 (n=5)	0.61 ± 0.06 (n=9)	0.60 ± 0.05 (n=7)
AST (AU/L)	9.91 ± 0.89 (n=9)	14.46 ± 1.19 (n=5)	82.18 ± 13.19 (n=9)	112.42 ± 27.88 (n=7)
ALT (AU/L)	2.59 ± 0.28 (n=9)	3.05 ± 0.70 (n=5)	54.81 ± 7.01 (n=9)	56.46 ± 8.92 (n=7)
Hepatic TG (mg/g protein)	43.27 ± 5.40 (n=9)	41.46 ± 4.49 (n=5)	553.22 ± 44.37 (n=9)	564.18 ± 52.04 (n=7)

	ND		CDAHFD	
	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	Tie2-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	Tie2-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}
Body weight (g)	25.60 ± 0.91 (n=10)	25.89 ± 0.64 (n=10)	22.62 ± 0.70 (n=12)	22.37 ± 0.62 (n=9)
Liver weight (% of BW)	5.14 ± 0.15 (n=10)	5.01 ± 0.21 (n=10)	7.01 ± 0.22 (n=12)	7.08 ± 0.31 (n=9)
Epididymal fat pad (% of BW)	0.53 ± 0.04 (n=10)	0.53 ± 0.03 (n=10)	0.63 ± 0.07 (n=12)	0.61 ± 0.04 (n=9)
AST (AU/L)	15.67 ± 1.20 (n=10)	23.52 ± 2.13 (n=10)	99.77 ± 13.86 (n=12)	116.92 ± 12.11 (n=7)
ALT (AU/L)	2.89 ± 0.35 (n=10)	3.59 ± 0.51 (n=10)	79.97 ± 8.08 (n=12)	82.63 ± 6.74 (n=7)
Hepatic TG (mg/g protein)	52.98 ± 9.19 (n=10)	70.55 ± 8.41 (n=10)	632.03 ± 39.76 (n=12)	800.14 ± 72.28** (n=9)

	ND		CDAHFD	
	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	LysM-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	LysM-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}
Body weight (g)	25.86 ± 1.48 (n=8)	25.66 ± 0.78 (n=8)	22.24 ± 0.61 (n=9)	21.86 ± 0.51 (n=9)
Liver weight (% of BW)	5.25 ± 0.32 (n=8)	5.25 ± 0.19 (n=8)	6.72 ± 0.21 (n=9)	6.97 ± 0.27 (n=9)
Epididymal fat pad (% of BW)	0.53 ± 0.07 (n=8)	0.61 ± 0.03 (n=5)	0.62 ± 0.04 (n=9)	0.67 ± 0.08 (n=9)
AST (AU/L)	18.31 ± 5.08 (n=7)	14.76 ± 0.93 (n=8)	74.00 ± 4.86 (n=9)	105.46 ± 16.99* (n=9)
ALT (AU/L)	3.36 ± 0.99 (n=7)	3.41 ± 0.47 (n=8)	60.87 ± 5.32 (n=9)	78.73 ± 13.27 (n=9)
Hepatic TG (mg/g protein)	126.84 ± 22.64 (n=8)	69.68 ± 8.71 (n=8)	739.58 ± 82.46 (n=9)	857.02 ± 53.51 (n=9)

	CDAHFD		CDAHFD	
	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} , or flx/+	Alb-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}	IVA-PLA ₂ ^{flx/flx} , or flx/+	Col1a1-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flx/flx}
Body weight (g)	22.91 ± 0.52 (n=9)	22.12 ± 0.67 (n=11)	21.96 ± 0.71 (n=10)	22.52 ± 0.75 (n=8)
Liver weight (% of BW)	6.41 ± 0.26 (n=9)	6.57 ± 0.19 (n=11)	6.16 ± 0.21 (n=10)	6.86 ± 0.24* (n=8)
Epididymal fat pad (% of BW)	0.82 ± 0.09 (n=9)	0.68 ± 0.07 (n=11)	0.80 ± 0.09 (n=10)	0.52 ± 0.04* (n=8)
AST (AU/L)	123.57 ± 16.47 (n=9)	160.93 ± 22.68 (n=11)	112.42 ± 16.07 (n=10)	91.58 ± 9.32 (n=8)
ALT (AU/L)	90.24 ± 3.14 (n=9)	130.72 ± 22.57 (n=11)	72.67 ± 4.65 (n=10)	83.25 ± 6.49 (n=8)
Hepatic TG (mg/g protein)	696.04 ± 55.18 (n=9)	597.38 ± 39.82 (n=11)	607.83 ± 43.97 (n=10)	565.06 ± 55.08 (n=8)

1-3-3. 全身および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による CDAHFD 誘発性肝線維化の軽減

肝臓でのコラーゲン線維の蓄積をシリウスレッド染色によって評価した結果、CDAHFD を摂取させた対照マウスでは、中心静脈周辺に顕著なコラーゲン線維の蓄積が確認されたのに対し、CAG-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスにおいては、肝コラーゲン線維量が対照マウスに比し有意に減少している (Figure 1-3A, F)。一方、Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスでは、コラーゲン線維の蓄積が対照マウスと比較して有意に軽減していたが、LysM-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス、Alb-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスおよび Col1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスにおいては、コラーゲン線維の蓄積量は対照マウスと同程度であった (Figure 1-3B-E, G-J)。

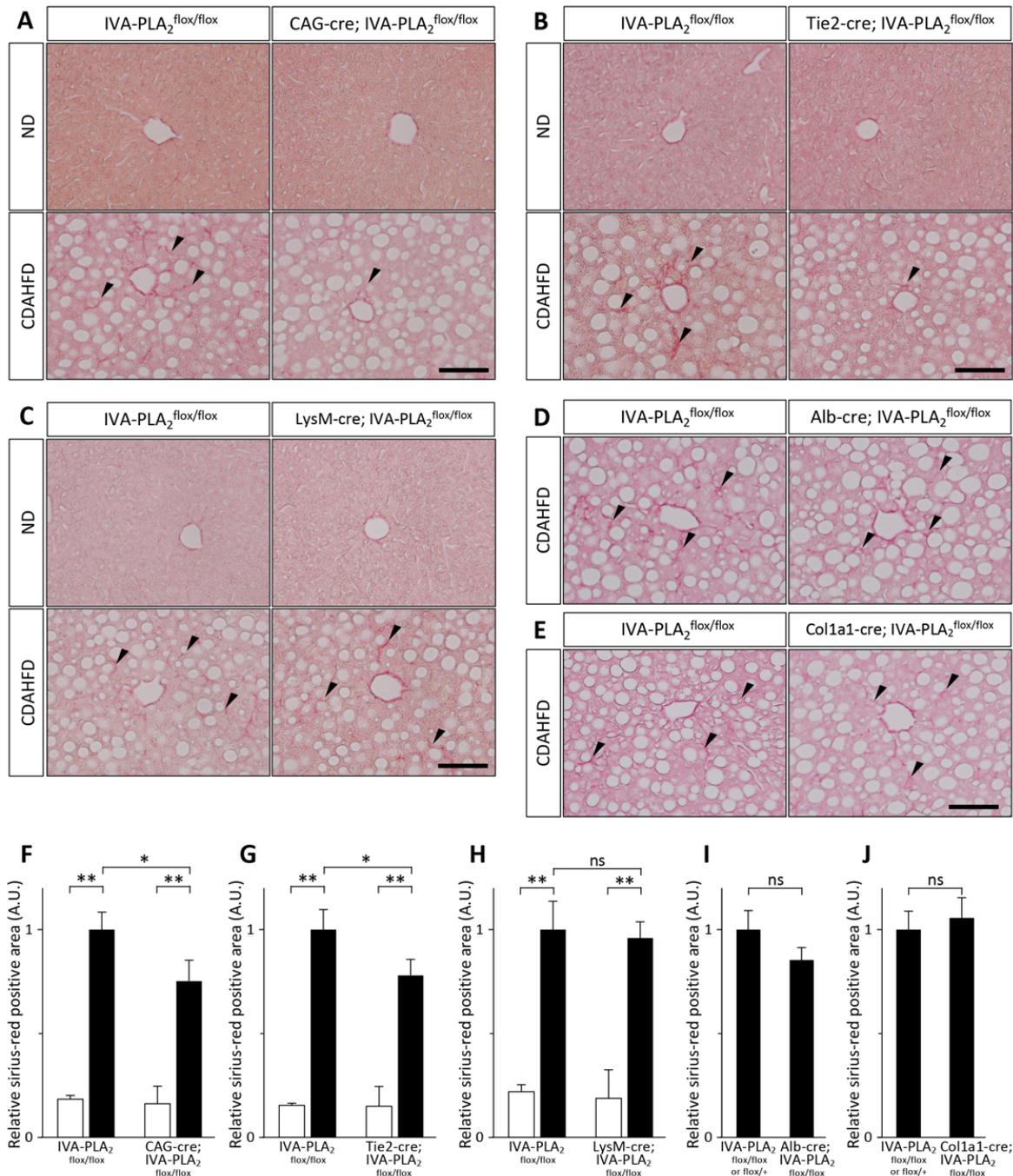


Figure 1-3. Effects of cell type-specific IVA-PLA₂ deficiency on CDAHFD-induced hepatic fibrosis.

Paraffin-embedded liver sections were stained with picosirius red. (A-E) Representative images are shown. The scale bar corresponds to 200 μ m. (F-J) The sirius-red stained areas were measured using the NIH ImageJ software program. The values were divided by the mean of the sirius-red-positive area of the liver sections from CDAHFD-fed control mice. The bar graphs represent the mean \pm S.E. (arbitrary units: A.U.). ND-fed mice, white bars; CDAHFD-fed mice, black bars. The numbers of the cKO mice and its control mice on a CDAHFD (on an ND) were stated as below: the CAG-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=7 (n=5), CAG-control mice: n=9 (n=9), Tie2-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=9 (n=10), Tie2-control mice: n=12 (n=10), LysM-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=9 (n=8), LysM-control mice: n=9 (n=8), Alb-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=11, Alb-control mice: n=9, Col1a1-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=8, and Col1a1-control mice: n=10. Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test, or Student's *t*-test. ns: non-significant, **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Figure 2.

1-3-4. 全身および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による CDAHFD 誘発性肝星細胞の活性化の軽減

NASH の進展過程において、活性化肝星細胞は α -SMA を高発現し、I 型コラーゲンを含む細胞外マトリックスを産生する (27, 32)。そこで、肝星細胞の活性化に対する細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損の影響を明らかにするため、 α -SMA のタンパク質発現量をウェスタンブロッティングにより解析した (Figure 1-4)。対照マウスの肝組織における α -SMA のタンパク質発現量が CDAHFD を摂取により顕著に増加したのに対し、CAG-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスでは、CDAHFD による α -SMA 発現量の増加は有意に低かった (Figure 1-4A, F)。CDAHFD 摂取下の Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスにおける α -SMA 発現量が、対照マウスに比し有意に少なかったが (Figure 1-4B, G)、LysM-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウス、Alb-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスおよび Col1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスにおいては、 α -SMA 発現量はそれぞれの同腹対照マウスと同程度であった (Figure 1-4C-E, H-J)。

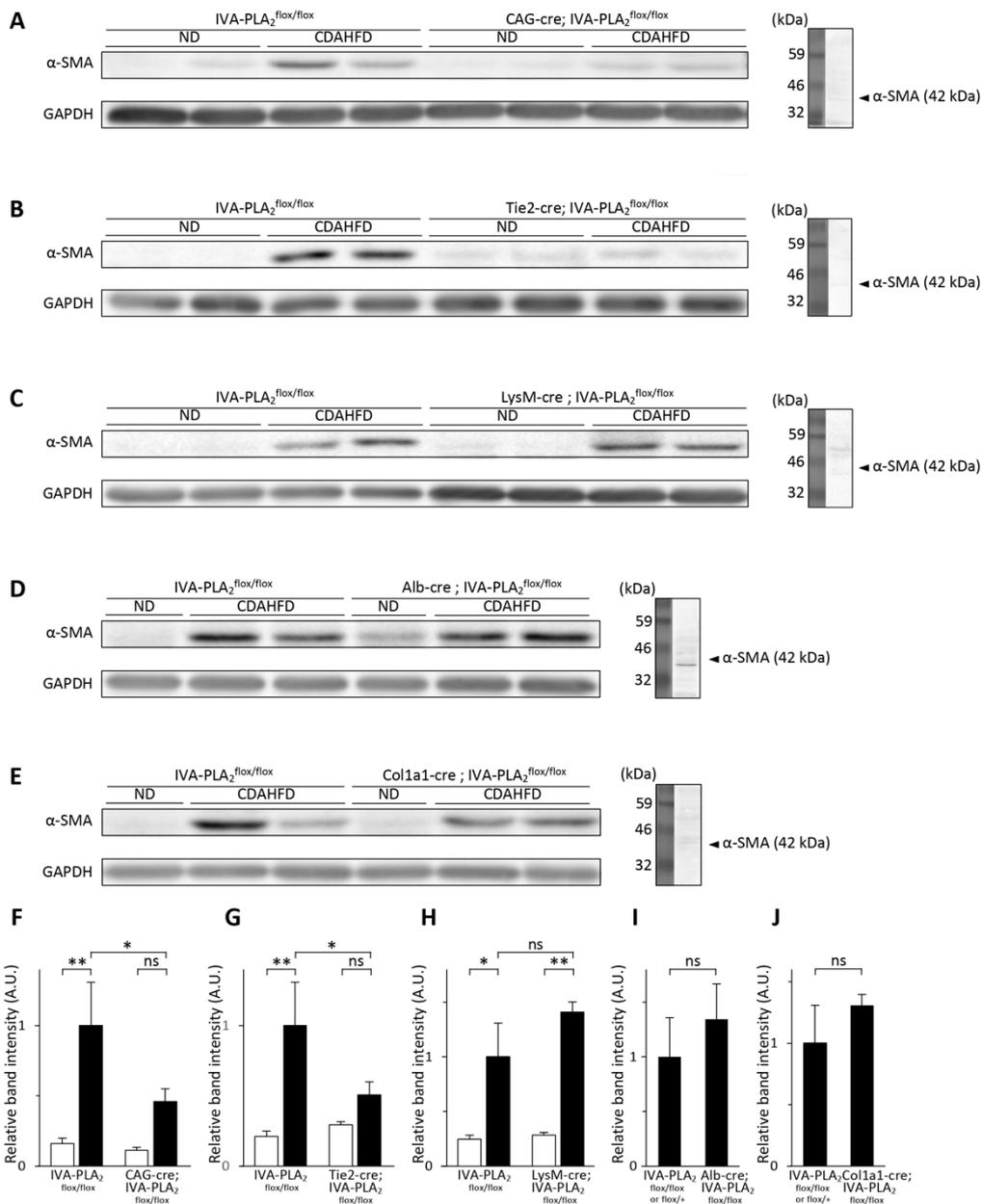


Figure 1-4. The effects of cell type-specific IVA-PLA₂ deficiency on the increase in the α -SMA expression on a CDAHFD.

