

非アルコール性脂肪性肝炎の進展機構への
IVA 型ホスホリパーゼ A₂ の関与とその新規阻害剤の進展阻止効果

2016 年
金井 志帆

本論文は、以下の報告の内容を総括したものである。

- 1) Keiichi Ishihara, Akira Miyazaki, Takeshi Nabe, Hideaki Fushimi, Nao Iriyama, Shiho Kanai, Takashi Sato, Naonori Uozumi, Takao Shimizu, and Satoshi Akiba : Group IVA phospholipase A₂ participates in the progression of hepatic fibrosis. *FASEB J.*, 26, 4111-4121 (2012) [第 1 章]
- 2) Shiho Kanai, Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Toshiyuki Tomoo, Kazuhiro Nagahira, Yasuhiro Hayashi, and Satoshi Akiba : ASB14780, an orally active inhibitor of group IVA phospholipase A₂, is a pharmacotherapeutic candidate for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 356, 604-614 (2016) [第 2 章]
- 3) Keiichi Ishihara, Shiho Kanai, Kikuko Tanaka, Eri Kawashita, and Satoshi Akiba : Group IVA phospholipase A₂ deficiency prevents CCl₄-induced hepatic cell death through the enhancement of autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 471, 15-20 (2016) [第 3 章]

【目次】

序論1
第1章 NASH モデルマウスにおける IVA-PLA ₂ を介した肝線維化形成機構	
第1節 諸言3
第2節 材料および方法4
1. 脂肪肝モデルマウス	
2. 比較プロテオーム解析	
3. 組織学的解析	
4. 慢性的 CCl ₄ 投与による肝線維化モデルの作製	
5. 総 RNA の抽出および半定量 RT-PCR または定量 RT-PCR による mRNA 発現量解析	
6. ウェスタンブロット解析	
7. 免疫組織染色	
8. 肝組織中のヒドロキシプロリン含有量の測定	
9. 肝組織中のリンパ球の単離と免疫染色とフローサイトメトリー解析	
第3節 結果9
1. IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおいて HFCD 誘発性 NASH に対して抑制的に関与するタンパク質の同定	
2. IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおける HFCD 摂取誘発性の肝線維化形成の抑制	
3. IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおける CCl ₄ 長期投与誘発性の肝線維化形成の抑制	
4. IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおける CCl ₄ 投与誘発性の肝星細胞活性化の抑制	
5. IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおける CCl ₄ 誘発性のマクロファージの浸潤の抑制	
6. IVA-PLA ₂ 欠損における CD8 陽性 T 細胞およびナチュラルキラー細胞の浸潤に対する影響	
第4節 考察21
第2章 新規 IVA-PLA ₂ 特異的阻害剤 (ASB14780) の NASH 進展阻止効果	
第1節 諸言24
第2節 材料および方法25
1. 実験動物	
2. IVA-PLA ₂ 阻害剤 (ASB14780) 懸濁液の調製	
3. CCl ₄ 誘発性肝線維化モデルマウスの作製および ASB14780 の投与	
4. HFCD 誘発性の脂肪肝モデルマウスの作製および ASB14780 の投与	
5. 血清中のバイオマーカーの測定	
6. 肝組織中の CYP2E1 活性測定	

7.	組織学的解析	
8.	免疫組織染色	
9.	ウエスタンブロット解析	
10.	総 RNA の抽出および定量 PCR による mRNA 発現量解析	
11.	肝組織における脂質含有量の測定	
12.	統計解析	
第3節	結果31
1.	ABS14780 経口投与による CCl ₄ 誘発性の慢性肝障害の抑制	
2.	ABS14780 経口投与による CCl ₄ 誘発性の肝線維化の形成抑制	
3.	ABS14780 による CCl ₄ 誘発性肝線維化における単球およびマクロファージの遊走抑制	
4.	ASB14780 による CCl ₄ 誘発性肝線維化の進展抑制	
5.	ABS14780 による HFCD 誘発性の脂肪肝の抑制	
6.	HFCD 誘発性脂肪肝形成における ABS14780 による脂質生成関連分子の mRNA 発現の阻害	
第4節	考察47
第3章	IVA-PLA ₂ 欠損下でのオートファジー増強による CCl ₄ 誘発性肝細胞死の抑制	
第1節	諸言50
第2節	材料および方法51
1.	実験動物および CCl ₄ 誘発性肝障害モデルマウスの作製	
2.	TUNEL 法によるアポトーシスの検出および免疫組織染色	
3.	マウス初代培養肝細胞の培養およびトランスフェクション	
4.	ウエスタンブロット解析	
第3節	結果55
1.	IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおける CCl ₄ 単回投与誘発性肝障害の抑制	
2.	IVA-PLA ₂ 欠損マウスにおける CCl ₄ 単回投与による脂質過酸化産物産生に対する影響	
3.	CCl ₄ 単回投与による肝実質細胞の細胞死の誘導	
4.	IVA-PLA ₂ 欠損マウスの初代培養肝細胞における恒常的オートファジーの促進	
第4節	考察61
総括	63
謝辞	65
引用文献	66

【略語】

13-HPODE: 13-hydroperoxyoctadecanoic acid
2D-PAGE: two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
5-LO: 5-lipoxygenase
ACC: acetyl-CoA carboxylase
ALT: alanine aminotransferase
ANOVA: analysis of variance
AST: aspartate aminotransferase
CCl₄: carbon tetrachloride
COX: cyclooxygenase
CPT1 α : carnitine palmitoyl-transferase 1 α
Col1a2: collagen 1a2
DGAT: diacylglycerol acyltransferase
FAS: fatty acid synthase
FFA: free fatty acid
GalN: D-galactosamine
H&E: hematoxylin and eosin
HEL: hexanoyl-lysine adduct
HFCD: high-fat cholesterol diet
HPC: hydroxypropyl cellulose
HSL: hormone-sensitive lipase
IVA-PLA₂: group IVA phospholipase A₂
KO: knockout
L-FABP: liver fatty acid binding protein
LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3B
LPS: lipopolysaccharide
MCD: methionine-choline deficient
MCP-1: monocyte chemotactic protein-1
MTP: microsomal triglyceride protein
NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease
NASH: non-alcoholic steatohepatitis
ND: normal diet
NK: natural killer
PG: prostaglandin
PPAR γ : peroxisome proliferator activated receptor γ

RANTES: regulated on activation normal T cell expressed and secreted

SCD-1: stearoyl-CoA desaturase 1

SE: standard error

SREBP1c: sterol regulatory element-binding protein 1c

TG: triglyceride

TGF- β 1: transforming growth factor- β 1

TNF- α : tumor necrosis factor- α

TZD: tiazolidinedione

VLDL: very-low-density lipoprotein

Veh: vehicle

WT: wild-type

α -SMA: smooth muscle α -actin

序論

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) は、過度の飲酒歴がないにもかかわらず脂肪肝を呈する疾患で、予後良好な単純性脂肪肝と肝硬変や肝がんへと進行する非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) に大別され、肥満や糖尿病などに伴って発症する生活習慣病のひとつである。本邦における疫学調査では、検診を受けた男性 5,811 人および女性 5,903 人のうち NAFLD と診断された者は男性で 32.2%、女性で 8.7%おり、この中でさらにメタボリックシンドロームの基準を満たす者が男性で 84.8%、女性で 86.6%いることが分かっている [1]。また、米国の 90 万人を 16 年間追跡した前向き調査では、BMI (body mass index) 35 以上の肝がん死亡率は BMI 35 未満の者に比し男性で 4.5 倍、女性で 1.7 倍増加すると報告されている [2]。このように NAFLD は食生活の欧米化に伴い高脂肪食摂取の機会が増えた本邦においても軽視できない存在である。NASH の診断には Matteoni 分類やさらに程度を細かく分けた Brunt 分類が基準となる。Matteoni 分類では脂肪沈着と肝細胞の風船様肥大が見られる Type3 およびこの組織所見に肝線維化あるいはマロリー小体が見られる Type4 が該当する。Brunt 分類では小葉中心部の線維化が Stage1、さらに門脈の線維化が現れた状態が Stage2、門脈や中心静脈を結ぶように線維化を生じる架橋線維化状態が Stage3、肝硬変まで進行している状態が Stage4 と分類されている。本邦の NAFLD 罹患者のうち NASH が占める割合はおよそ 20%であり、200 万人ほどが NASH を罹患していると推察される。現在、NASH に対して十分なエビデンスに基づいた治療法は確立されておらず、食事・運動療法のように生活習慣を正すことが第一選択となる。しかし、Brunt 分類でいう Stage 1 や 2 のような予後良好な可逆性の線維化状態の NASH の初期段階では痛みなどの症状を伴わないため、食事・運動療法のみではコンプライアンス不良となり十分な治療効果が得られないことが多い。したがって、NASH に直接効果を示す治療薬の開発が急務であり、そのためにまず分子機構の解明が必須となる。

近年、NASH の進展のメカニズムとして“2-hit theory”が広く支持されている。2-hit theory は食事から得た遊離脂肪酸による脂肪肝の形成を 1st hit、次いで起こる酸化ストレスや脂質過酸化やサイトカインのような炎症性分子などの様々な因子による肝線維化の形成を 2nd hit とする仮説である [3]。特に酸化ストレスは種々の細胞膜を障害して炎症反応を惹起させ、肝細胞壊死や炎症性細胞の浸潤、さらにコラーゲン繊維蓄積を誘発させる。このため、抗酸化物質であるビタミン E が基礎疾患のない場合の治療薬として認められている。しかし、ビタミン E では十分な治療効果があるとは言い難いのが現状である。一方、酸化ストレスに次いで起こる炎症反応は NASH の進展において重要な役割を担う [4] ため、炎症反応を仲介する分子が NASH に対する薬物療法の候補になると推察される。

本研究では、NASH の治療標的分子として炎症反応において中心的な役割を果たす IVA 型ホスホリパーゼ A₂ (group IVA phospholipase A₂: IVA-PLA₂) に着目した。IVA-PLA₂ は細胞膜リン脂質からアラキドン酸を遊離させることで炎症反応を亢進させる酵素である。本研究ではまず IVA-PLA₂ を介した NASH の進展メカニズムを明らかにするために、IVA-PLA₂ 欠損

(knockout: KO) マウスを用いて進展に関わる分子の探索を行った。また、臨床応用を想定し、経口で阻害活性を示す新規 IVA-PLA₂ 阻害剤の ASB14780 を用いて NASH モデルマウスに対する阻害剤の有効性を検証した。さらに IVA-PLA₂ を介した NASH 発症初期の分子メカニズムを明らかにするために、IVA-PLA₂ KO マウスを用いて肝線維化形成前から生じる肝障害での IVA-PLA₂ の役割について検証した。