The levels of α -SMA relative to those of GAPDH in the liver were determined by Western blotting. (A-E) The blots were probed with an anti- α -SMA antibody (top blot) and an anti-GAPDH antibody (bottom blot). (F-J) The band intensity was measured using the NIH ImageJ software program and normalized to that of GAPDH (α -SMA/GAPDH). The values were divided by the mean of the normalized intensity of CDAHFD-fed control mice; and the relative values of α -SMA/GAPDH are in the Y-axis. The bar graphs represent the mean \pm S.E. ND-fed mice, white bars; CDAHFD-fed mice, black bars. The numbers of the cKO mice and its control mice on a CDAHFD (on an ND) were stated as below: the CAG-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} mice: n=7 (n=5), CAG-control mice: n=9 (n=9), Tie2-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} mice: n=9 (n=10), Tie2-control mice: n=12 (n=10), LysM-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} mice: n=9 (n=8), LysM-control mice: n=9 (n=8), Alb-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} mice: n=11, Alb-control mice: n=8, Coll1a1-cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} mice: n=7, and Coll1a1-control mice: n=10. Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test, or Student's *t*-test. *P < 0.05, **P < 0.01.

Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Figure 3

さらに、肝臓での α -SMA の発現を免疫組織学染色により解析したところ、ウェスタンブロットティングの結果と同様に、CDAHFD 摂取下の CAG-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスおよび Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスにおける α -SMA 陽性面積率が対照マウスに比し有意に低かった (Figure 1-5A, B, F, G)。一方、LysM-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウス、Alb-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスおよび Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスにおいては、CDAHFD 摂取下の各種 IVA-PLA₂-CKO マウス群とそれぞれの対照マウス群間で α -SMA 陽性面積率に有意な差はなかった (Figure 1-5C-E, H-J)。

1-3-5. 内皮細胞/類洞内皮細胞 IVA-PLA₂ 選択的欠損による CDAHFD 誘発性の類洞内皮毛細血管化の抑制

正常時の類洞内皮細胞は肝星細胞の活性化を抑制しているが、肝障害時では、類洞内皮細胞は小孔を失って毛細血管化し、肝星細胞の活性化抑制機能を失うことが示唆されている (26)。そこで、内皮細胞/類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が内皮自身の毛細血管化に関与しているかどうかを明らかにするため、毛細血管化した類洞内皮細胞で高発現する接着因子 CD34 に着目し、Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスおよびその対照マウスの肝臓における CD34 の発現量を定量 PCR により解析した。その結果、対照マウスにおいてみられた CDAHFD による CD34 の mRNA 発現量の増加は、Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスでは有意に低下していた (Figure 1-6A)。さらに、類洞内皮の形態を走査型電子顕微鏡で観察し、単位面積あたりの小孔数を計数したところ、対照マウスでは、CDAHFD の摂取により、中心静脈周辺の類洞内皮細胞における小孔が消失し、内皮の毛細血管化がみられたのに対し、Tie2-Cre; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスでは、CDAHFD 摂取下においても小孔がみられた (Figure 1-6B, C)。

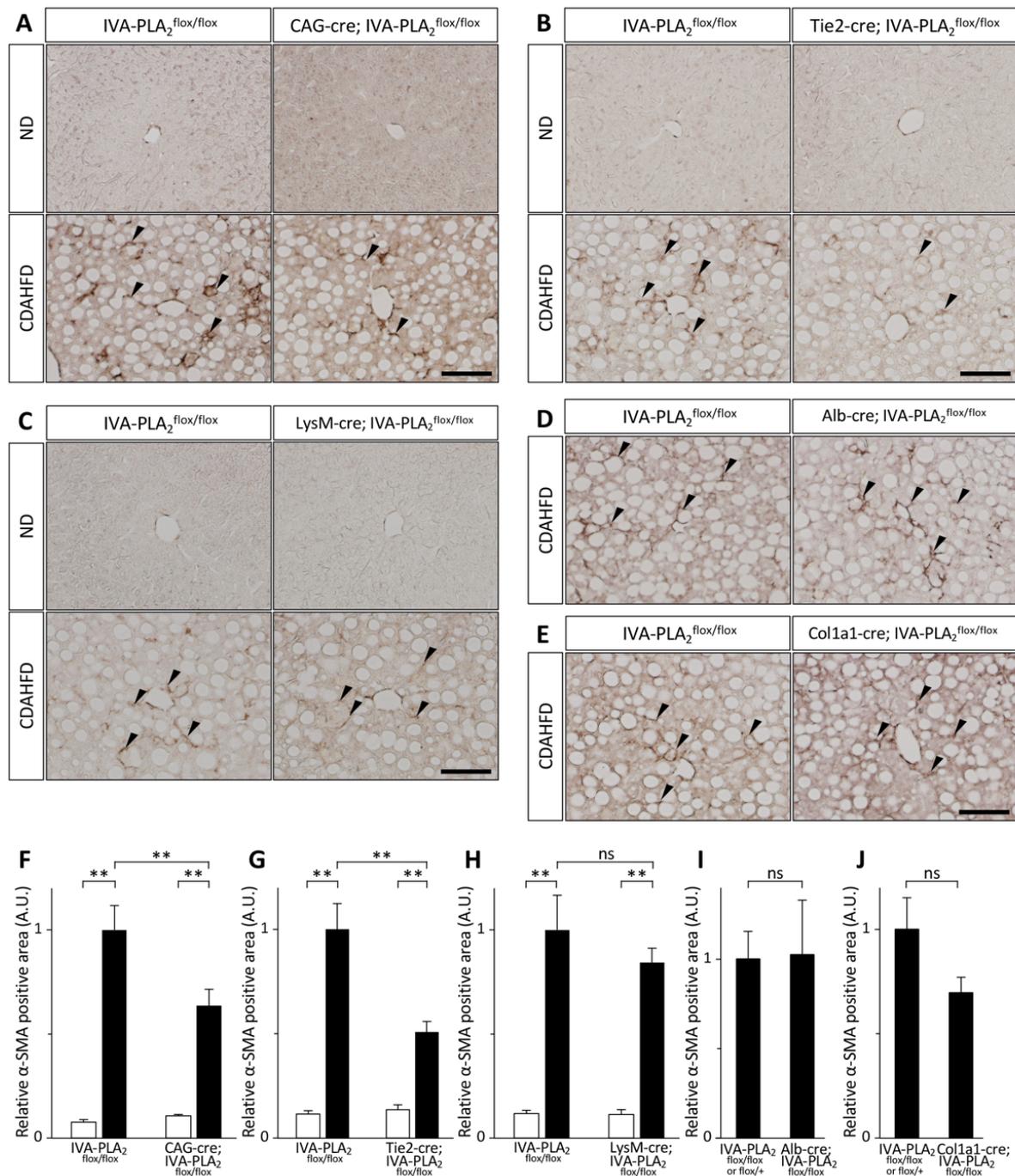


Figure 1-5. Effects of cell type-specific IVA-PLA₂ deficiency on the activation of HSCs on a CDAHFD α -SMA-expressing cells were detected by immunohistochemistry.

(A-E) Representative images are shown. The scale bar corresponds to 200 μ m. (F-J) α -SMA-positive areas were measured using the NIH ImageJ software program. The values were divided by the mean of the α -SMA positive area of the liver sections from CDAHFD-fed control mice. The bar graphs represent the mean \pm S.E. ND-fed mice, white bars; CDAHFD-fed mice, black bars. The numbers of the cKO mice and its control mice on a CDAHFD (on a ND) were stated as below: the CAG-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=5 (n=5), CAG-control mice: n=7 (n=5), Tie2-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=9 (n=6), Tie2-control mice: n=10 (n=6), LysM-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=9 (n=5), LysM-control mice: n=7 (n=5), Alb-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=6, Alb-control mice: n=6, Col1a1- cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice: n=6, and Col1a1-control mice: n=6. Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test, or Student's *t*-test. **P < 0.01. Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, 2022, 294: 120355, Figure 4

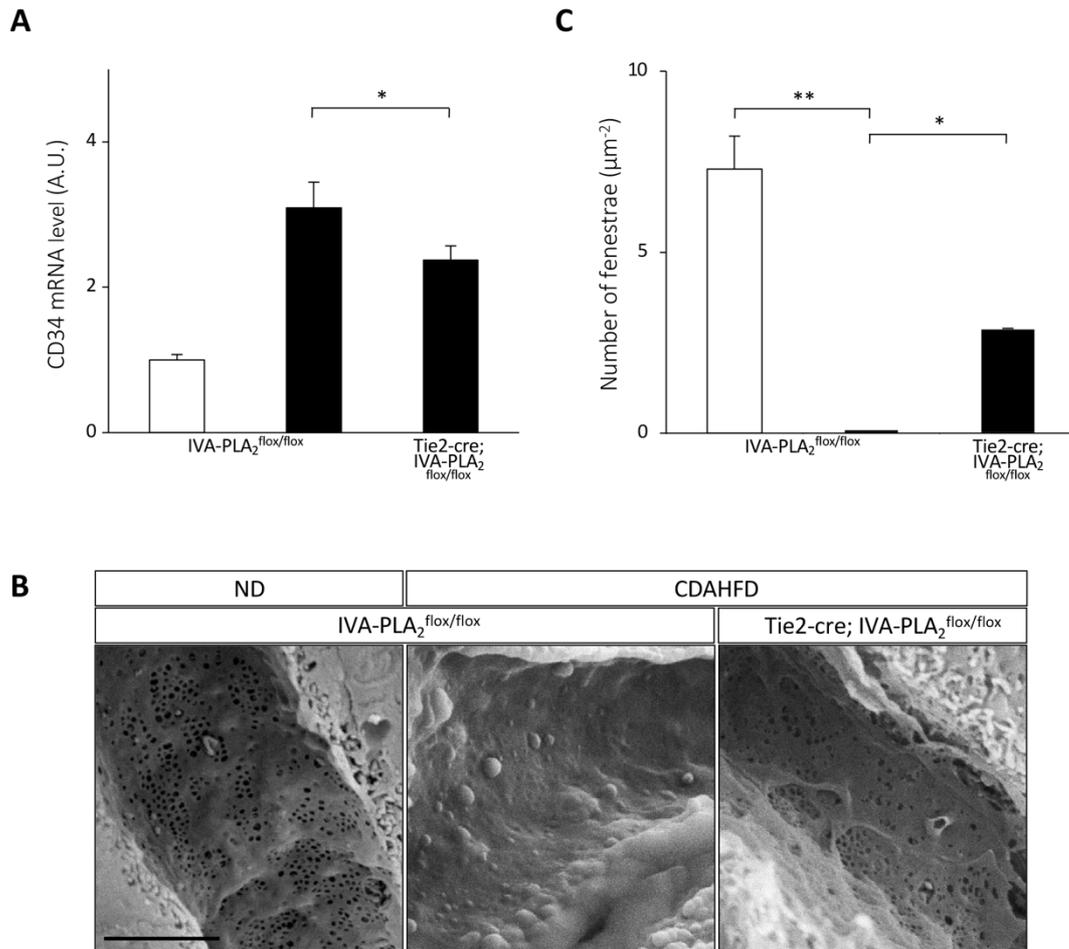


Figure 1-6. Effects of EC/LSEC-specific IVA-PLA₂ deficiency on sinusoidal capillarization on a CDAHFD.