第1章 NASH モデルマウスにおける IVA-PLA₂ を介した肝線維化形成機構

第1節 緒言

NASH に関する研究では、メチオニンコリン欠乏 (methionine-choline deficient: MCD) 食や高脂肪 (high-fat: HF) 食をげっ歯類に摂取させた食餌誘発性 NASH モデルが広く用いられる [9-11]。MCD 食を摂取したげっ歯類の肝臓では、摂取後すぐに炎症反応が起こり線維化へと進展する肝脂肪変性が生じる [11,12]。このモデルは短期間で NASH モデルを作製できるため NASH の研究に頻繁に使用される。しかし、MCD 食摂取マウスでは、ヒトの NASH 罹患者やげっ歯類を用いた他の食餌誘発性 NASH モデルとは異なり、インスリン抵抗性を伴わずに体重が減少する [13,14]。一方、HF 食も MCD 食と同様にげっ歯類の脂肪変性や NASH モデルの作製に用いられており、HF 食 (71%脂肪, 11%炭水化物, 18%タンパク質) 摂取マウスの肝臓ではヒト NASH 罹患者の病態組織学的変化と類似した特徴が見られる [15]。しかし、いくつかの研究では HF 食摂取モデルは脂肪性肝炎で見られる組織学的な変化を生じないと報告している [16]。このように、HF 食摂取マウスは脂肪変性や炎症反応、線維化に関して一定の見解が得られないため、NASH モデルとして最適ではない。

当研究室では、高脂肪・高コレステロール食 (high-fat cholesterol diet: HFCD) を摂取した IVA-PLA₂ KO マウスでの顕著な脂肪肝形成抑制を報告しており [17]、これは IVA-PLA₂ が NASH における脂肪肝形成に重要な役割を演じていることを示唆している。PLA₂ は哺乳類において 20 種類のアイソザイムが特定されている分子である。なかでも IVA-PLA₂ は、アラキドン酸カスケードの初期反応を担い、プロスタグランジン (prostaglandin: PG) やトロンボキサンといった炎症性メディエーターの産生に関わる酵素である [18]。PGE₂ はラット肝細胞への刺激やマウスへの投与により肝細胞や肝組織中のトリグリセリド (triglyceride: TG) 量を増加させ [19,20]、また PGE₂ や 15-deoxy-PGJ₂ は成熟した 3T3-L1 脂肪細胞への TG 沈着を誘導することが報告されている [21]。これらの知見から、IVA-PLA₂ は肝組織において PG 産生を介して脂肪沈着に関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では IVA-PLA₂ が関与した脂肪肝形成を介する NASH の複雑な分子機構を理解し、NASH の新しい治療戦略の開発を目指す。

NASH のような多因子疾患の分子メカニズム解析では、タンパク質発現プロファイリングが強力な手段となる。タンパク質発現プロファイリングの要となる二次元電気泳動 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: 2D-PAGE) はタンパク質を等電点および分子量で分離して数千以上に単離できるため、網羅的にサンプル間の比較や変動タンパク質の同定が可能である。そこで本研究では、HFCD 摂取の IVA-PLA₂ KO マウスの肝組織をプロテオーム解析して、野生型 (wild-type: WT) との比較により発現の異なるタンパク質の同定を試みた。

第2節 材料および方法

1.2.1. 脂肪肝モデルマウス

IVA-PLA₂ KO マウスは、C57BL/6J マウスで 15 世代、さらに C57BL/6N マウスで 8 世代の戻し交配により得た。マウスの遺伝子型は、マウスの尾からゲノム DNA を抽出し、ネオマイシンカセットが挿入された部位を PCR 法により増幅することで判別した [22]。IVA-PLA₂ KO マウスの対照は、6 週齢になる雄性の C57BL/6N マウスを用いた。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクル、1 ケージあたりの収容数を 5 匹までとし、自由摂食および自由摂飲の環境下で飼育した。脂肪肝モデルマウスは、WT 及び KO マウスに高脂肪高コレステロール飼料 (HFCD; 20%脂肪, 1.25%コレステロール) を 16 週間の自由摂食投与により作製し、対照として普通飼料 (ND; 5.3%脂肪, コレステロール不含) を同じ期間与えた。いずれのマウスも 20 時間の絶食後に解剖し、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。なお、本研究課題は京都薬科大学動物実験委員会の承認の下に行った。

1.2.2. 比較プロテオーム解析

比較プロテオーム解析は石原らの方法に従って行った [23]。-80°C で凍結保存した 0.1 g の肝組織は 0.09 g の固形尿素を含む 1 mL の Lysis buffer (8 M urea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid, 10 mM dithiothreitol, 0.2% Bio-Lyte (pH3-10); Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いてポッター型ホモジナイザーにて 10 回上下に動かし破碎した。ホモジネートした肝組織は 20,000 g、4°C で 10 分間遠心し、その上清をさらに 100,000 g、4°C で 30 分間超遠心した後、沈殿したタンパク質を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法により定量した [24]。

二次元電気泳動 (2D-PAGE) は、170 mm の pH 3-10 の IPG ストリップ (Bio-Rad Laboratories) と 12% アクリルアミドスラブゲル (160×160 mm) と Bio-Rad 社製の機械にて行った。IPG ストリップは、プロテアン IEF セル上にて 20°C で 12 時間、0.5 mg (分析用) と 1.5 mg (分離用) を含む 300 μL の Lysis buffer 中で膨潤させた。等電点電気泳動は、プロテアン IEF セル上にて 20°C で、50 V で 1 時間、1000 V で 1 時間、1500 V で 16000 Vh の条件で行った。ストリップの平衡化は、6 分間 Equilibrate buffer 1 (6 M urea, 2% SDS, 37.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 20% glycerol, 2% dithiothreitol) を用いて行い、次いで 15 分間 Equilibrate buffer 2 (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl (pH6.8), 20% glycerol, 2.5% iodoacetamide) を用いて行った。平衡化した後、ストリップ上のタンパク質は SDS-PAGE により 300 V の定圧下で分離した。

2D-PAGE 後、ゲルはフラミンゴ染色液 (Bio-Rad Laboratories) により製品の添付の方法に従って染色した。蛍光標識させたスポットは、UV トランスイルミネーターとエミッションフィルター (515-570 nm) を含む charge-coupled device (CCD)-based bioimaging system (UVP, Upland, CA, USA) により検出した。2D ゲル画像解析ソフトウェア (Proteomweaver 2-D Analysis

Software; Bio-Rad Laboratories) により、タンパク質スポットの定量化を行った。ゲル中の各スポットの強度は、すべてのスポットの強度によって補正を行った。個々のタンパク質スポットの明暗度の違いを解析し、各群間での統計学的有意差を Student t 検定にて判定した (n=5)。

2D ゲル中の個々のタンパク質の同定には CBB 染色したスポットを用いた。つまり、電気泳動後のゲルを 0.1% Coomassie brilliant blue (CBB) R250、10% methanol、0.5% acetic acid、7% methanol を含む溶液で染色後、同定したいタンパク質スポットをゲルから切り出した。ゲル片は、25 mM NH_4HCO_3 と 50% acetonitrile を含む溶液で 2 回洗浄し、遠心分離機により真空乾燥させ、25 ng/ μL trypsin を用いて 37°C で 16 時間消化した。消化によって産生したペプチド断片は 75% (v/v) acetonitrile と 1% (v/v) trifluoroacetic acid を用いてゲルから抽出し、Voyager-DE RP 型 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (PerSeptive Biosystems Inc., Framingham, MA, USA) を用いて質量分析により解析した。タンパク質は MS-Fit software (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>) を用いてペプチドマスマフィンガープリンティングにより同定した。なお、検索条件は、質量許容範囲を ± 2.0 Da、切れ残ったペプチドの数を ≤ 2 、システイン残基をカルバミドメチル-システインに修正し、ペプチドイオンを $[\text{M}+\text{H}]^+$ に設定した。

1.2.3. 組織学的解析

麻酔下のマウスの心臓から冷生理食塩水を灌流し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓の一部は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定してパラフィン包埋した。包埋した肝臓はマイクロームにより 5 μm の厚さで薄切し、この組織切片は MAS コートスライドグラス (Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan) 上に貼付した。切片は脱パラフィン後、ピクロシリウスレッド染色またはマッソントリクローム染色を標準プロトコールにより行った [25]。染色した切片は倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用い、画像を 1,360 × 1,240 pixels に設定して最大解像度で撮影した。

1.2.4. 慢性的 CCl_4 投与による肝線維化モデルの作製

肝線維化モデルは、雄性の 6-10 週齢のマウスに 4% CCl_4 を CCl_4 量として 0.31 $\mu\text{L/g}$ 体重となるように週 2 回、6 週間腹腔内に投与して作製した。対照群には、 CCl_4 の溶媒であるコーンオイル (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を同量投与した。いずれのマウスも CCl_4 最終投与の 48 時間後に解剖し、肝線維化の解析を行った。

1.2.5. 総 RNA 抽出および半定量 RT-PCR または定量 RT-PCR による mRNA 発現量解析

凍結保存した肝組織は、Isogen (Nippongene, Tokyo, Japan) 溶液中でダウンス型ホモジナイザーを用いて破砕し、添付の方法に従って総 RNA を抽出した。逆転写は、random primer および ReverTra Ace 逆転写酵素 (Toyobo, Osaka, Japan) を用い、逆転写反応溶液 20 μL 中に総 RNA が 2 μg 相当量になるように調製し、30°C で 10 分、42°C で 40 分、99°C で 5 分の条件で行

った。半定量 PCR 解析では、合成した cDNA を KOD FX DNA ポリメラーゼと Table 1-1 に示したプライマーを用いて標的部位を増幅させた。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、産物の大きさを確認した後、バンド強度を U.S. National Institutes of Health software ImageJ 1.47v (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) により定量し、これを mRNA 発現量とした。なお、各々の標的分子の mRNA は β -actin および 36B4 mRNA 量を内標準分子として用いて補正した。また、定量 RT-PCR では、合成した cDNA を SYBR Green I (Takara Bio) および Table 1-2 に示したプライマーと混和し、ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、初期変性を 95°C で 30 秒、変性を 95°C で 5 秒、アニーリング/伸長を Table 1-2 に示した温度で 34 秒、40 サイクルの 2 step PCR で反応させた。mRNA 発現量は検量線法を用いて定量し、18S ribosomal RNA 量により補正した。

1.2.6. ウェスタンブロット解析

-80°C にて凍結した肝組織からタンパク質を protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) を含む冷 RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS] 中でポッター型ホモジナイザーを用いて氷冷しながら抽出した。得られたホモジネートは 15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、タンパク質抽出液として上清を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法により定量した。37.5 μ g の肝タンパク質は、10% SDS-PAGE にて分離後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。ニトロセルロース膜は、blocking buffer [3% スキムミルクおよび 0.05% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline: TBS)(TBS-T)] と室温で 1 時間インキュベートし、次いで Can Get Signal solution 1 (TOYOBO) にて 1,000 倍希釈した IVA-PLA₂ 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、Can Get Signal solution 1 (TOYOBO) にて 500 倍希釈した cytokeratin 18 抗体 (CK18; clone C-04, Abcam, Cambridge, MA, USA) あるいは Can Get Signal solution 1 にて 5,000 倍希釈した β -actin 抗体 (Sigma-Aldrich) と 4°C で一晩反応させた。翌日、ニトロセルロース膜を TBS-T にて洗浄後、IVA-PLA₂ 抗体に対しては Can Get Signal solution 2 (TOYOBO) にて 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) と、また CK18 抗体および β -actin 抗体に対しては 0.3% スキムミルクを含む TBS-T にて 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) と室温で 1 時間反応させた。バンドの検出は、ECL-prime kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) を用いて LAS-3000 analysis system (Fujifilm, Tokyo, Japan) により行った。また、バンドの定量は ImageJ software を用いて行った。

1.2.7. 免疫組織染色

ミクロトームにより 5 μ m の厚さで薄切したパラフィン包埋肝組織切片は、脱パラフィン後、Retrievagen A at pH 6.0 (BD Biosciences, Boston, MA, USA) に浸し 90°C で 10 分間賦活化した。その後、 α -SMA 免疫染色用の切片は、Mouse-on-Mouse blocking solution (Vector Laboratories,

Burlingame, CA, USA) で1時間インキュベートした。ブロッキングは、 α -SMA 染色に対しては10% horse 血清を、F4/80 染色に対しては10% rabbit 血清を含有した blocking buffer [0.3% Triton X-100 in PBS(-)] に avidin-blocking solution を混和した溶液で室温にて1時間インキュベートした。一次抗体反応は、biotin-blocking solution を混和した blocking buffer にて1,000倍希釈した α -SMA (Sigma Aldrich)、または100倍希釈した F4/80 (CI: A3-1 clone; Abcam) を用い、4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体反応前にメタノールで希釈した0.3%過酸化水素により室温で30分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。二次抗体反応は、blocking buffer にて200倍希釈した biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories) または200倍希釈した biotinylated rabbit anti-rat IgG (Vector Laboratories) を用い、室温で30分間行った。抗体抗原複合体は、Vectastain Elite ABC Standard Kit (Vector Laboratories) と Metal enhanced DAB substrate kit (Thermo Scientific, Rockland, IL, USA) を用いて検出した。また、対比染色としてマイヤーヘマトキシリンにより核を染色した。

1.2.8. 肝組織中のヒドロキシプロリン含有量の測定

コラーゲンを構成する肝組織中のヒドロキシプロリン含有量は、従来の方法に従って行った [26]。単的に述べると、重量を測定した肝組織を破碎後に6 M hydrochloride で完全に加水分解した。検体中のヒドロキシプロリンを chloramine T との反応を介してピロールに変換し、エールリッヒ試薬との反応により得られた生成物を558 nm の吸光度で測定した。検体中のヒドロキシプロリン量は trans-4-hydroxy-L-proline (Sigma-Aldrich) を用いて作製した検量線から算出した。

1.2.9. 肝組織中のリンパ球の単離と免疫染色とフローサイトメトリー解析

肝組織中のリンパ球は、前述したような機械的な破碎法により単離した [27]。肝組織中のリンパ球の免疫表現型は、標的とするマウスの細胞表面抗原に対する抗体を用いたフローサイトメトリー解析により判別した。抗体は Phycoerythrin (PE)/Cy5 でラベルされた anti-CD45 (30-F11; BD Biosciences)、PE/Cy5 でラベルされた anti-CD3 (145-2C11; BD Biosciences)、fluorescein isothiocyanate (FITC; 53-6.7; BD Biosciences) でラベルされた anti-CD8、PE でラベルされた anti-NK1.1 (PK-136; BD Biosciences) および PE/Cy5 でラベルされた anti-T-cell receptor (TCR) (H57-597; BD Biosciences) を使用した。肝組織中のリンパ球は、96 well プレートに 3×10^5 cells/well になるように分注した後、50 μ L の FACS buffer で懸濁した。細胞懸濁液は各々の細胞表面抗原に対する抗体と直接インキュベートした。これらは FACSCalibur および Cell Quest software (BD Biosciences) により解析した。

Table 1-1. Primers used in RT-PCR analysis.

Cited from Supplementary Table S1 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

Gene		Sequence	Template cDNA (μ g)	Annealing ($^{\circ}$ C)	Cycle
TGF- β 1	F	5'-TGGACCGCAACAACGGCATCTATGAGAAAACC-3'	0.05	64	32
	R	5'-TGGAGCTGAAGCAATAGTTGGTATCCAGGGCT-3'			
Colla2	F	5'-GAGTCCGCGTATCCACAA-3'	0.05	64	32
	R	5'-GGAGGGAACGGTCCACGA-3'			
IVA-PLA ₂	F	5'-TGGTGTGATGAAGGCACTGT-3'	0.1	56	35
	R	5'-ACTCAGGGTCATGCTCATCC-3'			
CYP2E1	F	5'-AGTGTTACACTGCACCTGG-3'	0.05	57	30
	R	5'-CCTGGAACACAGGAATGTCC-3'			
α -SMA	F	5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3'	0.1	60	30
	R	5'-CATCTCCAGAGTCCAGCACA-3'			
F4/80	F	5'-CTGTAACCGGATGGCAAAC-3'	0.05	62	35
	R	5'-CATCACTGCCTCCACTAGCA-3'			
MCP-1	F	5'-AGGTCCTGTGCTGCTTCTG-3'	0.05	62	35
	R	5'-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3'			
CD8	F	5'-GCTCAGTCATCAGCAACTCG-3'	0.2	62	30
	R	5'-ATCACAGGCGAAGTCCAATC-3'			
RANTES	F	5'-ATGAAGATCTCTGCAGCTGCCCTCACC-3'	0.05	60	32
	R	5'-CTAGTCTCATCTCCAAATAGTTGATG-3'			
β -actin	F	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	0.05	56	29
	R	5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3'			
36B4	F	5'-TGTGTGTCTGCAGATCGGGT-3'	0.05	60	31
	R	5'-TGGATCAGCCAGGAAGGCCT-3'			

Table 1-2. Primers used in real-time quantitative RT-PCR analysis.

Cited from Supplementary Table S2 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

Gene		Sequence	Annealing ($^{\circ}$ C)
TGF- β 1	F	5'-GGATACCAACTATTGCTTCAGCTCC-3'	60
	R	5'-AGGCTCCAAATATAGGGGCAGGGTC-3'	
Colla2	F	5'-CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3'	60
	R	5'-CTTGCCCCATTCATTTGTCT-3'	
IVA-PLA ₂	F	5'-TGGGATTCTCTGGTGTGATGAAG-3'	62
	R	5'-GTGGTGTAAAGAAGTAAGAGAGGGTTGT-3'	
α -SMA	F	5'-CAGCGGGCATCCACGAA-3'	60
	R	5'-GCCACCGATCCAGACAGA-3'	
CD11b	F	5'-TGGTTTTAGGAGCACCTCGG-3'	62
	R	5'-TCAGCGTCCATGTCCACAGA-3'	
MCP-1	F	5'-TGCATCTGCCCTAAGGTCTTC-3'	62
	R	5'-AAGTGCTTGAGGTGGTTGTGG-3'	
18S rRNA	F	5'-TTCGAACGTCTGCCCTATCA-3'	62
	R	5'-ATGGTAGGCACGGCGACTA-3'	

第3節 結果

1.3.1. IVA-PLA₂ 欠損マウスにおいて HFCD 誘発性 NASH に対して抑制的に関与するタンパク質の同定

比較プロテオーム解析により HFCD 誘発性の脂肪肝形成の際に変動するタンパク質を同定した。プロテオーム解析では、普通食 (normal diet: ND) を摂取した WT (WT/ND) と IVA-PLA₂ KO マウス (KO/ND)、および HFCD を摂取した WT (WT/HFCD) と KO マウス (KO/HFCD) の計 4 群を用意し検討した。ND または HFCD 投与はいずれも 6 週齢から開始し 16 週間摂取させた。体重および肝重量は、WT/HFCD 群で他群に比し有意に増加したが、KO/HFCD 群では WT/HFCD 群に比し増加が有意に抑制された (Table 1-3)。また、WT/HFCD 群の肝では組織学的特徴である脂肪滴が観察されたが、KO/HFCD 群ではほとんど見られなかった (Figure 1-4A)。これら 4 群の肝組織から抽出したタンパク質を 2D-PAGE により分離して蛍光色素により染色し、脂肪肝形成への関与が考えられる発現変動タンパク質の同定を試みた。およそ 500 個のタンパク質スポットを分析した結果、WT/ND 群と比較して WT/HFCD 群で増減がみられたスポットが 14 個検出された (Figure 1-1)。この 14 個のスポットのうち 12 個が MALDI-TOF 質量分析計のペプチドマスフィンガープリンティングにより同定できた (Table 1-4)。同定できた 12 個で、WT の ND 群に比し HFCD 群で増加したスポットのうち、KO/HFCD 群で WT/HFCD のような増加がみられなかったスポットは 4 個あった [Figure 1-2 および Table 1-4 (下線を引いたタンパク質)]。この 4 個のスポットは、1 個 (SCPx) が脂肪肝形成に関わるタンパク質で、3 個 (CK18, GSTM1, ANV) が肝線維化に関わるタンパク質であった (Table 1-4)。特に CK18 タンパク質スポットは WT/HFCD 群でみられた増加を KO/HFCD 群では顕著に抑制しており (Figure 1-2A)、ウエスタンブロッティング解析によるタンパク質発現および RT-PCR 解析による mRNA 発現も KO/HFCD 群ではプロテオーム解析と同様の減少を認めた (Figures 1-2B, 1-2C, Figure 1-3)。このように、WT マウスでは HFCD の長期投与によって肝線維化関連タンパク質の発現上昇が見られたのに対して、IVA-PLA₂ KO マウスでは発現上昇は見られなかったことから、IVA-PLA₂ は肝組織において脂質蓄積が誘発する肝線維化の進展にも関与している可能性が示唆された。

Table 1-3. Summary of body and liver weights in the WT and KO mice used in proteomic analysis.
Cited from Supplementary Table S2 of “Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)”.

Genotype	Diet	Number of mice	Body weight (g)		Liver weight (g)	
			(mean ± S.E.)		(mean ± S.E.)	
WT	ND	5	30.8	± 0.8	1.46	± 0.07
	HFCD	5	44.8	± 1.4	3.54	± 0.31
KO	ND	5	27.8	± 0.9	1.43	± 0.04
	HFCD	5	36.2	± 2.9	1.68	± 0.21

The data shown are in regard to the mean and standard error. Statistical significance was evaluated by Student’s *t*-test comparing WT with KO where **P* < 0.05, ****P* < 0.001. Significance was determined by the Student’s *t*-test. **P* < 0.01, ***P* < 0.001, **P* < 0.05 vs. WT/ND, ***P* < 0.05 vs. WT/HFCD.