(A) The mRNA levels of CD34 in the liver were determined by real-time PCR. The expression was normalized to that of 36B4 mRNA. The bar graphs represent the mean \pm S.E. ND-fed mice, white bars; CDAHFD-fed mice, black bars (IVA-PLA₂^{flox/flox} mice on a CDAHFD (on an ND): n=12 (n=10), Tie2-cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} mice on a CDAHFD: n=8). (B) Representative images of SEM are shown. The scale bar corresponds to 2.5 μ m. (C) Fenestration frequency (number per μ m²) was measured using the ImageJ software program (n=3/each experimental group). Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test. *P < 0.05

Kawashita, Ozaki et al., *Life Sciences*, **2022**, 294: 120355, Figure 5.

Table 1-3. Exact *F* and *t* values for all statistical analysis in each experiment.

Figure			Statistical analysis	<i>F</i> or <i>t</i> value
Table 1-1			Student's <i>t</i> -test	<i>t</i> =1.51
				<i>t</i> =7.32
				<i>t</i> =0.64
				<i>t</i> =1.81
Figure 1-2B		LSD post-hoc test	<i>F</i> _(3, 78) =21.30	
Table 1-2	CAG-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flox/flox}	Body weight	LSD post-hoc test	<i>F</i> _(3, 78) =26.45
		Liver weight		<i>F</i> _(3, 75) =30.25
		Epididymal fat pad		<i>F</i> _(3, 78) =3.64
		AST		<i>F</i> _(3, 78) =10.76
		ALT		<i>F</i> _(3, 78) =33.27
		Hepatic TG		<i>F</i> _(3, 78) =66.64
	Tie2-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flox/flox}	Body weight	LSD post-hoc test	<i>F</i> _(3, 111) =6.52
		Liver weight		<i>F</i> _(3, 111) =8.04
		Epididymal fat pad		<i>F</i> _(3, 111) =1.07
		AST		<i>F</i> _(3, 105) =27.11
		ALT		<i>F</i> _(3, 105) =65.09
		Hepatic TG		<i>F</i> _(3, 111) =90.16
	Lys-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flox/flox}	Body weight	LSD post-hoc test	<i>F</i> _(3, 90) =5.79
		Liver weight		<i>F</i> _(3, 90) =13.50
		Epididymal fat pad		<i>F</i> _(3, 81) =0.88
		AST		<i>F</i> _(3, 87) =19.83
		ALT		<i>F</i> _(3, 87) =24.55
		Hepatic TG		<i>F</i> _(3, 90) =58.00
	Alb-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flox/flox}	Body weight	Student's <i>t</i> -test	<i>t</i> =0.90
		Liver weight		<i>t</i> =0.51
		Epididymal fat pad		<i>t</i> =1.17
		AST		<i>t</i> =1.28
		ALT		<i>t</i> =1.60
		Hepatic TG		<i>t</i> =1.48
Colla1-Cre; IVA-PLA ₂ ^{flox/flox}	Body weight	Student's <i>t</i> -test	<i>t</i> =0.55	
	Liver weight		<i>t</i> =2.21	
	Epididymal fat pad		<i>t</i> =2.78	
	AST		<i>t</i> =1.05	
	ALT		<i>t</i> =1.36	
	Hepatic TG		<i>t</i> =0.62	

Table 1-3. Exact F and t values for all statistical analysis in each experiment. (Continued)

Figure	Statistical analysis	F or t value
Figure 1-3F	LSD post-hoc test	$F_{(3,78)}=36.69$
Figure 1-3G		$F_{(3,111)}=41.57$
Figure 1-3H		$F_{(3,90)}=27.13$
Figure 1-3I	Student's t -test	$t=1.38$
Figure 1-3J		$t=0.46$
Figure 1-4F	LSD post-hoc test	$F_{(3,78)}=4.71$
Figure 1-4G		$F_{(3,111)}=5.77$
Figure 1-4H		$F_{(3,90)}=6.65$
Figure 1-4I	Student's t -test	$t=0.70$
Figure 1-4J		$t=0.84$
Figure 1-5F	LSD post-hoc test	$F_{(3,54)}=29.91$
Figure 1-5G		$F_{(3,81)}=23.50$
Figure 1-5H		$F_{(3,66)}=19.25$
Figure 1-5I	Student's t -test	$t=0.07$
Figure 1-5J		$t=1.79$
Figure 1-6A	LSD post-hoc test	$F_{(2,52)}=12.64$
Figure 1-6B		$F_{(2,12)}=35.06$

1-4. 考察

本章では、IVA-PLA₂を介した NASH の病態進展を担う責任細胞を特定することを目的に、肝実質細胞、単球/マクロファージ、内皮細胞/類洞内皮細胞および肝星細胞において選択的に IVA-PLA₂を欠損させた細胞種選択的 IVA-PLA₂欠損マウス(それぞれ CAG-cre; IVA-PLA₂^{lox/lox}マウス、Alb-cre; IVA-PLA₂^{lox/lox}マウス、LysM-cre; IVA-PLA₂^{lox/lox}マウス、Tie2-cre; IVA-PLA₂^{lox/lox}マウスおよび Col1a1-Cre; IVA-PLA₂^{lox/lox}マウス)を用いて、CDAHFD 誘発性 NASH モデルを作製し、NASH の病態解析を行った。CDAHFD 摂取下、肝臓でのコラーゲン線維の蓄積は、対照マウスに比し内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂欠損マウスにおいて有意に軽減されたが、肝実質細胞選択的 IVA-PLA₂欠損マウス、単球/マクロファージ選択的 IVA-PLA₂欠損マウスおよび肝星細胞選択的 IVA-PLA₂欠損マウスでは軽減されなかった (Figure 1-3)。また、CDAHFD による肝臓での活性化肝星細胞マーカー (α -SMA) の発現誘導もまた、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂欠損マウスにおいてのみ抑制された (Figure 1-4, 1-5)。これらの結果から、内皮細胞/類洞内皮細胞に発現する IVA-PLA₂が肝星細胞の活性化を促進し、高脂肪食により誘発される肝線維化を進展させることが示唆された。

肝臓の類洞壁を構成する類洞内皮細胞には小孔があり、また、基底膜が欠失しているなど他の臓器の内皮細胞ではみられない独特な構造を有している (33)。生体が健常な場合、類洞内皮細胞は、一酸化窒素の産生を介して肝星細胞の活性化を抑える役割を担うことが報告されている (34)。しかし、肝障害が起こると、類洞内皮細胞はヘッジホッグシグナルの亢進や lipoygenase-1 の活性化、オートファジーの抑制を介して、小孔の消失と基底膜の形成を伴い毛細血管化する (35)。毛細血管化した類洞内皮細胞は肝星細胞の活性化抑制機能を失うことから、類洞内皮細胞の毛細血管化が NASH の進展の重要な促進因子となる。本章では、CDAHFD により誘起される毛細血管化マーカー CD34 の発現や類洞内皮小孔の消失が、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂欠損により抑制されたことから、NASH の病態進展において、内皮細胞/類洞内皮細胞の IVA-PLA₂が類洞内皮の毛細血管化を促進することで、肝星細胞の活性化および肝線維化を促進すると考えられる。

最近の研究において、高脂肪食を摂取させたマウスから単離した類洞内皮細胞では、通常飼料を摂取させたマウス由来の類洞内皮細胞と比較して、PGE₂、PGF_{2 α} 、6-ketoPGF_{1 α} および PGD₂ の産生量が多いことが示されている (36)。6-ketoPGF_{1 α} は PGI₂ の代謝物であるが、PGE₂ と PGI₂ は PKC 経路を介して肝星細胞の増殖を促進することから (37)、類洞内皮細胞由来の PGE₂ と PGI₂ が肝星細胞の増殖および活性化の促進に重要な脂質メディエーターと考えられる。PGD₂ の受容体 DP1 の刺激薬であるコンカナバリン A により、肝星細胞の活性化が抑制されることが報告されているが (38)、NASH の進展過程においては、PGD₂ による肝星細胞の活性化抑制作用は顕在化しないと推察される。また、非酵素的過酸化によりアラキドン酸から産生される 8-epi-PGF_{2 α} が肝星細胞をコラーゲン産生型に形質変換させることや (39)、LPA がラット由来の肝星細胞の増殖を促進することから (22)、IVA-PLA₂により産生されるこれらの PG とリゾリン脂質も NASH の進展における類洞内皮細胞に依存した肝線維化に関与している可能性がある。しかしながら、類洞内皮細胞およびその周辺の細胞により産生される脂質メディエーターの中から、肝線維化の進展させるものを特定するには、さらなる詳細な解析が必要である。

以前の当分野での研究において、四塩化炭素誘発性肝線維化モデルマウスでは、肝障害および MCP-1 の産生が全身性 IVA-PLA₂ 欠損により抑制されることを示したが (23)、本章の Figure 1-2 に示したように、CDAHFD により誘発される肝障害や炎症反応に関しては、全身性 IVA-PLA₂ 欠損の影響はなかった。本研究で使用した CDAHFD 誘発性 NASH モデルでは、コリンの欠乏とメチオニンの減量による VLDL の形成低下によって、肝臓からの中性脂肪の放出が障害され、強制的かつ急速に肝実質細胞の脂肪化が誘導されることから (40)、IVA-PLA₂ 欠損による肝障害や炎症反応の抑制効果が隠れていると推察される。しかしながら、CDAHFD 誘発性 NASH モデルでは肝線維化も比較的急激に形成されるにも関わらず、この肝線維化が全身および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損により約 20%程度ではあるものの有意に抑制されたことは、肝線維化を阻止できる有望な薬物がない現状においては極めて注目すべき点であり、内皮細胞/類洞内皮細胞に発現する IVA-PLA₂ が、NASH の進展に伴う肝線維化の治療標的となることが示唆される。内皮細胞/類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ の NASH 治療標的としての可能性をより明確にするためには、今後、比較的緩やかに病態が進展する高脂肪食誘発 NASH モデルを用いて、NASH の病態に対する IVA-PLA₂ の細胞種選択的な欠損の効果を検証する必要がある。

IVA-PLA₂ は、炎症反応を伴う肝がんなどにおける腫瘍の形成に関与していることが報告されている (41,42)。IVA-PLA₂ に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの投与により、炎症性腸疾患マウスモデルにおける炎症性メディエーターの増加と NF-κB のリン酸化が阻害されることや (43)、肝がん細胞の増殖促進に NF-κB シグナルが関与することから (44)、IVA-PLA₂ が NASH から肝がんへの進展に関与する可能性もある。したがって、IVA-PLA₂ は、NASH のみならず肝がんの治療標的としても期待され、本研究で作製した IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスは、肝がんにおける IVA-PLA₂ を介した腫瘍形成メカニズムを明らかにするために有用であると考える。

類洞内皮細胞が特徴的なエンドサイトーシス機構を有することから、ヒアルロン酸、ホルムアミド処理血清アルブミン (FSA)、および量子ドット (QD) などのリガンドやナノ粒子が、類洞内皮細胞選択的ドラッグデリバリーシステム (DDS) に有用であることが報告されている (45)。さらに最近の研究で、経口投与による類洞内皮細胞への薬物送達を試みられ、QD でコーティングした薬剤が類洞内皮細胞に高い標的的特異性を示すことが明らかになっている (46)。経口 IVA-PLA₂ 阻害剤が肝線維化を抑制することから (24)、QD によりコーティングされた経口 IVA-PLA₂ 阻害剤の作製は、副作用が少なく高い治療効果を発揮する NASH 治療薬の開発に繋がると考える。

第2章 食餌療法開始後にみられる肝線維化進展への肝星細胞の IVA-PLA₂ の関与

2-1. 緒言

NASH は、脂肪肝形成、炎症および線維化が特徴の進展性の慢性肝炎である (47, 48)。特に肝線維化は、炎症性および線維化促進性の種々のメディエーターにより活性化された肝星細胞が産生する細胞外マトリックスの主成分であるコラーゲン線維が過剰に蓄積することで発症・進展し、肝硬変や肝がんへと移行するため (47, 49)、肝線維化に対する治療が重要である。しかしながら、肝線維化に対する有効な薬物療法が確立されていない現状 (50) では、線維化を伴う NASH の治療の第一選択療法は、食生活や運動などの生活習慣の改善である (51)。しかしながら、生活習慣の改善を長期にわたって継続することは難しく、すべての人が達成できるとは限らない。さらに、食餌療法により脂肪肝は改善するにもかかわらず、線維化を伴う NASH の予防と治療に関する最適な食餌療法は残念ながら存在しない (52, 53)。したがって、NASH の肝線維化を予防または治療するために食生活の改善と組み合わせた有効な薬物療法が必要である。

活性化した肝星細胞は、炎症を伴う肝線維の形成に極めて重要な役割を果たしており (49, 54)、その活性化は、TGF- β などの種々のメディエーターによって誘起される (54, 55)。以前の報告では、TGF- β 1 によるラット肝星細胞の活性化が、エイコサノイドやリゾリン脂質などの脂質性炎症メディエーターの産生初発反応を担う IVA-PLA₂ の阻害剤により抑制されることが示されている (30)。さらには、PGE₂ および PGI₂ は、LX-2 ヒト肝星細胞において TGF- β 1 の発現を促進させることも報告されている (37)。肝星細胞の活性化および肝線維化における PG の役割に関しては、まだ議論の余地がある (56, 57) もの、これらの知見は、肝星細胞が担う肝線維化に IVA-PLA₂ が関与することを示唆しており、肝星細胞の IVA-PLA₂ は肝線維化に対する治療標的となる可能性がある。

当分野では、IVA-PLA₂ 全身欠損マウスにおいて、高脂肪食誘発性の肝線維化が野生型マウスに比し軽減されることを明らかにしている (23)。これに加えて、前章では、CDAHFD の 3 週間投与による NASH 初期段階の肝線維化が、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的な IVA-PLA₂ の欠損により軽減することを明らかにした。しかしながら、肝星細胞選択的な IVA-PLA₂ の欠損では、肝線維化に影響はみられなかった。

高脂肪食下の肝組織では、IVA-PLA₂ が産生を担う PG 類や、ロイコトリエン類、リゾリン脂質といった脂質性起炎因子以外に、コラーゲン産生促進因子である TGF- β や、インターロイキン類などの炎症性サイトカインといった複数の因子が肝星細胞を活性化させると考えられる。このことを踏まえると、肝星細胞での IVA-PLA₂ の欠損が高脂肪食下での肝線維化に影響しなかった前章の結果は、肝星細胞活性化因子群の共存に起因すると考えられ、肝星細胞の IVA-PLA₂ が肝星細胞による線維化過程に関与しているとしても、高脂肪食摂取下のマウスにおいては、本酵素の阻害は肝線維化に対して抑制効果を示せないことを示唆している。すなわち、肝星細胞選択的な IVA-PLA₂ の欠損による肝線維化に対する抑制効果は、高脂肪食の影響を除く目的で普通食へと切り替えた条件下で表れる可能性がある。そこで本章では、肝線維症に対する食餌療法の効果促進を狙うことも含め、食餌療法を想定した実験系にて肝星細胞の IVA-PLA₂ の肝線維化への関与と治療標的としての可能性について検証した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 実験動物

前章で作製した IVA-PLA₂^{fox/fox} マウスと Colla1-cre^{KI/+} マウス (RIKEN BRC) を交配し、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂-CKO マウス (Colla1-Cre; IVA-PLA₂^{fox/fox} マウス) を作出し、同腹の IVA-PLA₂^{fox/fox} マウスを対照として使用した。また、5 週齢の雄性 C57BL/6NCrSlc マウスを日本 SLC (Sizuoka, Japan) から購入し、予備飼育の 1 週間後に実験に用いた。マウスは 1-2-1 と同様に飼育し、すべての動物実験は、京都薬科大学の動物実験委員会の承認の下で実施した。

2-2-2. 高脂肪食誘発性 NASH マウスモデルの作製および食餌療法の方法

6 週齢の雄性マウスに対し、CDAHFD (Research Diets) を 3 週間または 9 週間摂取させて高脂肪食による NASH 病態を誘発した。その後、食餌療法を想定して高脂肪食から普通食に切り替えた後の NASH 病態を組織学的に解析するため、ND として MF (Oriental Yeast Co) を一定期間摂取させた。マウスは絶食させず解剖し、下大静脈から血液を採取後、心臓から冷生理食塩水を灌流し、肝組織を採取した。採取した血液は、室温で 1 時間放置後、10,000 ×g、室温で 10 分間遠心分離し、その上清を血清とした。

2-2-3. 血清中 AST および ALT 値の測定

血清中の AST および ALT 値の測定は 1-2-3 に示した方法と同様に行った。

2-2-4. シリウスレッド染色

パラフィン包埋肝組織切片のシリウスレッド染色は 1-2-5 に示した方法と同様に行った。

2-2-5. HE 染色

パラフィン包埋肝組織切片の HE 染色は 1-2-6 に示した方法と同様に行った。染色した切片を倒立型顕微鏡 (model IX71; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて、中心静脈を含む 8 視野を 1,360×1,024 ピクセルの解像度で 200 倍にて撮影した。肝炎症の程度は、1 視野あたりの白血球の浸潤箇所の数で評価し、以下に従い分類した: 0 (白血球浸潤なし)、1 (白血球浸潤 <2 箇所)、2 (白血球浸潤 2-4 箇所)、3 (白血球浸潤 ≤5 箇所) (58)。

2-2-6. 免疫組織染色

パラフィン包埋肝組織切片の免疫組織染色は 1-2-7 に示した方法と同様に行った。

2-2-7. ウェスタンブロット解析

肝組織からのタンパク質抽出およびウェスタンブロット解析は 1-2-8 に示した方法と同様に行った。

2-2-8. ヒト肝星細胞不死化細胞株の TWNT-1 細胞の培養

ヒト肝星細胞不死化細胞株の TWNT-1 は JCRB 生物資源バンクより購入し、10%ウシ胎児血清 (Cat. No. 10270106, Gibco, MA, USA) およびペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (Cat.

No. 168-23191, Wako Pure Chemical Industries) を含む D-MEM (Cat. No. 041-29775, Wako Pure Chemical Industries) を用いて培養した。TWNT-1 細胞を 6 cm-dish に 1×10^6 cells/dish になるように播種した後、37 °C 下、5% CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。培養後、ディッシュ中の培養液をアスピレーターで除き、DMSO または IVA-PLA₂ 特異的阻害剤 (pyrrophenone) を含有した DMEM 培養液に交換し、24 時間培養した (59)。

2-2-9. 総 RNA 抽出および定量 PCR による mRNA 発現量解析

肝組織および TWNT-1 からの RNA 抽出、cDNA 合成、定量 PCR および発現量の解析は 1-2-9 に示した方法と同様に行った。使用したプライマーを Table 2-1 に示す。

2-2-10. 統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。3 群以上の比較には、ANOVA あるいは Kruskal-Wallis による分散分析を行った後、それぞれ最小有意差検定あるいは Dunn 検定を行った。両側検定での危険率が 5% 未満 ($p < 0.05$) を統計学的に有意差あると判定した (Table 2-3 参照)。

Table 2-1. Sequences of primers used for qPCR.

Species	Target genes		Sequence	
Mouse	Mcp-1	sense	5'- AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3'	
		antisense	5'- TCTGGACCCATTTCCTTCTTG-3'	
	α -Sma	sense	5'- CAGCGGGCATCCACGAA-3'	
		antisense	5'- GCCACCGATCCAGACAGA-3'	
	Colla2	sense	5'- CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3'	
		antisense	5'- CTTGCCCCATTCATTTGTCT-3'	
	Rplp0	sense	5'- GACCTCACTGAGATTCGGGATA-3'	
		antisense	5'- GGCCTAGACCAGTGTCTGAGC-3'	
	Species	Target genes		Sequence
	Human	MCP-1	sense	5'- CAGCCAGATGCAATCAATGC -3'
			antisense	5'- GTGGTCCATGGAATCCTGAA -3'
		α -SMA	sense	5'- CAGGGCTGTTTTCCCATCCAT -3'
antisense			5'- GCCATGTTCTATCGGGTACTTC -3'	
COL1A2		sense	5'- TCACCTACCACTGCAAGAACAG -3'	
		antisense	5'- CCCTCAGCAACAAGTTCAACA -3'	
RPLP0		sense	5'- TGTCTGTCTGCAGATTGGCT -3'	
		antisense	5'- TGGATCAGCCAAGAAGGCCT -3'	

2-3. 実験結果

2-3-1. NASH 初期または進展モデルにおいて食餌療法開始後にみられる肝線維化の悪化

始めに、野生型マウス (C57BL/6NCrSlc マウス) に CDAHFD を 3 週間または 9 週間摂取させ、それぞれ NASH 初期モデルおよび NASH 進展モデルを作製した後、食餌療法を想定して ND に切り替え一定期間マウスを飼育した。NASH 初期および進展モデルのいずれも、CDAHFD から ND に切り替えることにより、肝組織における脂肪滴が劇的に消失したが、肝臓でのコラーゲン線維の蓄積量は ND に切り替えた後も増加し、肝線維化が悪化することが判明した (Figure 2-1)。NASH 初期モデルと比較して、NASH 進展モデル形成後に ND に切り替えたマウスの肝臓では、コラーゲンがより顕著に蓄積していた (Figure 2-1)。

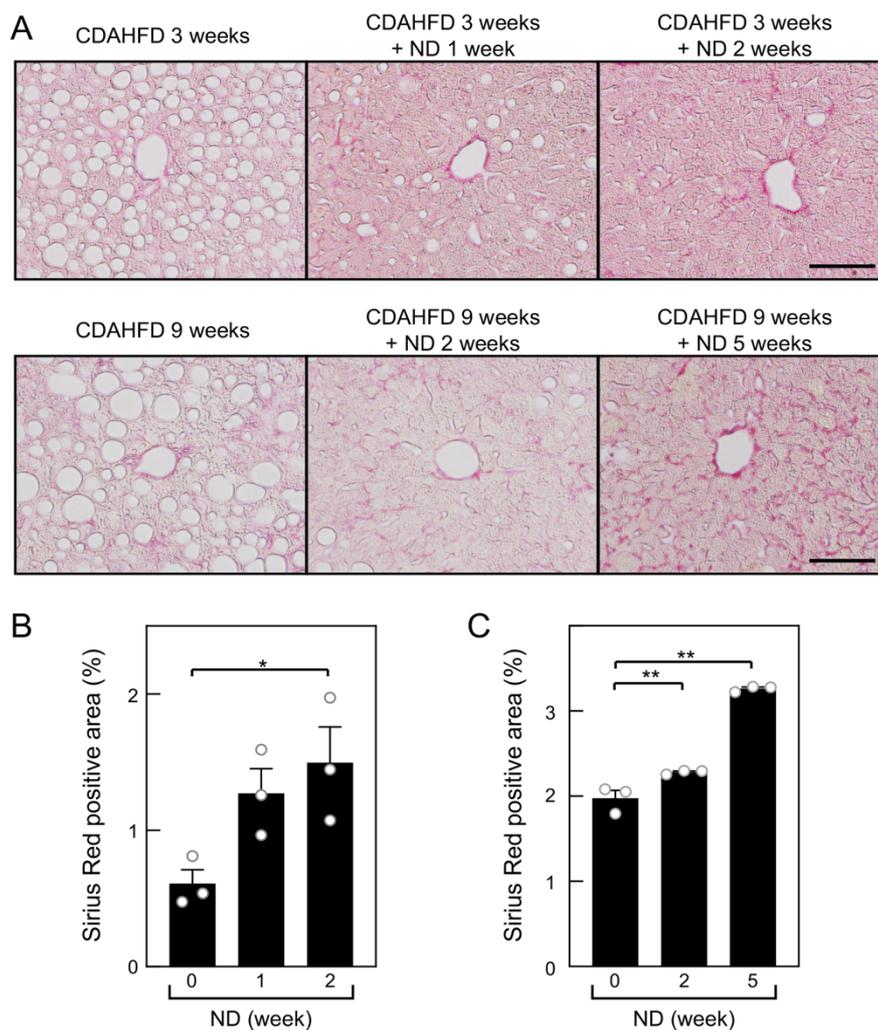


Figure 2-1. Increase in hepatic collagen deposition after dietary intervention for CDAHFD-induced hepatic fibrosis.

(A) Representative images of picrosirius red staining are shown. The scale bar corresponds to 100 μ m. (B, C) The sirius-red stained areas were measured using the NIH ImageJ software program (B: CDAHFD 3 weeks + ND; C: CDAHFD 9 weeks + ND). The bar graphs represent the mean \pm S.E. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The number of mice in each group was $n=3$.

Ozaki et al., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (in press) Figure 1.

2-3-2. NASH 初期モデルにおける食餌療法後の肝線維化悪化の肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による軽減

NASH 初期モデルにおいて、前章の結果と同様、CDAHFD 摂取下でのコラーゲン線維の蓄積量に関しては、Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスおよび対照マウス間で顕著な差はみられなかった (Figure 2-2)。一方、食餌療法後に肝線維量の顕著な増加が対照マウスでみられたのに対して、Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスではこの増加はなく、コラーゲン線維の蓄積量は対照マウスと比較して低値であった (Figure 2-2)。

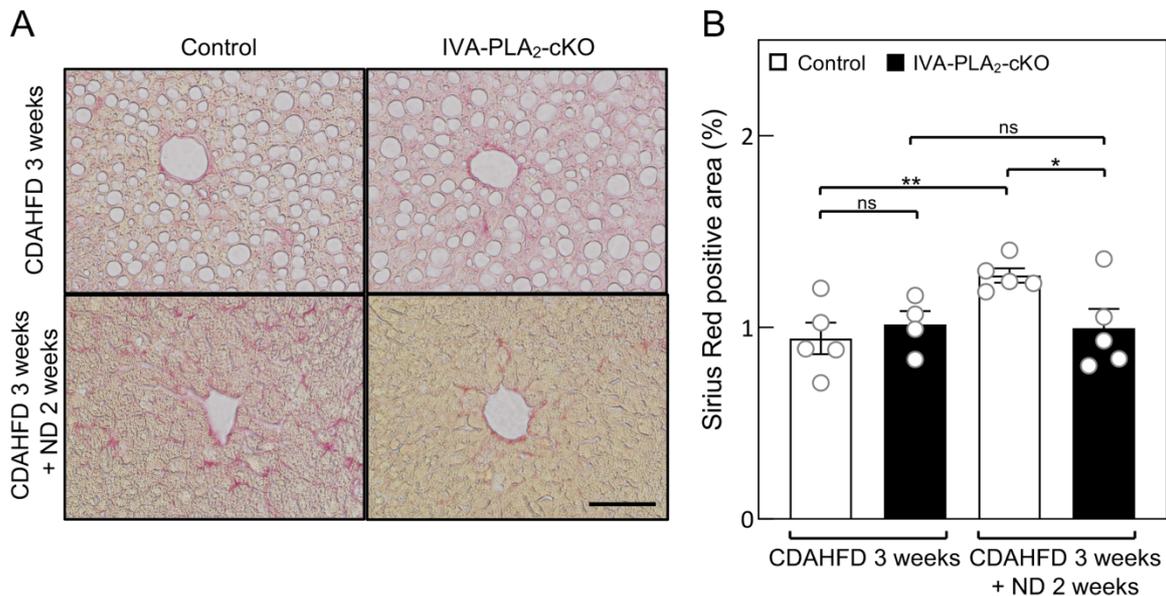


Figure 2-2. Suppression of the increase in hepatic collagen deposition by an HSC-specific IVA-PLA₂ deficiency after dietary intervention for the early-stage of fibrosis.