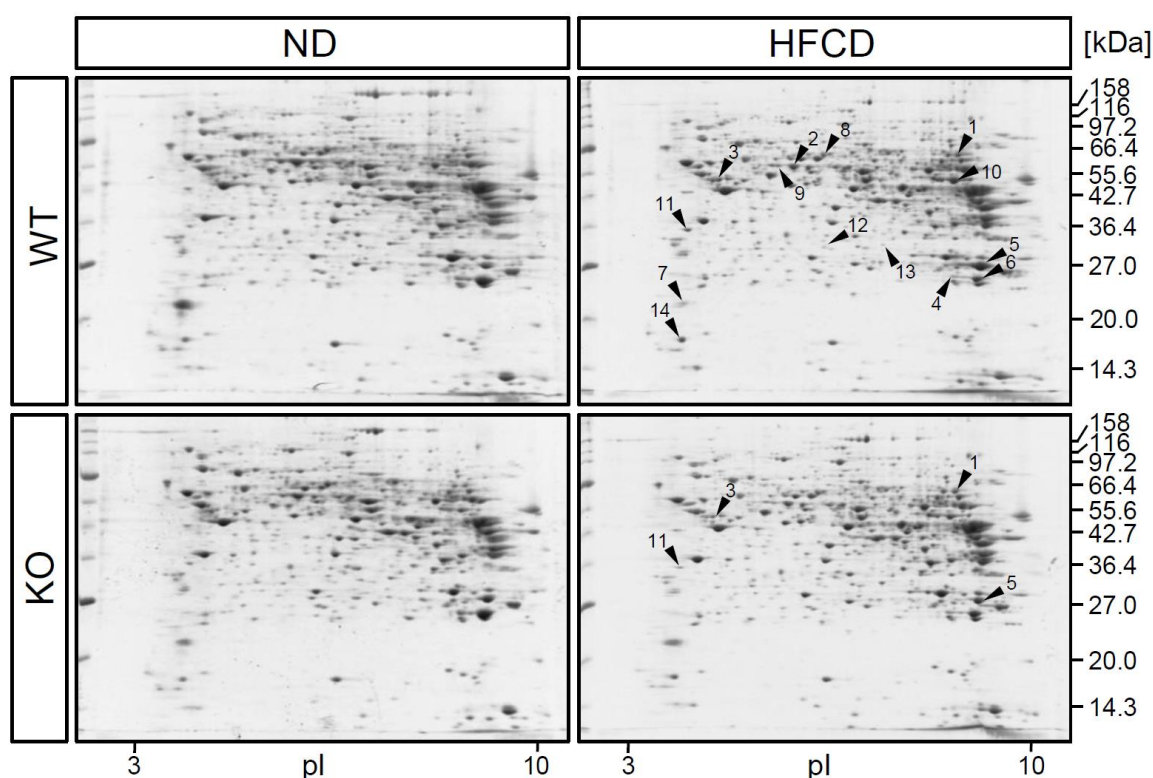


Figure 1-1. Two-dimensional gels of hepatic proteins from WT and IVA-PLA2-deficient KO mice fed ND or HFCD. Hepatic proteins were extracted from WT and KO mice fed ND or HFCD for 16 wk. Protein (500 µg) was subjected to 2D-PAGE and detected by Flamingo dye staining. Fourteen Protein spots had Altered expression in WT mice by HFCD Administration (arrowheads in the WT/HFCD group). Among there 14 spots, 4 were annotated because they showed different alteration by HFCD administration between WT and KO mice (arrowheads in the KO/HFCD group).
Cited from Figure 1 of “Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)”.

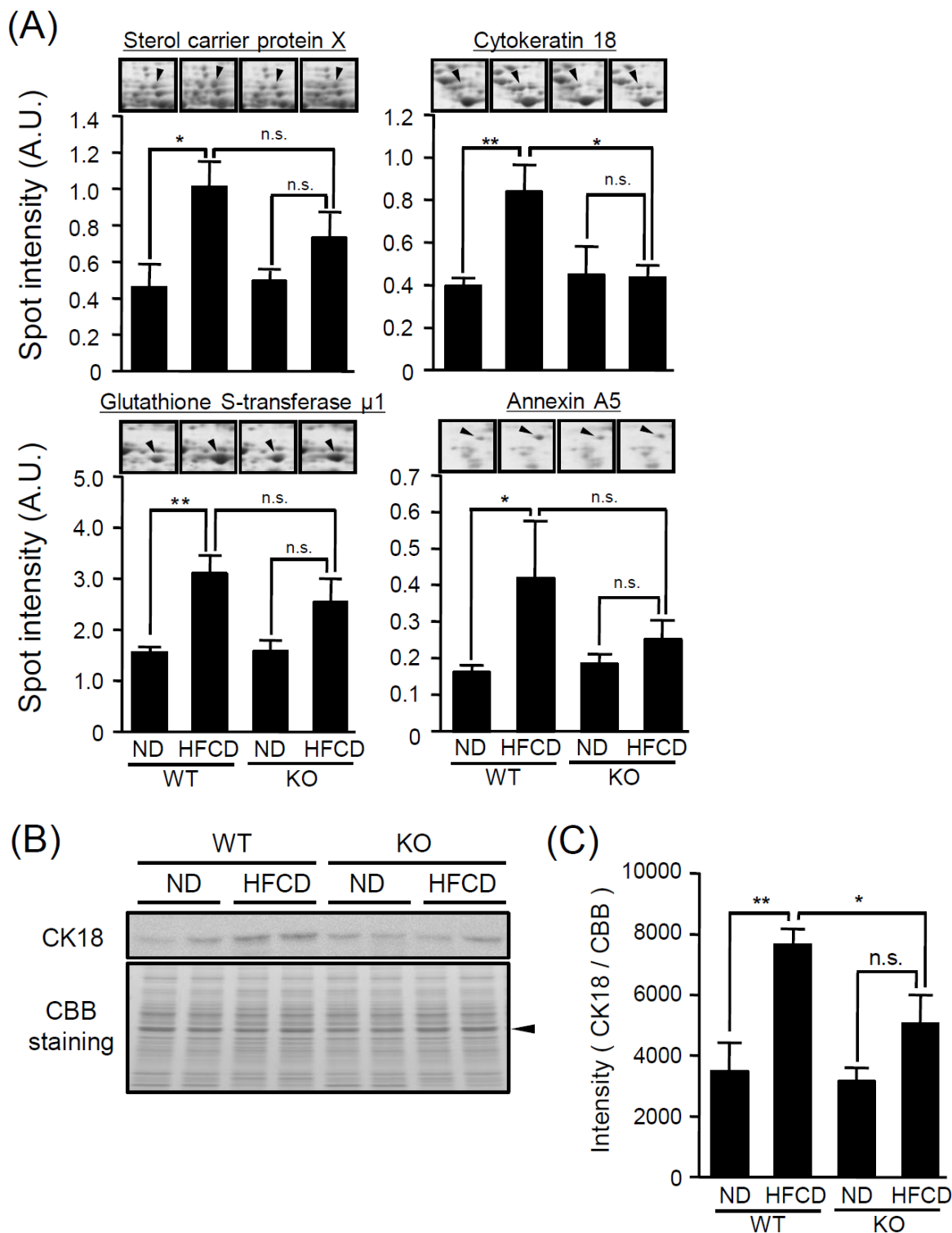


Figure 1-2. Annotated protein spots in proteomic analysis.

A) Spot intensity for annotated protein spots in proteomic analysis was quantified. Among the hepatic proteins from WT and KO mice fed ND or HFCD for 16 wk, protein spots with altered intensity of protein spots was quantified by Proteomweaver 2D analysis software. B) Western blot probed with CK18 (top panel) for liver protein extracts from WT/ND, WT/HFCD, KO/ND, and KO/HFCD groups. Loaded proteins were detected by staining with CBB after SDS-PAGE (bottom panel). C) Band intensity of CK 18 was quantified with ImageJ and normalized using CBB-stained band (arrowhead in B). Values represent mean \pm SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. * P <0.05, ** P <0.01; Student's t test.

Cited from Figure 2 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

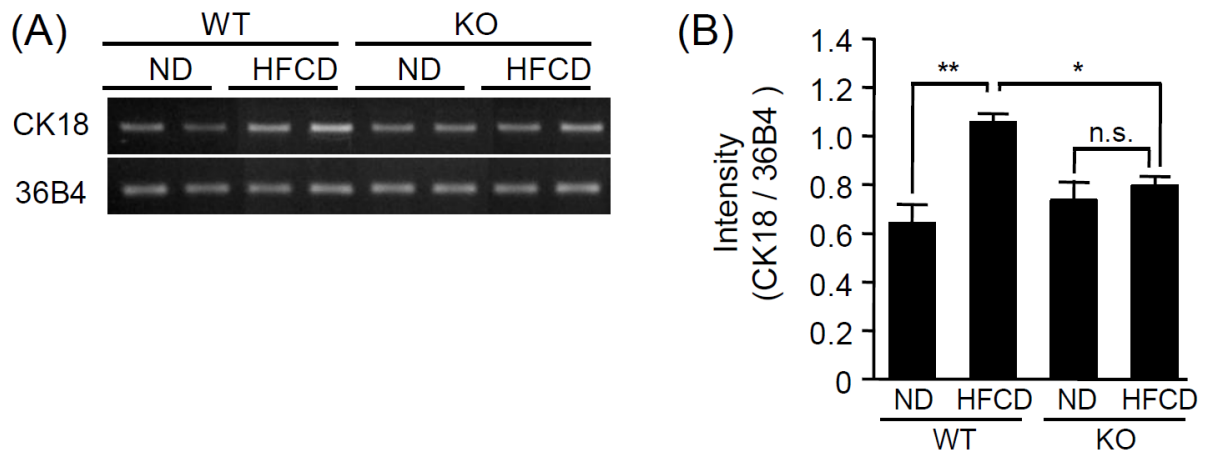


Figure 1-3. Induction of cytokeratin 18 mRNA by HFCD feeding was suppressed in IVA-PLA₂ deficient mice.

(A) mRNA levels of CK18 was examined by RT-PCR. (B) Band intensities for CK18 mRNA were normalized using 36B4. Values represent mean \pm SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. * P <0.05, ** P <0.01; Student's t test.

Cited from Supplemental Figure S1 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

Table 1-4. Identification of differentially expressed protein in WT mice after HFCD administration.

No.	Protein	GI accession no.	<i>P</i>											Observed		Theoretical	
							vs. WT/ND			KO/HFCD	Coverage (%)	pI	<i>M_r</i> (×10 ³)	pI	<i>M_r</i> (×10 ³)		
			WT/ND	WT/HFCD	KO/ND	KO/HFCD	WT/HFCD	KO/ND	KO/HFCD	vs. WT/HFCD							
1	<u>SCPx</u>	293794	0.64 ± 0.11	1 ± 0.13	0.49 ± 0.07	0.73 ± 0.13	0.02 [*]	0.91	0.19	0.19	29	7.3	6.3	7.2	59.82		
2	SBP1 ^α	22164798	1.62 ± 0.24	0.86 ± 0.12	1.1 ± 0.12	0.81 ± 0.21	0.02 [*]	0.09	0.04 [*]	0.95	37	5.7	5.7	5.9	53.07		
	SBP2 ^α	18848341									44	5.7	5.7	5.8	53.16		
3	<u>CK18^α</u>	293685	0.4 ± 0.04	0.85 ± 0.12	0.45 ± 0.14	0.44 ± 0.06	0.005 ^{***}	0.42	0.45	0.01 [*]	50	5.2	5.1	5.2	47.49		
4	N.D.	—	0.86 ± 0.1	0.44 ± 0.05	0.91 ± 0.09	0.5 ± 0.14	0.005 ^{***}	0.73	0.09	0.51	—	7.2	2.6	—	—		
5	<u>SGTM1^α</u>	6754084	1.5 ± 0.1	3.1 ± 0.35	1.6 ± 0.19	2.5 ± 0.47	0.002 ^{***}	0.64	0.04 [*]	0.43	72	8	2.7	7.8	26.07		
6	SGTP1 ^α	576133	4.32 ± 0.36	1.7 ± 0.2	4.1 ± 0.21	2.1 ± 0.67	0.001 ^{***}	0.61	0.03 [*]	0.37	43	7.9	2.5	8.3	23.63		
7	MUP1 ^α	127526	2.6 ± 0.18	0.38 ± 0.31	1.4 ± 0.21	1.1 ± 0.52	0.001 ^{***}	0.003 ^{***}	0.06	0.21	64	4.8	2.2	5	20.92		
	MUP6 ^α	127531									64	4.8	2.2	4.9	20.92		
8	ES31	29476863	0.88 ± 0.1	0.47 ± 0.1	0.82 ± 0.09	0.58 ± 0.13	0.03 [*]	0.68	0.13	0.51	20	6	6.3	5.8	63.81		
9	SBP1 ^α	22164798	0.73 ± 0.12	0.22 ± 0.06	0.59 ± 0.12	0.2 ± 0.06	0.004 ^{***}	0.47	0.004 ^{***}	0.92	28	5.6	5.7	5.9	53.07		
	SBP2 ^α	18848341									35	5.6	5.7	5.8	53.16		
10	<u>HMGs^α</u>	555835	1 ± 0.06	1.7 ± 0.23	0.85 ± 0.08	1.7 ± 0.28	0.01 [*]	0.11	0.03	0.99	34	7.2	5.2	7.9	48.4		
11	<u>ANV^α</u>	6753060	0.17 ± 0.02	0.42 ± 0.16	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.05	0.04 [*]	0.4	0.09	0.16	32	4.9	3.4	4.8	35.79		
12	NUDT7	47682713	0.15 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.02 [*]	0.26	0.07	0.52	23	6	3.1	5.9	27.07		
13	SULT1	28202011	0.43 ± 0.06	0.06 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.001 ^{***}	0.013 [*]	0.032 [*]	0.0006 ^{***}	54	6.5	3.1	6.6	33.51		
14	N.D.	—	0.42 ± 0.03	0.62 ± 0.09	0.36 ± 0.03	0.58 ± 0.12	0.04 ^{***}	0.26	0.13	0.89	—	4.8	1.7	—	—		

Annotated proteins are underscored (see Fig. 1-2). ANV, annexin A5; CK18, cytokeratin 18; ES31, liver carboxylesterase 31; GSTM1, glutathione S-transferase μ1; SGTP1, glutathione S-transferase π1; HMGS, HMG-CoA synthase; MUP1, major urinary protein 1; N.D., not determined; NUDT7, nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 7; SBP, selenium-binding protein; SCPx, sterol carrier protein X; SULT1, sulfotransferase-like protein 1. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; Student's 2-sided t test. "Hepatic fibrosis.

Cited from Table 1 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

1.3.2. IVA-PLA₂ 欠損マウスにおける HFCD 摂取誘発性の肝線維化形成の抑制

HFCD を摂取すると肝組織にコラーゲン繊維が蓄積する。この組織学的変化を評価するために、マッソントリクロームおよびピクロシリウスレッド染色を行った。コラーゲン繊維の蓄積は WT/HFCD 群では観察されたが、KO/HFCD 群ではほとんど見られなかった (Figures 1-4A, 1-4B)。また、HFCD 摂取による肝組織への脂肪滴の蓄積も、以前の報告と同様に KO/HFCD 群では顕著に抑制された (Figures 1-4A, 1-4B) [17]。さらに、肝組織での肝線維化に関わる分子であるトランスフォーミング増殖因子β1 (transforming growth factor-β1: TGF-β1) および I 型コラーゲンα2 鎖 (collagen 1a2: Col1a2) の mRNA 発現量が、KO/HFCD 群では WT/HFCD 群に比し有意に抑制された (Figures 1-4C-E)。このように、IVA-PLA₂ KO マウスでは HFCD 摂取誘発性の肝線維化形成が抑制されることが示唆された。

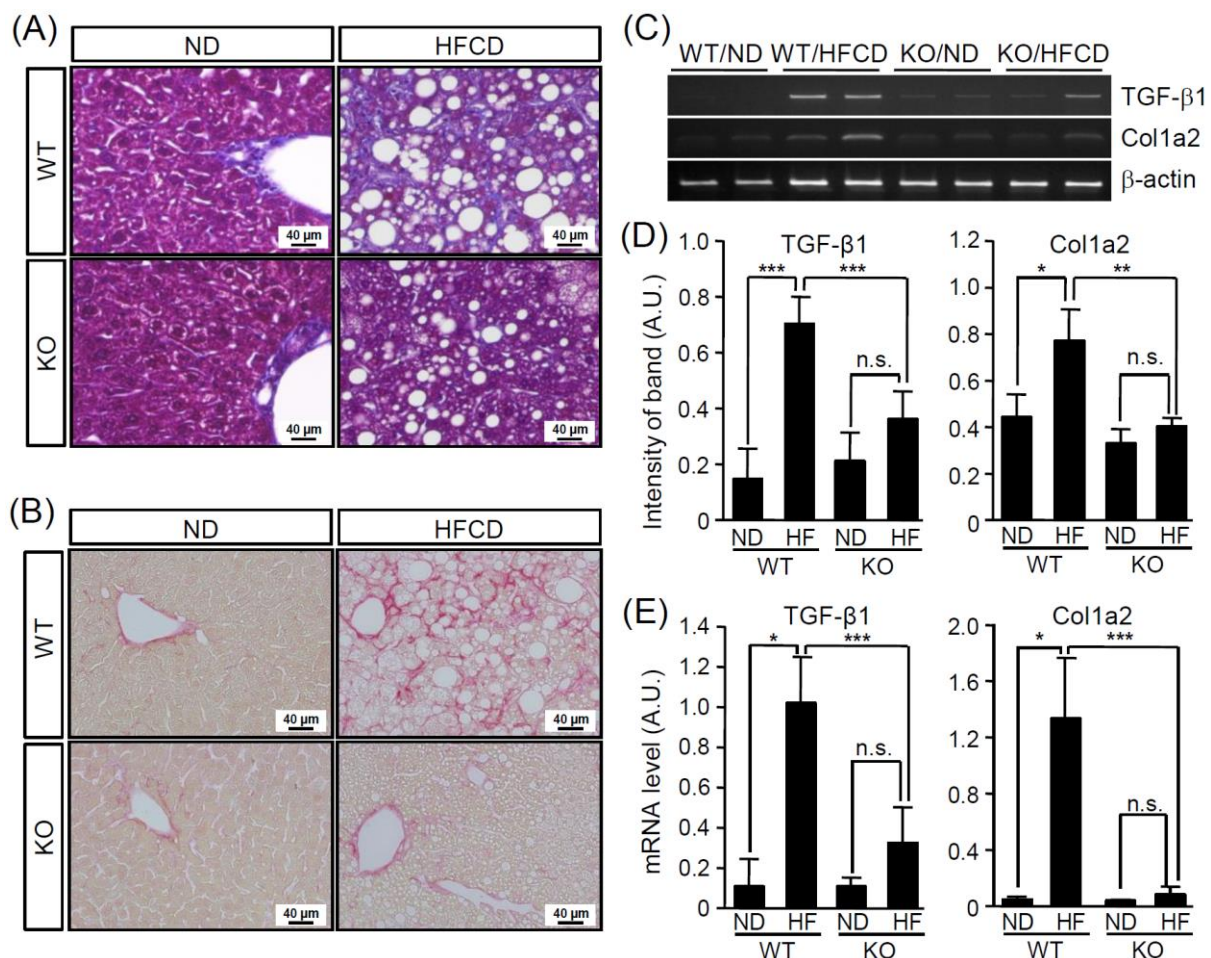


Figure 1-4. Deficiency of IVA-PLA₂ reduced HFCD-induced hepatic fibrosis.

A, B) HFCD-induced hepatic fibrosis was assessed by Masson's trichrome staining (A) and Sirius red staining (B). C) mRNA expression levels of molecules associated with hepatic fibrosis, transforming growth factor β1 (TGF-β1), and collagen α1 chain type II (Col1a2) were assessed by RT-PCR analysis. D) Quantification of band intensities for TGF-β1 and Col1a2 mRNA in panel C with ImageJ. Expression of TGF-β1 and Col1a2 mRNA normalized to that of β-actin mRNA. E) mRNA expression level of TGF-β1 and Col1a2 was also assessed by real-time quantitative RT-PCR. Expression level of each mRNA was normalized to that 18S rRNA. Values represent mean ± SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Student's *t* test.