(A) Representative images of picosirius red staining are shown. The scale bar corresponds to 100 μ m. (B) The sirius-red stained areas were measured using the NIH ImageJ software program. The bar graphs represent the mean \pm S.E. ns: non-significant, *P < 0.05, **P < 0.01.

Ozaki et al., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (in press) Supplementary Figure 2.

2-3-3. NASH 進展モデルにおける食餌療法後の肝線維化悪化の肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による軽減

NASH 進展モデルにおいても同様に解析したところ、9 週間の CDAHFD 摂取により蓄積したコラーゲン量は、Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスおよび対照マウス間で同程度であった (Figure 2-3)。CDAHFD から ND に切り替えて 5 週間後、対照マウスではコラーゲン線維量が約 2 倍に増加したのに対して、Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスでは 1.3 倍程度に留まり、食餌療法後の肝線維化が対照マウスと比較して有意に軽減された (Figure 2-3)。

CDAHFD 摂取により誘発された血清中 AST および ALT の上昇や肝での脂肪滴の蓄積は、Coll1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスと対照マウスでともに、食餌療法後に劇的に減少し、両マウス間で顕著な差はなかった (Table 2-2, Figure 2-3A)。

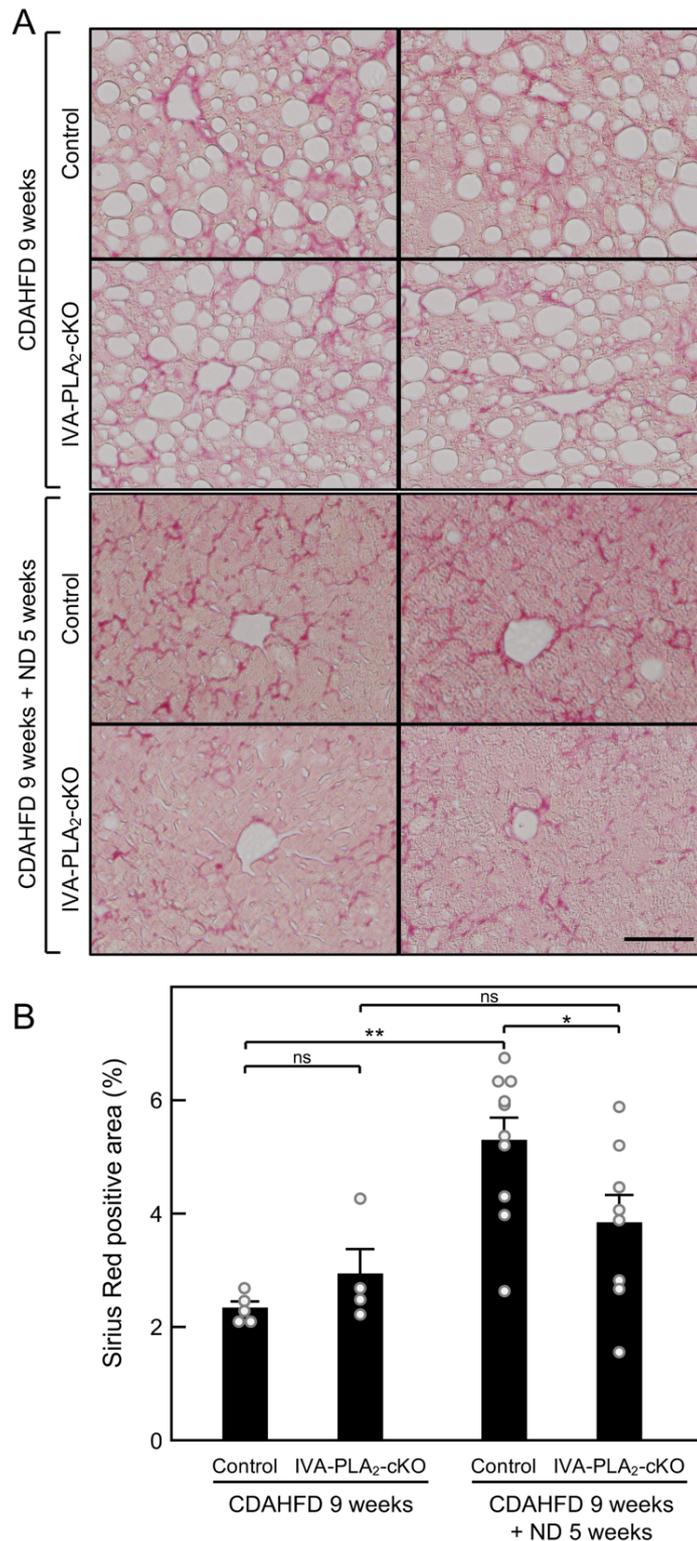


Figure 2-3. Protective effects of an HSC-specific IVA-PLA₂ deficiency on the increase in hepatic collagen deposition after dietary intervention.

(A) Representative images of picosirius red staining are shown. The scale bar corresponds to 100 μ m. (B) The sirius-red stained areas were measured using the NIH ImageJ software program. The bar graphs represent the mean \pm S.E. ns: non-significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The numbers of the cKO mice and its control mice on a CDAHFD for 9 weeks (on a CDAHFD for 9 weeks and an ND) were $n=4$ ($n=8$) and $n=5$ ($n=10$), respectively.

Ozaki et al., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (in press) Figure 2.

Table 2-2. Effects of a CDAHFD and dietary intervention on the body weight, liver-to-body-weight ratio, AST, and ALT in HSC-specific IVA-PLA₂-cKO and control mice.

The data represent the means \pm S.E. Statistical significance was evaluated using an ANOVA with an LSD post-hoc test. *P < 0.05, **P < 0.01 versus Control (ND 9 weeks) †P < 0.05, ††P < 0.01 versus Control (ND 14 weeks) §P < 0.05, §§P < 0.01 versus Control (CDAHFD 9 weeks) ‡P < 0.05, ‡‡P < 0.01 versus IVA-PLA₂-cKO (CDAHFD 9 weeks)

Ozaki et al., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (in press) Supplementary Table 2.

	Body weight (g)	Liver to body weight ratio (%)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
Control ND 9 weeks	31.01 \pm 2.76	4.11 \pm 0.13	13.82 \pm 0.93	4.09 \pm 0.80
Control CDAHFD 9 weeks	26.16 \pm 1.47*	6.92 \pm 0.45**	124.16 \pm 37.19**	66.87 \pm 4.20**
IVA-PLA₂-cKO CDAHFD 9 weeks	25.79 \pm 1.30*	6.93 \pm 0.21**	78.20 \pm 2.02*, §	58.94 \pm 6.20**
Control ND 14 weeks	34.08 \pm 1.25	4.67 \pm 0.19	14.86 \pm 2.17	3.51 \pm 0.51
Control CDAHFD 9 weeks + ND 5 weeks	32.79 \pm 0.54§§	5.81 \pm 0.17†, §§	24.85 \pm 2.46§§	10.58 \pm 1.23§§
IVA-PLA₂-cKO CDAHFD 9 weeks + ND 5 weeks	31.06 \pm 0.97‡‡	5.91 \pm 0.17†, ‡‡	21.06 \pm 1.81‡‡	8.98 \pm 0.80‡‡

2-3-4. 肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による白血球浸潤の抑制

CDAHFD により誘発される白血球の浸潤に対する肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損の影響を明らかにするため、HE 染色を行った。9 週間の CDAHFD 摂取下、対照マウスにおいては青染色された核の集積が観察され、白血球の浸潤が顕著に認められたが、これは ND 切り替え後もほとんど変化はなかった (Figure 2-4A)。一方、CDAHFD 摂取下の Coll1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスでは、白血球の浸潤が対照マウスと同程度であったが、ND 切り替え後の白血球の浸潤程度は対照マウスに比し少なかった (Figure 2-4A)。また、白血球の浸潤程度に基づき炎症反応をスコア化した結果、対照マウスにおいては ND 切り替え前後のスコアに有意な差はなかったが、Coll1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスでは、ND への切り替えによりスコアが有意に低下した (Figure 2-4B)。

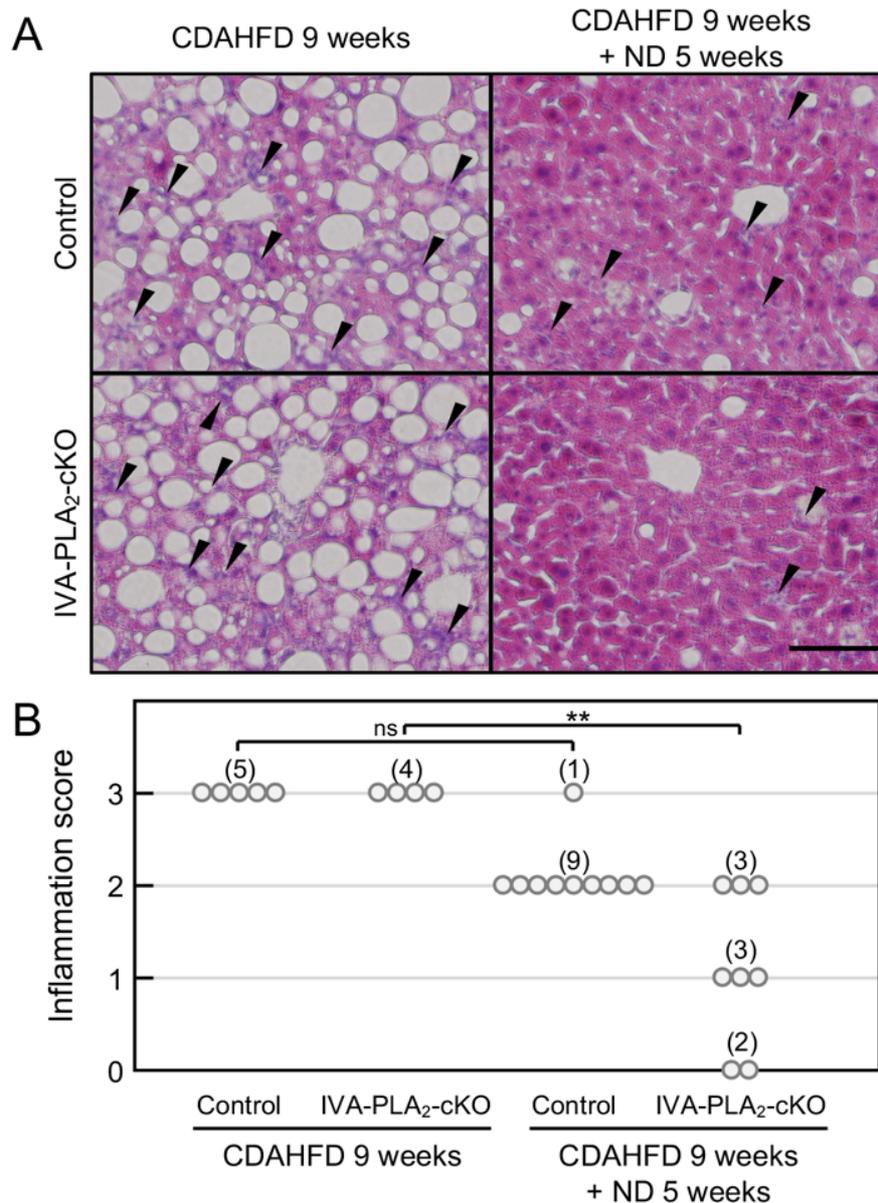


Figure 2-4. Faster alleviation of hepatic inflammation in HSC-specific IVA-PLA₂-cKO mice than in control mice under dietary intervention.

(A) Representative images of HE staining are shown. The scale bar corresponds to 100 μ m. Arrowheads indicate foci. (B) The hepatic inflammation score was evaluated as described in the Materials and Methods. ns: non-significant, **P < 0.01. The numbers of the cKO mice and its control mice on a CDAHFD for 9 weeks (on a CDAHFD for 9 weeks and an ND) were n=4 (n=8) and n=5 (n=10), respectively.

Ozaki et al., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (in press) Figure 3.

2-3-5. 肝臓における *MCP-1* mRNA 発現の肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による抑制

肝臓における *Mcp-1*、 α -*Sma* および *Colla2* の mRNA 発現量を定量 PCR により解析した結果、9 週間 CDAHFD を摂取させた *Coll1a1-Cre*; IVA-PLA₂^{flx/flx} マウスにおける *Mcp-1* の mRNA 発現は、対照マウスに比し有意に 34%低下していた (Figure 2-5A)。なお、ND 切り替え後の *Mcp-1* の mRNA 発現量は、両遺伝子型マウスとも CDAHFD 投与下に比し 70%以上低下しており同程度であった。一方、食餌療法後の α -*Sma* および *Colla2* の mRNA 発現量は、

Col1a1-Cre; IVA-PLA₂^{flox/flox} マウスでは対照マウスよりも低い傾向にあったが、有意な差ではなかった。

2-3-6. 肝星細胞における MCP-1 mRNA 発現の IVA-PLA₂ 阻害剤による抑制

活性化肝星細胞の細胞培養系モデルとして TWNT-1 を用い、肝星細胞の活性化への IVA-PLA₂ の関与を検討した。TWNT-1 を IVA-PLA₂ の特異的阻害剤である pyrrophenone で処理し、24 時間後における MCP-1、 α -SMA および COL1A2 の mRNA 発現量を定量 PCR により解析した (Figure 2-5B)。その結果、pyrrophenone 処理により、TWNT-1 における MCP-1 の mRNA 発現量は著しく減少し、 α -SMA の mRNA 発現も pyrrophenone 処理により低下する傾向にあった。一方、COL1A2 の mRNA 発現に対する pyrrophenone の影響はほとんどなかった。

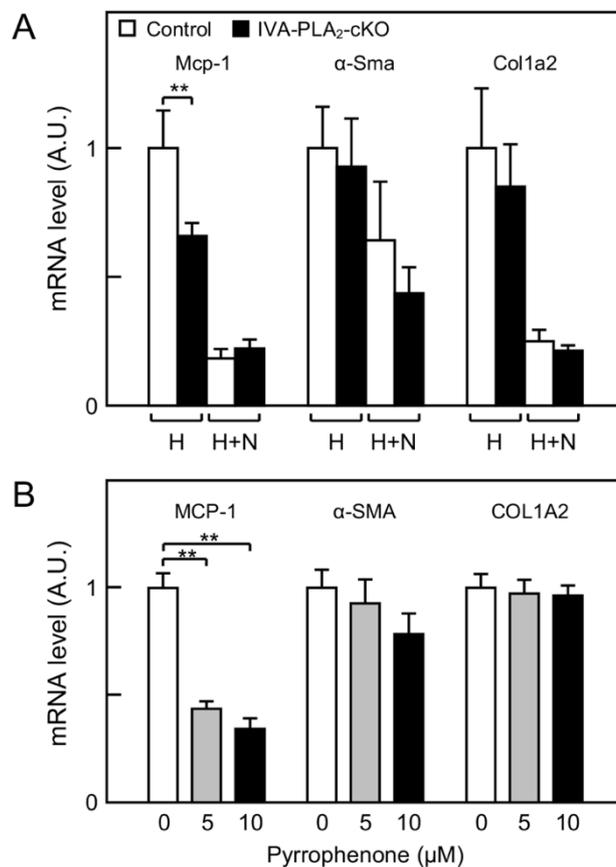


Figure 2-5. Effects of an HSC-specific IVA-PLA₂ deficiency and pyrrophenone on the mRNA expression of fibrosis-related genes.

The mRNA levels of Mcp-1 (MCP-1), α -Sma (α -SMA), and Col1a2 (COL1A2) in livers of HSC-specific IVA-PLA₂-cKO and control mice (A) and in TWNT-1 treated with pyrrophenone (5 or 10 μ M) or its vehicle for 24 h (B) were determined by qPCR. The expression was normalized to that of ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (Rplp0, RPLP0) mRNA (Arbitrary units: A.U.). H: CDAHFD 9 weeks; H+N: CDAHFD 9 weeks + ND 5 weeks. **P < 0.01. The numbers of the cKO mice and its control mice on a CDAHFD for 9 weeks (on a CDAHFD for 9 weeks and an ND) were n=4 (n=8) and n=5 (n=10), respectively (A). The numbers of samples were stated as below: vehicle: n=8, 5 μ M pyrrophenone: n=4, and 10 μ M pyrrophenone: n=3 (B).

Ozaki et al., *Biological and Pharmaceutical Bulletin* (in press) Figure 4.

Table 2-3. Exact F and t values for all statistical analysis in each experiment.

Figure		Statistical analysis	F or t value
Figure 2-1B		LSD post-hoc test	$F_{(2, 12)}=5.74$
Figure 2-1C		LSD post-hoc test	$F_{(2, 12)}=153.49$
Figure 2-2B		LSD post-hoc test	$F_{(3, 45)}=3.77$
Figure 2-3B		LSD post-hoc test	$F_{(3, 69)}=8.39$
Table 2-2	Body weight	LSD post-hoc test	$F_{(5, 135)}=7.57$
	Liver weight		$F_{(5, 135)}=14.26$
	AST		$F_{(5, 135)}=9.48$
	ALT		$F_{(5, 135)}=109.47$
Figure 2-5A	Mcp-1	LSD post-hoc test	$F_{(3, 69)}=34.90$
	α -Sma		$F_{(3, 69)}=2.53$
	Col1a2		$F_{(3, 69)}=14.81$
Figure 2-5B	MCP-1	LSD post-hoc test	$F_{(2, 24)}=28.59$
	α -SMA		$F_{(2, 24)}=0.81$
	COL1A2		$F_{(2, 24)}=0.11$

2-4. 考察

本章では、CDAHFD 摂取による NASH の病態形成後に高脂肪食の影響を除く目的で普通食へと切り替えた実験条件下において、肝星細胞（コラーゲン産生細胞）選択的な IVA-PLA₂ の欠損が肝線維化に及ぼす影響を解析し、食餌療法下での肝星細胞の IVA-PLA₂ の治療標的としての可能性を検証した。肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスおよび対照マウスに CDAHFD を 9 週間摂食させたところ、著しい脂肪肝や肝障害および白血球の浸潤を伴う肝線維化を誘発した (Figures 2-3, 2-4, Table 2-2)。その後、食餌療法を想定し、普通食に切り替えて 5 週間摂食させたところ、両遺伝子型マウスとも肝障害や脂肪滴は劇的に軽減したが、対照マウスでの肝線維化の程度は約 2 倍に増大し、CDAHFD 投与下にみられた白血球の浸潤はほとんど抑制されていなかった。しかしながら、普通食に切り替え後の肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは、肝線維化の程度の増加は 1.3 倍程度であり、食餌療法の前後で肝線維の蓄積に有意な差はなく、白血球の浸潤は有意に抑制されていた (Figures 2-3, 2-4)。このように、CDAHFD から普通食に切り替えた条件下での結果から、肝星細胞の IVA-PLA₂ は白血球浸潤や肝線維化に促進的な関与を示唆している。

CDAHFD を 9 週間摂取させた NASH 進展モデルにおいて、肝星細胞での IVA-PLA₂ の欠損は、肝線維化の進展にほとんど影響を及ぼさなかった (Figure 2-3)。これは、CDAHFD 摂取下に、肝星細胞の IVA-PLA₂ の欠損が炎症反応における白血球浸潤 (Figure 2-4)、肝星細胞の活性化の指標である α -Sma と *Colla2* の mRNA 発現量 (Figure 2-5) にほとんど影響しなかった結果と一致する。これらの結果は、NASH 初期モデルにおいても、CDAHFD により誘発される肝線維化 (Figures 1-3E, J, 2-2) および α -SMA タンパク質の発現亢進 (Figure 1-4E, J) に対して肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による影響がみられなかったことと矛盾はない。

対照マウスでは、CDAHFD から ND に切り替えると *Colla2* の mRNA 発現量は劇的に減少したが (Figure 2-5A)、肝線維化はむしろ悪化した (Figures 2-2, 2-3)。野生型マウスにおいても、高脂肪食から普通食に戻した後に肝線維化の悪化が観察されている (Figure 2-1) (60)。これらの結果は、食餌療法中に活性化肝星細胞のコラーゲン線維の産生能が軽減したとしても、本実験条件では肝線維化が改善されないことを示唆している。しかしながら、本章において、肝星細胞の IVA-PLA₂ の欠損により、CDAHFD から ND に切り替えた後にみられる肝線維化の進展が軽減されたことから (Figure 2-3)、肝星細胞の IVA-PLA₂ の阻害と食餌療法の組み合わせにより、NASH の病態進展が協調的に抑制される可能性が示唆された。このことを換言すれば、本章での結果は、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損による肝線維化抑制作用は、CDAHFD 摂取中は隠れているが、ND に切り替えた後に初めて表出することを示している。これに反して、肝星細胞での IVA-PLA₂ の欠損は、CDAHFD による脂肪肝の形成および ND に戻した際の脂肪滴の消失には影響を及ぼさなかったが (Figure 2-3A)、このことは、脂肪肝の治療には食餌療法だけで十分であることを意味している。これらのことを踏まえると、肝星細胞における IVA-PLA₂ の阻害は、NASH における食餌療法中の脂肪肝の治療には不要であるが、肝線維化の予防的治療には必要であることが示唆される。

高脂肪食から普通食へと切り替えた条件下にみられた肝線維化の悪化が、肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスにおいて軽減された機序に関して検討するなかで、CDAHFD 摂取下の肝臓での白血球の浸潤、 α -Sma および *Colla2* の mRNA 発現、および、線維化に対して、肝星

細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損はほとんど影響しなかったが、*Mcp-1* の mRNA 発現が肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損により抑制されることが判明した (Figure 2-5)。MCP-1 は、浸潤マクロファージ/常在クッパー細胞および活性化肝星細胞において生成される炎症性ケモカインであり、単球の浸潤と肝星細胞の活性化を促進し、肝線維化の進展に参与している (61, 62)。このような肝線維化における MCP-1 の促進的役割を考慮すると、高脂肪食下での MCP-1 の発現が肝星細胞選択的な IVA-PLA₂ の欠損により既に抑制されていたことが、食餌療法下での白血球の浸潤を伴う肝線維化に対する軽減効果をもたらしたと推察される。また、本章での結果は、活性化肝星細胞における MCP-1 の発現に IVA-PLA₂ が関与することも示唆しており、このことは、活性化ヒト肝星細胞株である TWNT-1 での MCP-1 の mRNA 発現が IVA-PLA₂ 特異的阻害剤である pyrrophenone により抑制された結果 (Figure 2-5B) から支持される。さらに、ヒト肝星細胞において、TNF- α や IL-1 α での刺激による MCP-1 遺伝子の発現がシクロオキシゲナーゼ-2 の選択的阻害剤により抑制されることから (63)、本章における CDAHFD 摂取下での IVA-PLA₂ を介した MCP-1 の発現亢進は、アラキドン酸由来の脂質メディエーターである PG の作用によって担われていると推察される。

ラット肝星細胞において、TGF- β 1 刺激下での α -SMA の発現が IVA-PLA₂ の阻害剤であるアラキドニルトリフルオロメチルケトンにより抑制されることが報告されており (30)、肝星細胞の IVA-PLA₂ が細胞の活性化に参与していることが示唆されている。このことは、本章での肝星細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスおよび IVA-PLA₂ 特異的阻害剤で処理した活性化ヒト肝星細胞株 TWNT-1 における α -SMA の mRNA 発現が対照に比し抑制傾向にあったこと (Figure 2-5) に一致している。IVA-PLA₂ は PG などの炎症性の脂質メディエーター生成の初発反応を担う主要酵素であり (16)、PGE₂ および PGI₂ がヒト肝星細胞株における TGF- β 1 の発現を誘導することが示されていることから (37)、TGF- β 1 の刺激を受けた肝星細胞は、IVA-PLA₂ を初発としたアラキドン酸カスケードにより生成された PG を介して活性化するとともに、その PG が他の肝星細胞の活性化を増幅的に誘起していくと思われる。さらに、最近の前向きコホート研究において、非アルコール性脂肪肝疾患の患者において、アスピリンの日常的な使用が進行した肝線維化の進展リスクの軽減に参与することが示唆されている (64)。しかしながら、アスピリンの常用に関しては、胃粘膜障害や腎機能の低下などの副作用を招くリスクが考えられる。さらには、PG は肝星細胞の活性化や肝線維化に対して促進作用と抑制作用を併せ持つため (56, 57)、すべての肝構成細胞の IVA-PLA₂ を阻害することで PG 生成を抑制するよりも、IVA-PLA₂ を介した肝線維化進展の責任細胞を特定し、この細胞種選択的に IVA-PLA₂ 活性を阻害することは、肝線維化の治療に有益であると考えられる。