Cited from Figure 3 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

1.3.3. IVA-PLA₂欠損マウスにおける CCl₄長期投与誘発性の肝線維化形成の抑制

1.3.2.で示したように IVA-PLA₂欠損は HFCD 摂取誘発性の肝線維化形成を抑制した。しかし、この線維化抑制は肝組織への脂肪蓄積を抑制した結果である可能性も考えられる。そこで、我々は、肝脂肪蓄積を介さずに肝線維化を誘導する四塩化炭素 (carbon tetrachloride: CCl₄) を用いた NASH モデルにて、酸化ストレス誘発性の肝線維化形成に対する IVA-PLA₂の影響を検証した。CCl₄は肝実質細胞で CCl₃ラジカルとなり肝線維化を引き起こすため、まず CCl₄の代謝酵素である CYP2E1 の mRNA 発現量を調べた。6週間の CCl₄投与により線維化を誘発させたマウス肝組織の CYP2E1 mRNA 発現量は WT と KO で同程度であり、両遺伝子型の間で CCl₄の代謝に差はないと考えられた (Figures 1-5C, 1-5D)。次に、CCl₄投与により蓄積したコラーゲン繊維をピクロシリウスレッド染色により検討したところ、染色されたコラーゲン繊維は WT/CCl₄群では多く観察されたのに対し、KO/CCl₄群では少なかった (Figure 1-5A)。加えて、コラーゲンの主要な構成成分であるヒドロキシプロリン量は、WT/CCl₄群に比し KO/CCl₄群では有意に少なかった (Figure 1-5B)。また、肝線維化マーカー分子である TGF-β1 および Col1a2 の mRNA 発現量も同様に、WT/CCl₄群に比し KO/CCl₄群では有意に少なかった (Figures 1-5.C-E)。さらに、CCl₄投与により IVA-PLA₂の mRNA およびタンパク質発現量は増加した (Figures 1-5.C-F)。以上の結果から、CCl₄誘発性の肝線維化において IVA-PLA₂が重要な役割を演じていると考えられる。

1.3.4. IVA-PLA₂欠損マウスにおける CCl₄投与誘発性の肝星細胞活性化の抑制

コラーゲンを産生する活性化肝星細胞はα平滑筋アクチン (smooth muscle α-actin: α-SMA) を高発現するため [28]、CCl₄長期投与マウスの肝組織でのα-SMA mRNA 発現量を測定した。α-SMA の mRNA 発現量は CCl₄非投与の WT マウス (WT/Veh) に比し CCl₄投与の WT マウス (WT/CCl₄) では有意に増加した。しかし、CCl₄投与の IVA-PLA₂ KO マウス (KO/CCl₄) では CCl₄を投与によるα-SMA の mRNA 発現増加が WT/Veh よりも少なかった (Figures 1-6.A-C)。さらに、肝組織切片のα-SMA の免疫組織染色をすると、WT/CCl₄群ではα-SMA 陽性細胞が多く検出されたのに対し、KO/CCl₄群では陽性細胞数が少なかった (Figure 1-6D)。これらのことから、IVA-PLA₂は、星細胞の活性化よりも上流で機能することでの肝線維化進展に関与していると考えられる。

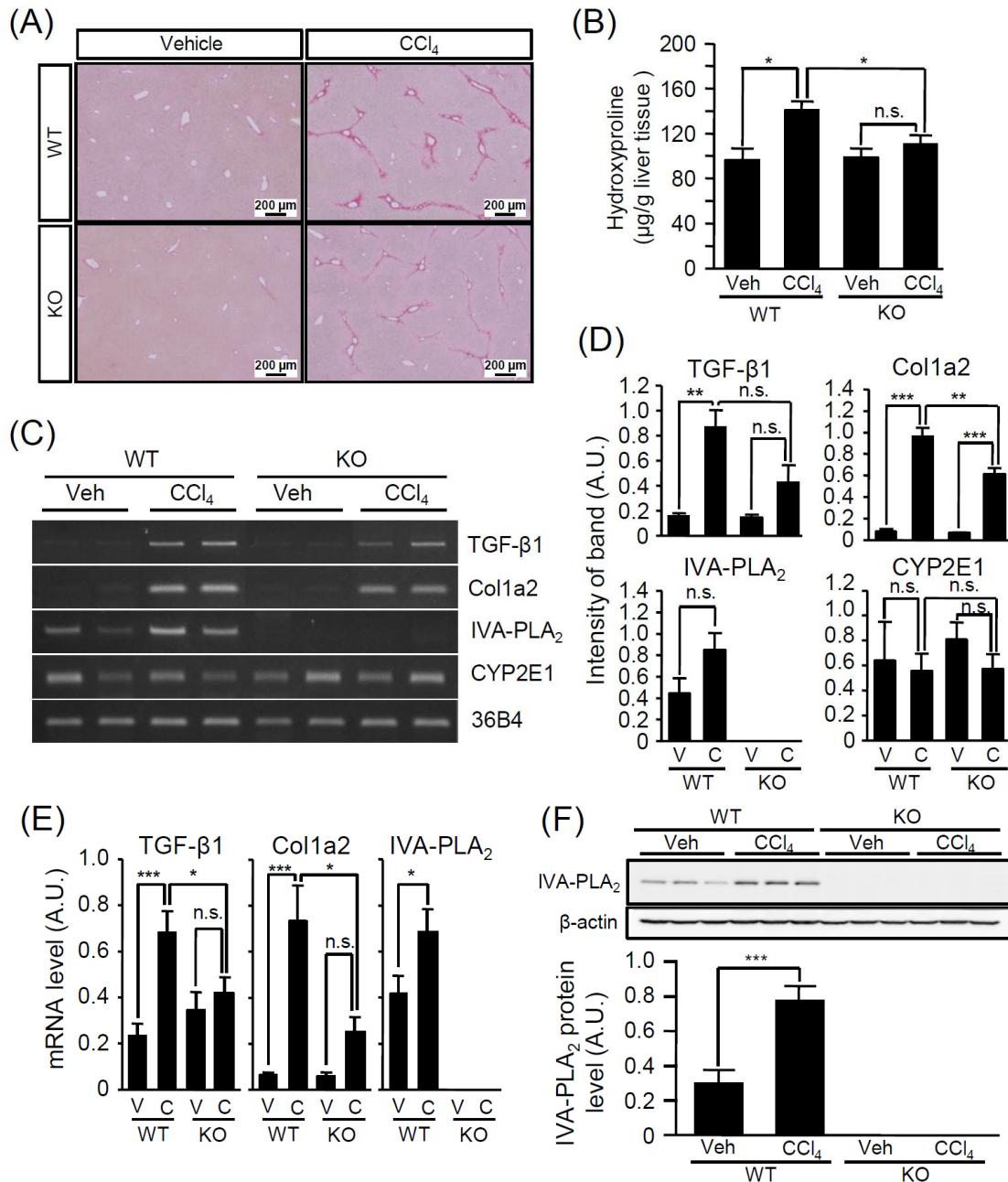


Figure 1-5. Deficiency of IVA-PLA₂ reduced CCl₄-induced hepatic fibrosis.

WT and KO mice were injected with CCl₄ for 6 wk (2×/wk). At 48 h after the last CCl₄ injection, mice were sacrificed to assess the parameters of hepatic fibrosis. A) Paraffin-embedded liver sections were stained with Sirius red. B) Hydroxyproline content was measured in the liver of WT and KO mice administered vehicle (Veh) or CCl₄. C) Hepatic levels of TGF-β1, Col1a2, IVA-PLA₂, CYP2E1, and 36B4 mRNA were assessed by RT-PCR analysis. CYP2E1 is an enzyme for displaying the toxicity of CCl₄ *in vivo*. D) Band intensity for TGF-β1, Col1a2, IVA-PLA₂, and CYP2E1 mRNA was quantified with ImageJ. Expression levels of these molecules were normalized to that of 36B4 mRNA. E) mRNA expression levels of TGF-β1, Col1a2, and IVA-PLA₂ were also assessed by real-time quantitative RT-PCR. Expression level of each mRNA was normalized to that of 18S rRNA. F) Western blot probed with IVA-PLA₂ (top blot) and β-actin antibody (bottom blot) for liver protein extracts from WT/Veh, WT/CCl₄, KO/Veh, and KO/CCl₄ groups. Band intensity was quantified with ImageJ. Expression levels of IVA-PLA₂ protein was normalized to that of β-actin (graph). Expression level of each mRNA was normalized to that 18S rRNA. Values represent mean ± SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. *P < 0.05, **P < 0.01; Student's *t* test.

Cited from Figure 4 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

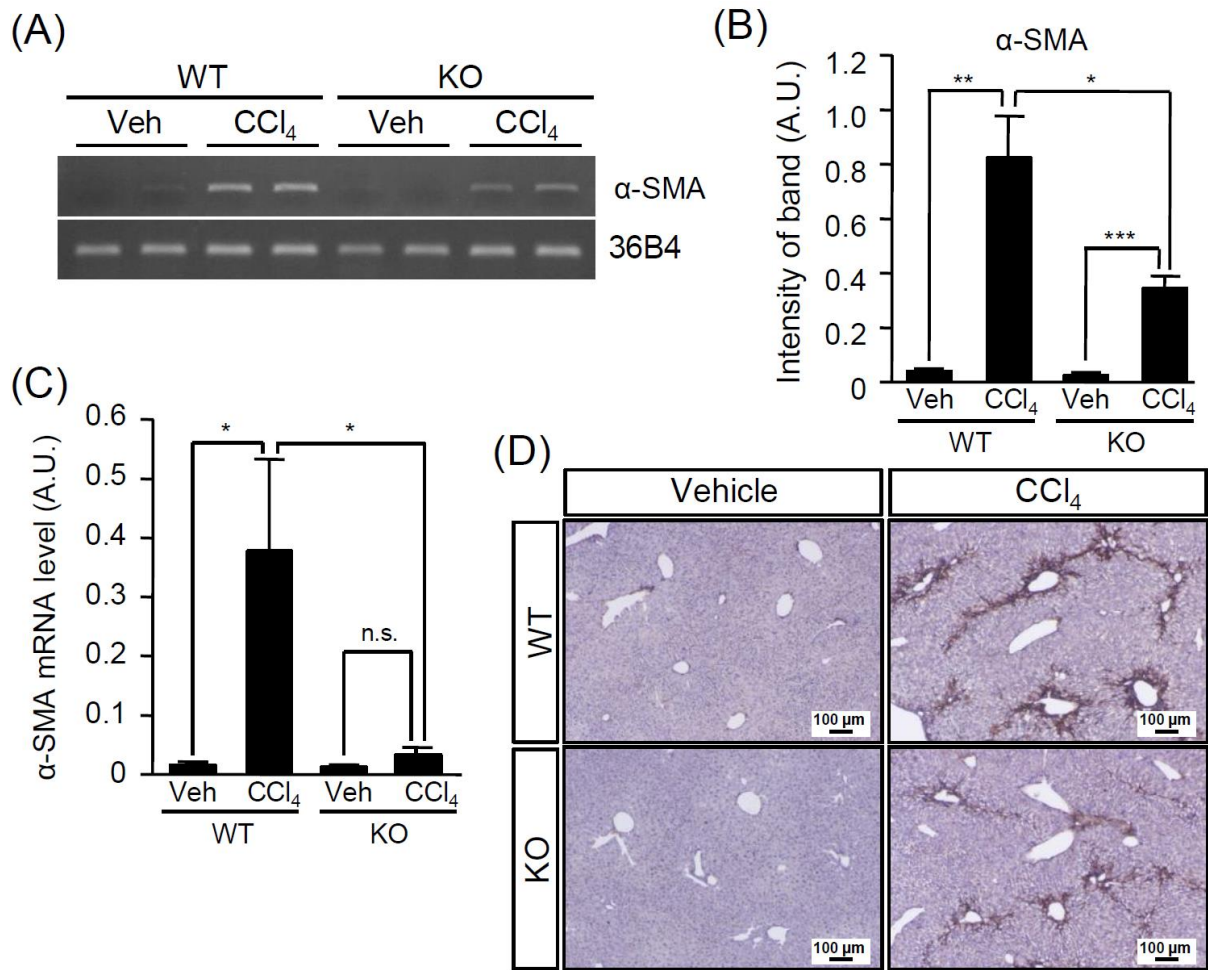


Figure 1-6. Deficiency of IVA-PLA₂ reduced CCl₄-induced activation of hepatic stellate cells.