本章では、肝星細胞の IVA-PLA₂ を阻害することにより、高脂肪食誘発性の肝炎および線維化に対する食餌療法の効果を向上させる可能性を提示したが、この新たな薬物療法の観点は、NASH における肝線維化の予防治療にも繋がると考えている。肝星細胞に選択的に薬物を送達する方法として、ビタミン A を修飾したナノ粒子が報告されている (65)。また、パルミチン酸を処理した肝実質細胞が、活性化肝星細胞に選択的に取り込まれるエクソソームを放出することが報告されており、このエクソソームを利用した活性化肝星細胞選択的な DDS の開発も試みられている (66)。今後、このようなシステムを IVA-PLA₂ 阻害剤に付加することで、活性化肝星細胞の IVA-PLA₂ を標的とした、肝線維化の薬物治療の実現が期待される。

総括

本研究では、NASH 線維症に対する IVA-PLA₂ を標的とした副作用の少ない効果的な新規薬物療法の確立を目的とし、細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスを用いて、NASH での肝線維化における各種肝構成細胞に発現する本酵素の関与を検証した。第 1 章では、IVA-PLA₂ を介した NASH の進展を担う責任細胞種を特定し、第 2 章では、食餌療法を想定した実験系にて肝星細胞の IVA-PLA₂ の肝線維化への関与について検証した。これらの検討結果から以下の知見が得られた。

1. CDAHFD 誘発性の肝星細胞の活性化および肝線維化は、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは有意に低減していたが、他の細胞種選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスではこのような抑制効果はみられなかった。さらに、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA₂ 欠損マウスでは、CDAHFD により誘発される類洞内皮細胞の毛細血管化がみられなかった。したがって、内皮細胞/類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ は、類洞内皮細胞の毛細血管化および肝星細胞の活性化を亢進し、肝線維化を促進することが示された。
2. CDAHFD から ND に切り替えた条件下での結果から、肝星細胞の IVA-PLA₂ は白血球浸潤や肝線維化に促進的に関与することが判明し、おそらく肝星細胞由来の MCP-1 に応答した単球の浸潤がそのメカニズムの一端を担うことが示唆された。

以上、本研究においては、IVA-PLA₂ を介した NASH での肝線維化を進展させる責任細胞種は内皮細胞/類洞内皮細胞であることが示され、さらには、食餌療法下に肝星細胞の IVA-PLA₂ は MCP-1 の発現を介して白血球の浸潤に関与し、肝線維化を促進することが明らかになった (図 2)。本研究での成果からは、第 1 章での短期の CDAHFD 摂取下においては、類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ が肝線維化の治療標的として考えられ、また、第 2 章での長期の CDAHFD 投与から通常食に切り替えた食餌療法下では、肝星細胞の IVA-PLA₂ が治療標的として考えられるが、実際の治療においては、食餌療法が適応されることを踏まえると、少なくとも肝星細胞の IVA-PLA₂ の選択的な阻害は有望な治療方針となると思われる。現時点では、長期の CDAHFD 摂取下の線維化、および、その後の食餌療法下における肝線維化に対して、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的な IVA-PLA₂ の欠損がどのような影響を及ぼすかは不明であるが、短期の CDAHFD 摂取下での結果を踏まえると、同欠損はおそらく長期の CDAHFD 摂取下での肝線維化に対して、ある程度は抑制効果を示すかもしれない。それゆえ、類洞内皮細胞の IVA-PLA₂ の選択的な阻害のみでは、食餌療法後の肝線維化に対しては無効であったとしても、肝星細胞の IVA-PLA₂ の阻害と併せることが、食餌療法実施後の肝線維化の治療には有効であると考えられる。NASH での線維症に有効な薬物療法は確立されていないが、本研究成果は、食餌運動療法と併せて類洞内皮細胞と肝星細胞の IVA-PLA₂ を選択的に阻害することが、副作用の発現リスクを抑えた、効果的な線維症の治療に繋がる可能性を示唆しており、NASH の薬物療法の実現化に貢献すると考えられる。

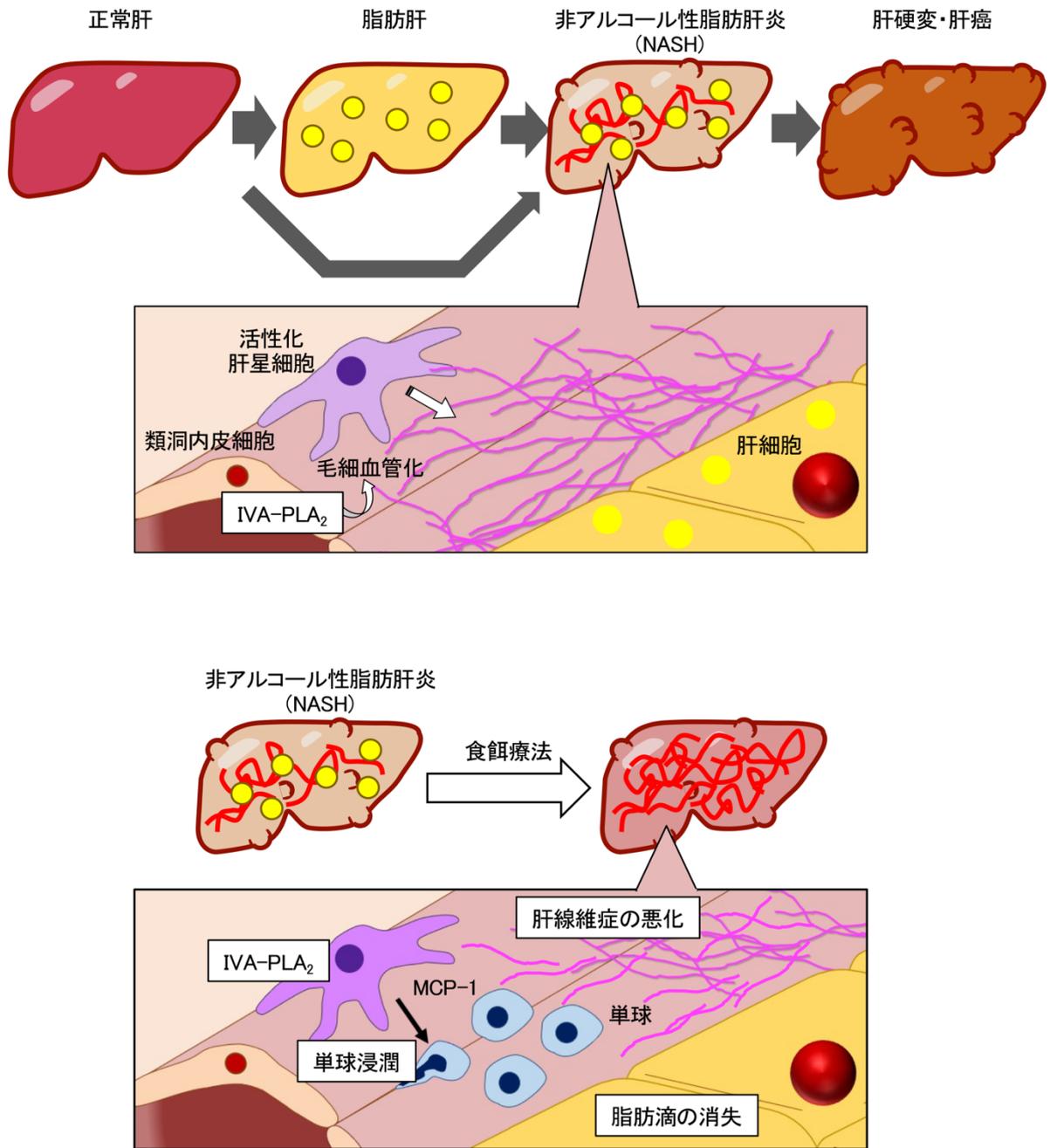


図 2. 類洞内皮細胞および肝星細胞の IVA-PLA₂ を介した肝線維化への関与

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇情なる有益なご助言ならびに丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生化学分野の秋葉聡教授に深謝致します。

本論文の作成にあたり、貴重なご助言とご高閲を賜りました京都薬科大学臨床薬理学分野の中田徹男教授ならびに京都薬科大学衛生化学分野の長澤一樹教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に関し、実験のご協力および数々のご助言、ご指導を賜りました京都薬科大学病態生化学分野の石原慶一准教授に謹んで深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に関し、終始懇切丁寧なご指導ならびに激励を賜りました京都薬科大学病態生化学分野の河下映里助教に心から深く感謝の意を表します。

本研究の実験系の確立に多大なご尽力を頂きました京都薬科大学病態生化学分野の金井志帆助手に誠に感謝申し上げます。そして、京都薬科大学病態生化学分野および同卒業生の諸氏、特に実験にご協力頂いた柏田千紘氏、長尾美奈氏、野本真斗香氏、加納菜瑠実氏、村岡理沙子氏、米岡那夏子氏、奥村綾茄氏、親川奈未氏、松代美礼氏、水野朱子氏、今田百南氏、種草大貴氏、中本彩奈氏、田中沙耶氏、谷本菜実樹氏、保田史織氏、木村徹也氏、小谷亜衣氏、福田真弓氏、山本実伶奈氏、溝田歩美氏、岸中彩希氏に深くお礼申し上げます。

また、末筆ながら、大学院生活を送るにあたり、ご指導、ご鞭撻、激励をいただきました先生方、他分野の大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念致します。

最後に、4年間の長きにわたり陰ながら生活面・精神面ならびに健康面で温かく支えていただきました家族に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Cheng Peng, Alastair G Stewart, Owen L Woodman, Rebecca H Ritchie, Cheng Xue Qin. Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Review of Its Mechanism, Models and Medical Treatments. *Front. Pharmacol.* **2020**, 11.
2. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Torres-Gonzalez A, Gra-Oramas B, Gonzalez-Fabian L, Friedman SL, Diago M, Romero-Gomez M. Weight loss through lifestyle modification significantly reduces features of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* **2015**, 149, 367-378.
3. Zobair M Younossi, Aaron B Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, Mark Wymer. *Hepatology*. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. **2016**, 64, 73-74.
4. Masahide Hamaguchi, Noriyuki Takeda, Takao Kojima, Akihiro Ohbora, Takahiro Kato, Hiroshi Sarui, Michiaki Fukui, Chisato Nagata, Jun Takeda . Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* **2012**, 18, 1508-1516.
5. Yuichiro Eguchi, Hideyuki Hyogo, Masafumi Ono, Toshihiko Mizuta, Naofumi Ono, Kazuma Fujimoto, Kazuaki Chayama, Toshiji Saibara. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol.* **2012**, 47, 86-95.
6. Christi A Matteoni, Zobair M Younossi, Terry Gramlich, Navdeep Boparai, Yao C Liu, Arthur J McCullough. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology.* **1999**, 116, 1413-14139.
7. Elizabeth M Brunt, Christine G Janney, Adrian M Di Bisceglie, Brent A Neuschwander-Tetri, Bruce R Bacon. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Gastroenterology.* **1999**, 94, 2467-2474.
8. Christopher D Williams, Joel Stengel, Michael I Asike, Dawn M Torres, Janet Shaw, Maricela Contreras, Cristy L Landt, Stephen A Harrison. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* **2011**, 140, 124-131.
9. Vernon G, Baranova A, Zobair M Younossi. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* **2011**, 34, 274-285.
10. Christophe Cassinotto, Jérôme Boursier, Victor de Lédinghen, Jérôme Lebigot, Bruno Lapuyade, Paul Cales, Jean-Baptiste Hiriart, Sophie Michalak, Brigitte Le Bail, Victoire Cartier, Amaury Mouries, Frédéric Oberti, Isabelle Fouchard-Hubert, Julien Vergniol, Christophe Aubé. Liver stiffness in nonalcoholic fatty liver disease: A comparison of supersonic shear imaging, FibroScan, and ARFI with liver biopsy. *Hepatology.* **2016**, 63, 1817-1827.
11. Angulo Paul, Kleiner E David, Sanne Dam-Larsen, Adams A Leon, Bjornsson S Einar, Charatcharoenwithaya Phunchai, Mills R Peter, Keach C Jill, Lafferty D Heather, Stahler Alisha, Haflidadottir Svanhildur, Bendtsen Flemming. Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology.* **2015**, 149, 389-397.

12. Fabio Marra, Frank Tacke. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology*. **2014**. 147, 577-594.
13. Elena Buzzetti, Massimo Pinzani, Emmanuel A Tsochatzis. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, **2016**. 65, 1038-1048.
14. Naga Chalasani, Zobair Younossi, Joel E Lavine, Michael Charlton, Kenneth Cusi, Mary Rinella, Stephen A Harrison, Elizabeth M Brunt, Arun J Sanyal. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. **2018**. 67, 328-357.
15. Xu Hao, Wang Lin. The Role of Notch Signaling Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*. **2021**, 8, 792667.
16. Makoto Murakami. Lipoquality control by phospholipase A₂ enzymes. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2017**, 93, 677-702.
17. Varnavas D Mouchlis, Yuan Chen, J Andrew McCammon, and Edward A Dennis. Membrane allostery and unique hydrophobic sites promote enzyme substrate specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 3285-3291.
18. Janin Henkel, Charles Dominic Coleman, Anne Schraplau, Korinna Jöhrens, Thomas Siegfried Weiss, Wenke Jonas, Annette Schürmann, Gerhard Paul Püschel. Augmented liver inflammation in a microsomal prostaglandin E synthase 1 (mPGES-1)-deficient diet-induced mouse NASH model. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 16127.
19. Nobuyuki Enomoto, Kenichi Ikejima, Shunhei Yamashina, Ayako Enomoto, Teruhiro Nishiura, Tetsuro Nishimura, David A Brenner, Peter Schemmer, Blair U Bradford, Chantal A Rivera, Zhi Zhong, and Ronald G Thurman. Kupffer cell-derived prostaglandin E₂ is involved in alcohol-induced fat accumulation in rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**, 279, G100-6.
20. Han Myoung Sook, Park Sun Young, Shinzawa Koei, Kim Sunshin, Chung Kun Wook, Lee Ji-Hyun, Kwon Choon Hyuck, Lee Kwang-Woong, LeeJoon-Hyoek, Park Cheol Keun, Chung Woo Jin, Hwang Jae Seok, Yan Ji-Jing, Song Dong-Keun, Tsujimoto Yoshihide, Lee Myung-Shik. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. *J. Lipid Res.* **2008**, 49, 84-97
21. Keisuke Kakisaka, Sophie C. Cazanave, Christian D. Fingas, Maria E. Guicciardi, Steven F. Bronk, Nathan W. Werneburg, Justin L. Mott, and Gregory J. Gores. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2012**, 302, G77-84
22. Hitoshi Ikeda, Yutaka Yatomi, Mikio Yanase, Hiroaki Satoh, Ayako Nishihara, Masahiro Kawabata, Kenji Fujiwara. Effects of Lysophosphatidic Acid on Proliferation of Stellate Cells and Hepatocytes in Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 248, 436-440.
23. Keiichi Ishihara, Akira Miyazaki, Takeshi Nabe, Hideaki Fushimi, Nao Iriyama, Shiho Kanai, Takashi Sato, Naonori Uozumi, Takao Shimizu, Satoshi Akiba. Group IVA phospholipase A₂ participates in the progression of hepatic fibrosis. *FASEB J.* **2012**, 26, 4111-4121.
24. Shiho Kanai, Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Toshiyuki Tomoo, Kazuhiro Nagahira, Yasuhiro Hayashi, Satoshi Akiba. ASB14780, an orally active inhibitor of group IVA phospholipase A₂, is a pharmacotherapeutic candidate for nonalcoholic fatty liver disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2016**, 356, 604-614.

25. John Willy Haukeland, Jan Kristian Damås, Zbigniew Konopski, Else Marit Løberg, Terese Haaland, Ingeborg Goverud, Peter A Torjesen, Kåre Birkeland, Kristian Bjøro, Pål Aukrust. Systemic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J. Hepatol.* **2006**, 44, 1167-1174.
26. Masashi Miyao, Hirokazu Kotani, Tokiko Ishida, Chihiro Kawai, Sho Manabe, Hitoshi Abiru, Keiji Tamaki. Pivotal role of liver sinusoidal endothelial cells in NAFLD/NASH progression. *Lab. Investig.* **2015**, 95, 1130-1144.
27. Takaaki Higashi, Scott L Friedman, Yujin Hoshida. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 121, 27-42.
28. Samar H Ibrahim, Petra Hirsova, Gregory J Gores. Non-alcoholic steatohepatitis pathogenesis: sublethal hepatocyte injury as a driver of liver inflammation. *Gut.* **2018**, 67, 963-972.
29. Robert F Schwabe, Ira Tabas, Utpal B Pajvani. Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* **2020**, 158, 1913-1928.
30. Liena Zhao, Chandrashekhar R Gandhi, Zu-hua Gao. Involvement of cytosolic phospholipase A₂ alpha signalling pathway in spontaneous and transforming growth factor-beta-induced activation of rat hepatic stellate cells. *Liver Int.* **2011**, 31, 1565-1573.
31. Naonori Uozumi, Kazuhiko Kume, Takahide Nagase, Noriaki Nakatani, Satoshi Ishii, Fumi Tashiro, Yoshinori Komagata, Kazushige Maki, Koichi Ikuta, Yasuyoshi Ouchi, Jun-ichi Miyazaki, Takao Shimizu Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature.* **1997**, 390, 618-622.
32. M Guido, M Ruge, G Leandro, I M Fiel, S N Thung. Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts. *Hepatology.* **1997**, 26, 310-314.
33. Karen Kristine Sørensen, Jaione Simon-Santamaria, Robert S. McCuskey, Bård Smedsrød. Liver sinusoidal endothelial cells. *Compr. Physiol.* **2015**, 5, 1751-1774.
34. Laurie D. DeLeve, Xiangdong Wang, Yumei Guo. Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology.* **2008**, 48, 920-930.
35. Adel Hammoutene, Pierre-Emmanuel Rautou. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2019**, 70, 1278-1291.
36. Edyta Kus, Patrycja Kaczara, Izabela Czyzyska-Cichon, Karolina Szafranska, Bartłomiej Zapotoczny, Agnieszka Kij, Agnieszka Sowinska, Jerzy Kotlinowski, Lukasz Mateuszuk, Elzbieta Czarnowska, Marek Szymonski, Stefan Chlopicki. LSEC fenestrae are preserved despite pro-inflammatory phenotype of liver sinusoidal endothelial cells in mice on high fat diet. *Front. Physiol.* **2019**, 10, 6.
37. Sui Guode, Cheng Guanga, Yuan Junjuna, Hou Xuenaa, Kong Xiaochena, Niu Haitao. Interleukin (IL)-13, prostaglandin E₂ (PGE₂), and prostacyclin 2 (PGI₂) activate hepatic stellate cells via protein kinase C (PKC) pathway in hepatic fibrosis. *Med. Sci.* **2018**, 24, 2134-2141.
38. Tomoko Fujita, Kitipong Soontrapa, Yoshiya Ito, Keiko Iwaisako, Catharina Sagita Moniaga, Masataka Asagiri, Masataka Majima, Shuh Narumiya. Hepatic stellate cells relay inflammation signaling from sinusoids to parenchyma in mouse models of immune-mediated hepatitis. *Hepatology.* **2016**, 63, 1325-1339.

39. Concetta Gardi, Beatrice Arezzini, Barbara Monaco, Maria Graziella De Montis, Daniela Vecchio, Mario Comporti. F₂-isoprostane receptors on hepatic stellate cells. *Lab. Investig.* **2016**, 63, 1325-1339.
40. Masahiko Matsumoto, Natsuko Hada, Yoshiyuki Sakamaki, Akiko Uno, Toshihiko Shiga, Chiaki Tanaka, Tsuneo Ito, Asao Katsume, Masayuki Sudoh. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int. J. Exp. Pathol.* **2013**, 94, 93-103.
41. Zhangxiao Penga, Yanxin Chang, Jianhui Fan, Weidan Jia, Changqing Su. Phospholipase A₂ superfamily in cancer. *Cancer Lett.* **2021**, 497, 165-177.
42. Hui Fu, Yuchao He, Lisha Qi, Lu Chen, Yi Luo, Liwei Chen, Yongmei Lie, Ning Zhang, Hua Guo. cPLA₂ α activates PI3K/AKT and inhibits Smad2/3 during epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* **2017**, 403, 260-270.
43. Sepideh Mirzaei, Ali Zarrabi, Farid Hashemi, Amirhossein Zabolian, Hossein Saleki, Adnan Ranjbar, Seyed Hesam Seyed Salehn, Morteza Bagherian, Seyed omid Sharifzadehd, Kiavash Hushmandi, Alena Liskova, Peter Kubatka, Pooyan Makvandi, Vinay Tergaonkar, Alan Prem Kumar, Milad Ashrafizadeh, Gautam Sethikm. Regulation of nuclear factor-kappaB (NF- κ B) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: inhibiting or promoting carcinogenesis? *Cancer Lett.* **2021**, 509, 63-80.
44. Xiangli Zhao, Ronghan Liu, Yuehong Chen, Aubryanna Hettinghouse, Chuanju Liu. Cytosolic phospholipase A₂ α has a crucial role in the pathogenesis of DSS-induced colitis in mice. *Eur. J. Immunol.* **2016**, 46, 400-408.
45. Nicholas J Hunt, Peter A G McCourt, David G Le Couteur, Victoria C Cogger. Novel targets for delaying aging: The importance of the liver and advances in drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, 135, 39-49.
46. Nicholas J Hunt, Glen P Lockwood, Frank H Le Couteur, Peter A G McCourt, Nidhi Singla, Sun Woo Sophie Kang, Andrew Burgess, Zdenka Kuncic, David G. Le Couteur, Victoria C. Cogger. Rapid intestinal uptake and targeted delivery to the liver endothelium using orally administered silver sulfide quantum dots. *ACS Nano.* **2020**. 14, 1492-1507.
47. Elena Buzzetti, Massimo Pinzani, Emmanuel A Tsochatzis. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, **2016**, 65, 1038-1048.
48. Elizabeth E Powell, Vincent Wai-Sun Wong, Mary Rinella. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet.* **2021**, 397, 2212-2224.
49. Man Wang, Lei Li, Yannan Xu, Juan Du, Changquan Ling. Roles of hepatic stellate cells in NAFLD: from the perspective of inflammation and fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2022**, 13, 958428.
50. Natascha Roehle, Emilie Crouchet, Thomas F Baumert. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells.* **2020**, 9, 875.
51. Kathleen Viveiros. The role of life style modifications in comprehensive non-alcoholic fatty liver disease treatment. *Clin. Liver Dis.* **2021**, 17, 11-14.
52. Veera Houttu, Sunsanne Csade, Max Nieuwdor, Asriaan G Holleboom, Ursula Schwab. Dietary interventions in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Front. Nutr.* **2021**, 8, 716783.
53. Grant J Herrington, Joshua J Peterson, Linhai Cheng, Benjamin M Allington, Renato D Jensen, Heather S Healy, Marcelo L G Correia. The use of very low-calorie diets in subjects with

- obesity complicated with nonalcoholic fatty liver disease: a scoping review. *Obes. Sci. Pract.* **2022**, 8, 510-524.
54. Takaaki Higashi, Scott L Friedman, Yujin Hoshida. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, 121, 27-42.
 55. Bedair Dewidar, Christoph Meyer, Steven Dooley, And Nadja Meindl-Beinker. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated *Cells.* **2019**, 8, 1419.
 56. Weixuan Wang, Xin Zhong, Jiao Guo. Role of 2-series prostaglandins in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease (Review). *Int. J. Mol. Med.* **2021**, 47, 114.
 57. Anshuli Razdan, Nathan M Main, Vincent Chiu, Nicholas A Shackel, Paul de Souza, Katherine Bryant, Kieran F Scott. Targeting the eicosanoid pathway in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, 11, 2456-2476.
 58. Eri Kawashita, Keiichi Ishihara, Madoka Nomoto, Mika Taniguchi, Satoshi Akiba. A comparative analysis of hepatic pathological phenotypes in C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains in non-alcoholic steatohepatitis models. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 204.
 59. Takashi Ono, Katsutoshi Yamada, Yukiko Chikazawa, Masahiko Ueno, Shozo Nakamoto, Takayuki Okuno, Kaoru Seno. Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A_{2 α} , pyrrophenone. *Biochem. J.* **2002**, 363, 727-735.
 60. Hiroko Itagaki, Kazuhiko Shimizu, Shunichi Morikawa, Kenji Ogawa, Taichi Ezaki. Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2013**, 6, 2683-2696.
 61. Sheng Cao, Mengfei Liu, Tejasav S Sehrawat, Vijay H Shah. Regulation and functional roles of chemokines in liver diseases. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 18, 630-647 (2021).
 62. Takefumi Kimura, Simran Singh, Naoki Tanaka, Takeji Umemura. Role of G protein-coupled receptors in hepatic stellate cells and approaches to anti-fibrotic treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Front. Endocrinol.* **2021**, 12, 773432.
 63. Eva Efsen, Andrea Bonacchi, Sabrina Pastacaldi, Anthony J Valente, Ulrich O Wenzel, Cristina Tosti-Guerra, Massimo Pinzani, Giacomo Laffi, Hanna E Abboud, Paolo Gentilini, And Fabio Marra. Agonist-specific regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression by cyclooxygenase metabolites in hepatic stellate cells. *Hepatology.* **2001**, 33, 713-721.
 64. Tracey G Simon, Jacqueline Henson, Stephanie Osganian, Ricard Masia, Andrew T Chan, Raymond T. Chung. Kathleen E. Corey. Daily aspirin use associated with reduced risk for fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, 17, 2776-2784.e4.
 65. Naoyuki Toriyabe, Yu Sakurai, Akari Kato, Shoshiro Yamamoto, Kota Tange, Yuta Nakai, Hidetaka Akita, Hideyoshi Harahsima. The Delivery of Small Interfering RNA to Hepatic Stellate Cells Using a Lipid Nanoparticle Composed of a Vitamin A-Scaffold Lipid-Like Material. *J. Pharm. Sci.* **2017**, 106, 8, 2046-2052.
 66. Momoka Yamaguchi, Takanori Kanazawa, Sumire Morino, Shingo Iioka, Yuta Watanabe, Naoki Dohi, Kenjiro Higashi, Hiromu Kondo, Tomohisa Ishikawa. Increased Tropism of Extracellular Vesicles Derived from Palmitic Acid-Treated Hepatocytes to Activated Hepatic Stellate Cells. *Membranes.* **2022**, 12, 10.