A) Hepatic levels of α -SMA and 36B4 mRNA, assessed by RT-PCR analysis. B) Band intensity in panel A was quantified with ImageJ. 36B4 mRNA was used as the internal control. C) Expression level of α -SMA was also assessed by normalized to that of 18S rRNA. D) α -SMA expressing cells were detected by immunohistochemistry. Values represent mean \pm SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. * P <0.05, ** P <0.01; Student's t test.

Cited from Figure 5 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

1.3.5. IVA-PLA₂欠損マウスにおける CCl₄誘発性のマクロファージの浸潤の抑制

CCl₄ 誘発性の肝線維化の進展には肝組織中の常在性マクロファージであるクッパー細胞の関与が報告されている [29]。そこで、マクロファージの表面抗原である F4/80 の mRNA 発現量を測定し、肝組織中のマクロファージの存在量を調べた。F4/80 の mRNA 発現量は WT マウスでは CCl₄ 投与により増加したが、KO マウスではその増加は WT/CCl₄ 群の 1/2 程度であった (Figures 1-7A, 1-7B)。また、単球およびマクロファージの表面抗原である CD11b の発現量も F4/80 と同様の結果が得られた (Figure 1-7C)。また、肝組織切片の F4/80 の免疫組織染色では、WT/CCl₄ 群で中心静脈周辺に F4/80 陽性細胞が確認されたのに対し、KO/CCl₄ では WT よりも陽性細胞が少なかった (Figure 1-7D)。このように、中心静脈周辺に F4/80 陽性細胞が多く確認されたため、浸潤した単球がマクロファージとなり肝線維化を進展させた可能性が示された。そこで、単球走化性因子 (monocyte chemotactic protein-1: MCP-1) の発現を mRNA レベルで検証した。その結果、MCP-1 mRNA 発現量は WT では CCl₄ 投与により増加したのに対し、IVA-PLA₂ KO では増加が有意に抑制されており、F4/80 や CD11b の mRNA 発現と同様の結果が得られた (Figures 1-7B, 1-7C)。したがって、CCl₄ 投与による肝線維化の形成は、肝組織中に存在するいずれかの細胞での IVA-PLA₂ を介した MCP-1 の発現増大により肝組織内への単球の浸潤が亢進し、結果的にマクロファージやクッパー細胞から産生された TGF-β1 により肝星細胞が活性化されたことによると考えられた。

1.3.6. IVA-PLA₂欠損における CD8 陽性 T 細胞およびナチュラルキラー細胞の浸潤に対する影響

肝線維化の進展には肝星細胞や単球・マクロファージのほかには様々な細胞が関与している。CD8 陽性 T 細胞もその一つで、CD8 陽性 T 細胞の遊走因子の 1 つとして RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) が知られている [30]。一方、ナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞は肝星細胞のアポトーシス性細胞死の誘導によって肝線維化の進展を抑制している [31-34]。ナチュラルキラー T 細胞 (NKT) は肝線維化において多様な役割を果たしている [35]。そこで、CCl₄ 長期投与により線維化した肝組織での CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞および NKT 細胞の数を検討し、IVA-PLA₂ KO による肝線維化進展の抑制にこれらの細胞が関与しているかについて検証した。肝組織における CD8 および RANTES の mRNA 発現量は、WT/Veh 群に比し WT/CCl₄ 群で有意に増加したが、KO/CCl₄ 群においても WT/CCl₄ 群と同様の発現量増加が見られた (Figures 1-8A, 1-8B)。さらに、FACS 解析を用いて総 CD45 陽性細胞のうちの CD3 および CD8 陽性細胞割合を調べた結果、CD8 陽性細胞は WT と KO で同程度存在していることが明らかとなった (Figure 1-8C)。以上より、IVA-PLA₂ 欠損が CCl₄ 誘発性の肝線維化進展を抑制したことに CD8 陽性 T 細胞は関与しないことが示唆された。次に、NK 細胞と NKT 細胞の関与を調べるために肝組織中のリンパ球を NK1.1 および TCR の抗体でラベルし、NK1.1⁺/TCR⁻ および NK1.1⁺/TCR⁺ の割合を FACS 解析により測定した。KO/CCl₄ 群の肝組織では NK 細胞を示す NK1.1⁺/TCR⁻ の割合も、NKT 細胞を示す NK1.1⁺/TCR⁺ の割合も WT/CCl₄ 群と同程度であり (Figure 1-8C)、NK 細胞と NKT 細胞は IVA-PLA₂ KO マ

ウスでの CCl₄ 誘発性肝線維化の抑制に関与しないと考えられた。したがって、IVA-PLA₂ KO マウスにおいて見られた CCl₄ 誘発性肝線維化の進展の抑制には、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞、NKT 細胞による TGF-β1 産生抑制ではなく、マクロファージやクッパー細胞の浸潤抑制によることが起因したと示唆された。

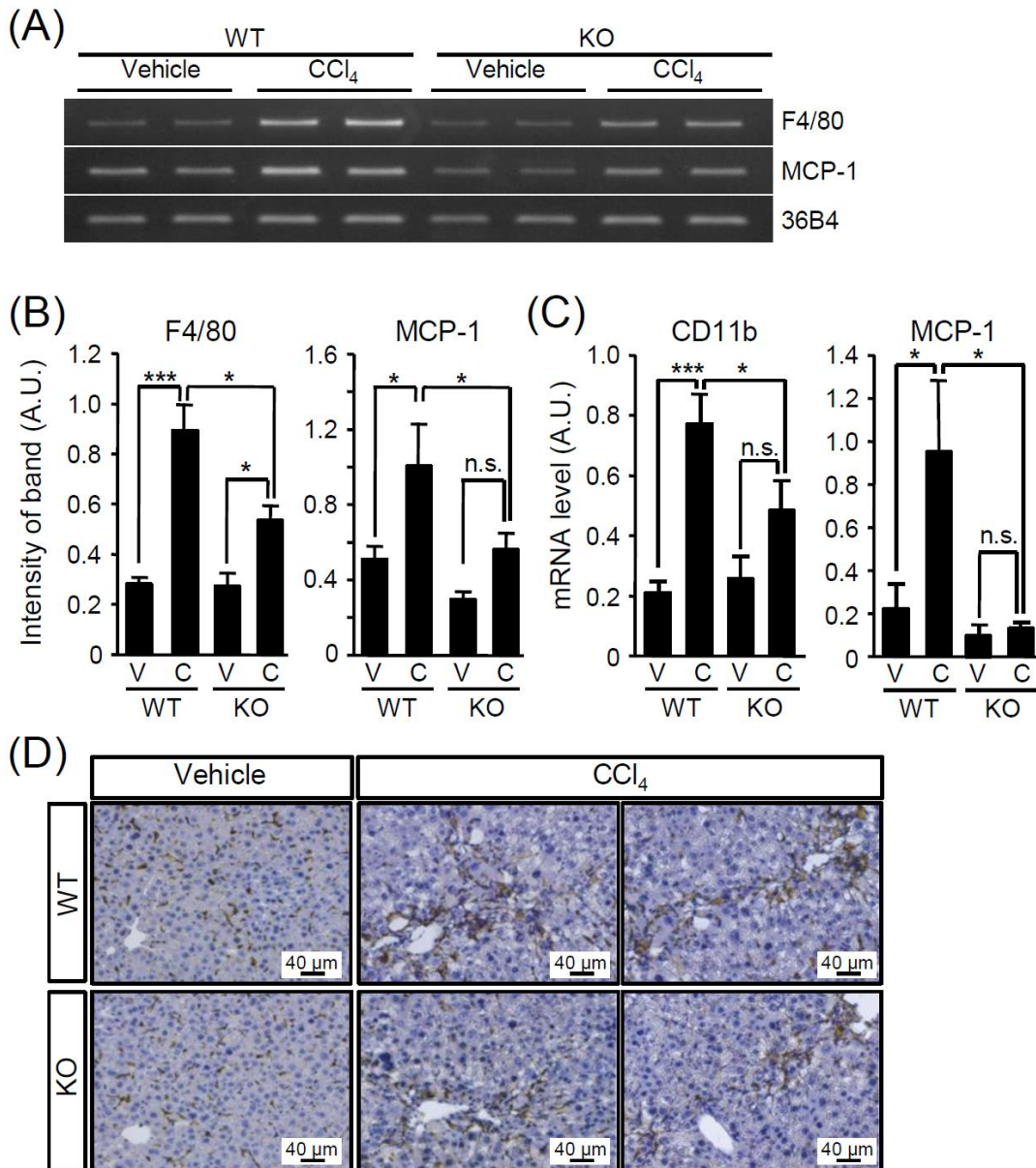


Figure 1-7. Deficiency of IVA-PLA₂ reduced CCl₄-induced infiltration of macrophages and Kupffer cells into the liver.

A) Expression levels of F4/80, MCP-1, and 36B4 mRNA were assessed by RT-PCR analysis. B) Band intensity in panel A was quantified with ImageJ. F4/80 and MCP-1 mRNA levels were normalized to that of 36B4. C) Expression levels of CD11b and MCP-1 mRNA were also assessed by real-time quantitative RT-PCR. Expression level of each mRNA was normalized to that of 18S rRNA. D) CCl₄-induced infiltration of macrophages and Kupffer cells detected by immunohistochemistry with an anti-F4/80 antibody. Values represent mean ± SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. **P*<0.05, ***P*<0.01; Student's *t* test.

Cited from Figure 6 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

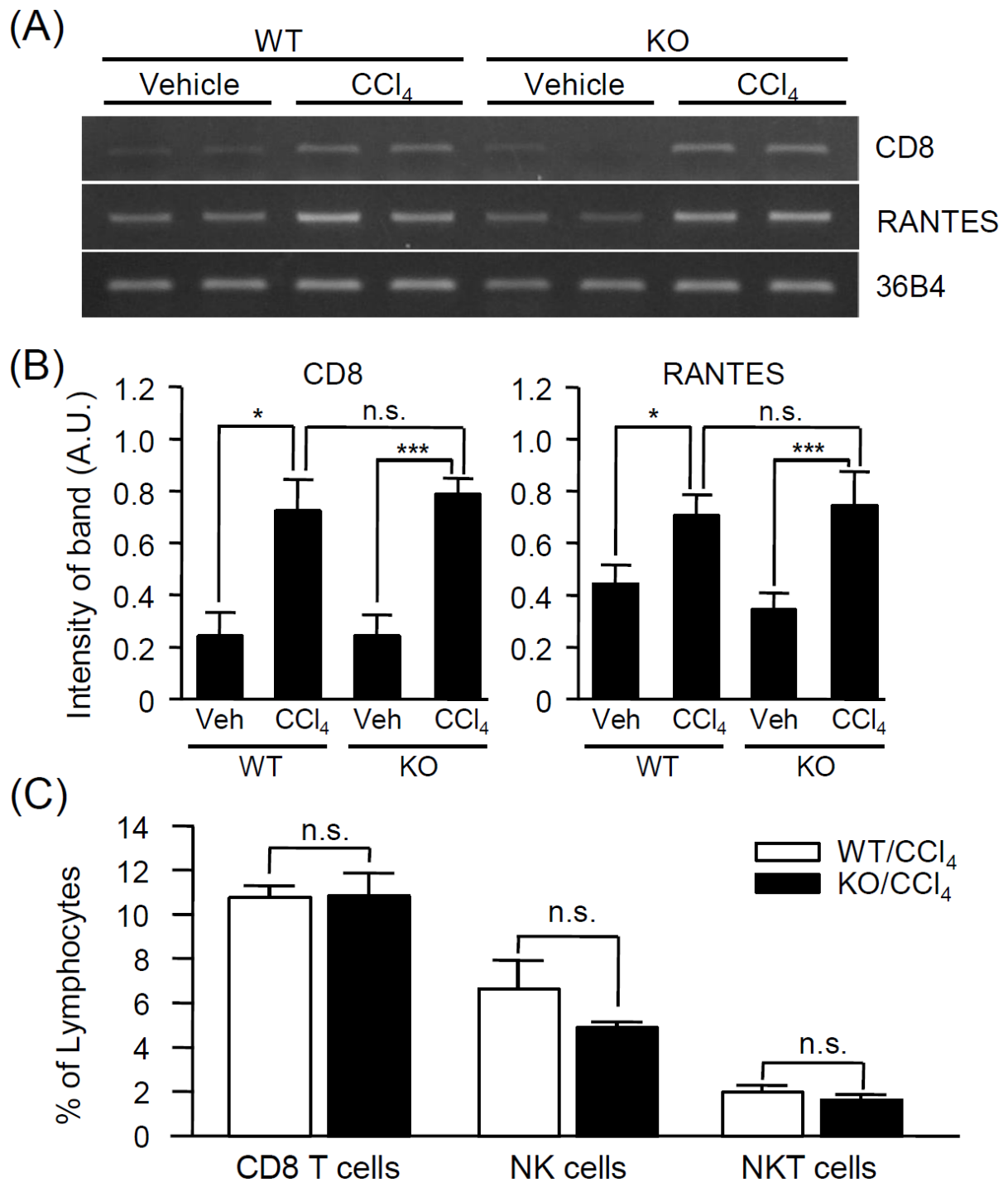


Figure 1-8. CD8 T lymphocytes, NK cells, and NKT cells were not involved in suppression of the development of hepatic fibrosis by IVA-PLA₂ deficiency.

A) Expression levels of CD8, RANTES, and 36B4 mRNA assessed by RT-PCR analysis. B) Band intensity in panel A was quantified by ImageJ. CD8 and RANTES mRNA levels were normalized to that of 36B4. C) Intrahepatic amounts of CD8 T lymphocyte, NK cells, and NKT cells were quantified by FACS analysis. CD8 T lymphocyte, NK cells, and NKT cells were CD4⁺/CD8⁺, NK1.1⁺/TCR⁻, and NK1.1⁺/TCR⁺, respectively. Values represent mean \pm SE (n=5/group). A.U., arbitrary unit; n.s., not significant. * P <0.05, ** P <0.01; Student's t test.

Cited from Figure 6 of "Ishihara et al., FASEB J., 26, 4111-4121 (2012)".

第4節 考察

本研究では、IVA-PLA₂を介した HFCD 誘発性 NASH モデルにおける病態形成の分子機構を明らかにするために、プロテオーム解析により肝組織で発現変動するタンパク質の網羅的な検出と同定を行った。WTではND群と比べてHFCD群で増減したタンパク質は14個あり、このうち12個が同定できた。この12個のタンパク質のうち4個はWTでHFCD摂取によりND群と比べて増加したが、KOではHFCD摂取にも関わらずWTでみられた増加が抑制された。この4個のタンパク質のうち3個が肝線維化との関連性が示唆されるもので、1個が脂質の輸送と代謝に関与するものであった。一方、同定した12個のタンパク質のうち残りの8個のタンパク質の性質は様々で、唯一脂肪肝形成に関与するタンパク質 (HMGS) はWTにおいてND摂取に比べHFCD摂取で増加したが、HFCDを摂取したKOでもWTと同程度の増加がみられた。また、データは未発表だが、プロテオーム解析に使用した肝組織を用いてメタボリックシンドローム関連の mRNA 発現を網羅的に解析できるマイクロアレイ解析 (メタボリックチップ、KURABOU) によって 195 個のメタボリックシンドロームに関連分子の mRNA 発現量を調べたが、HFCD摂取のWTおよびKO間で顕著に変動する分子はなかった。さらに本研究では、マウスに CCl₄を投与することで、脂肪蓄積を伴わない肝線維化モデルを作製し、IVA-PLA₂ KO マウスでの肝線維化形成が WT マウスよりも抑制されていることを明らかにした。本研究でのプロテオーム解析では、IVA-PLA₂を介した HFCD 誘発性の脂肪肝形成に関与するタンパク質は検出できなかったが、本研究により新たに IVA-PLA₂が肝線維化の進展に関与することが明らかとなった。

近年、アラキドン酸カスケードの下流の経路であるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase: COX)-2 を選択的に阻害する 4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamid (SC-236) と 5-リポキシゲナーゼ (lipoxygenase: LO) を阻害する CJ-13610 が CCl₄ 長期投与による肝線維化を抑制する化合物として報告されている [36,37]。これらの研究は CCl₄ 誘発性の肝線維化の進展にアラキドン酸カスケードの COX-2 および 5-LO 経路が影響していることを示している。一方で、上記のような阻害剤を摂取するモデルではなく 5-LO 欠損マウスに CCl₄を長期投与する肝線維化モデルでは、肝線維化が対照群と同様に進展したという事実もある [37]。このため、IVA-PLA₂ KO マウスが CCl₄ 誘発性の肝線維化を抑制した本研究結果は、PG の主な産生経路である COX 関連経路を抑制したことによると考えられる。しかし、PGE₂には TGF-β1 産生を阻害して肝星細胞から産生されるコラーゲンの蓄積を抑制するという逆の報告もあり [38]、未だ議論中である。したがって、IVA-PLA₂ 欠損による CCl₄ 誘発性の肝線維化の抑制には PGE₂以外の PG 類の発現減少も関与した可能性が考えられる。

本研究では、IVA-PLA₂ 欠損が CCl₄ 誘発性の肝星細胞の活性化を抑制した。また同時に、IVA-PLA₂ 欠損は CCl₄ 誘発性の単球・マクロファージやクッパー細胞の浸潤を減少させた。さらに、IVA-PLA₂ 欠損は肝組織中の単球走化性因子 MCP-1 の mRNA 発現レベルも抑制させた。以上の結果から、IVA-PLA₂ 欠損は CCl₄ 誘発性の炎症反応に伴う単球、マクロファージ、クッパー細胞の浸潤を減少させると考えられる。COX-2 阻害剤の SC-236 や 5-LO 阻害剤の

CJ-13610 は肝組織中に存在する非実質細胞のアポトーシス性細胞死を誘導する [36,37]。これらはアラキドン酸カスケード関連分子の阻害がマクロファージやクッパー細胞のアポトーシス性細胞死に関与することを示唆している。一方、IVA-PLA₂ KO マウス由来の腹腔内マクロファージでは酸化 LDL 刺激によるアポトーシス性細胞死が抑制されたという報告もある [39]。しかし、本研究におけるマクロファージ・クッパー細胞を検出する F4/80 の免疫組織染色では、同腹で CCl₄ 非投与の IVA-PLA₂ KO マウスと WT マウス間の F4/80 陽性細胞数に明らかな違いはなかった。したがって、IVA-PLA₂ KO マウスにおける CCl₄ 誘発性の肝組織中のマクロファージの増加の抑制機序は、MCP-1 による単球浸潤抑制以外にもマクロファージ自身のアポトーシス性細胞死による減少が関与した可能性もあるため、IVA-PLA₂ を介した酸化ストレス誘発性のマクロファージのアポトーシスのメカニズムについてもさらなる研究が必要であると考えられる。

肝線維化の発症や進展には、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞、NKT 細胞のようなマクロファージやクッパー細胞以外の他の非実質細胞も関与する。CD8 陽性 T 細胞は肝星細胞の活性化を促進するが [29]、NK 細胞は活性化肝星細胞の細胞死を誘導させて肝線維化を抑制する [40-43]。また、NKT 細胞は NK 細胞を介して肝星細胞の活性化を抑制する [44]。本研究では、FACS 解析により CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞のような炎症性細胞数を測定したが、WT マウスと KO マウスとの間に差は認められず、これらの細胞は IVA-PLA₂ 欠損での CCl₄ 誘発性肝線維化の抑制に関与しなかったと証明された。そのため、IVA-PLA₂ 阻害剤は CD8 陽性 T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞のような炎症性細胞を標的とした治療薬と併用できる可能性がある。

本研究では、CCl₄ 投与により肝組織での MCP-1 mRNA 発現が誘導されており、同腹の WT マウスに比し IVA-PLA₂ KO マウスではその発現が著しく減少した。MCP-1 は別名 CCL2 と呼ばれており、C-C ケモカインβサブファミリーのプロトタイプとして知られ、単球、リンパ球、肝星細胞などの間葉細胞に対して強い遊走能を示す [45,46]。近年、ヒト初代単球細胞では 5-LO 関連経路で産生されるロイコトリエン B₄ が MCP-1 の mRNA およびタンパク質発現を誘導したこと [47] や、肝星細胞では COX 由来の産物が MCP-1 の発現を調節したことが報告されている [48]。このため、5-LO および COX 経路は、MCP-1 の誘導に対してリガンドもしくは細胞依存的に炎症反応を促進させる役割を果たしているのかもしれない。したがって、IVA-PLA₂ 阻害により 5-LO や COX 経路を同時に阻害することは肝組織中の肝実質細胞、単球、マクロファージ、クッパー細胞、肝星細胞などの炎症反応に対して有益な抑制効果を示すと考えられる。また、MCP-1 KO マウスを用いた実験では、MCP-1 欠損がマクロファージやクッパー細胞の浸潤を阻害せずに MCD 食誘発性の肝線維化の進展を抑制したことが証明されている [49]。一方、MCP-1 の受容体である CCR2 の欠損では、マクロファージおよびクッパー細胞の浸潤を抑制することや、胆管結紮後の肝線維化の進行を抑制することが報告されている [50]。マクロファージおよびクッパー細胞の浸潤に対する MCP-1 の役割を明確にするにはさらなる研究が必要であるが、いずれにしても MCP-1 は肝線維化の進展において中心的な

要因であることに変わりはない。したがって、本研究結果は CCl₄ が肝線維化を進展させた要因の一部に IVA-PLA₂ 依存性の MCP-1 の発現誘導が関与したと示唆する。

今回の我々の行った実験条件下では、MCP-1 産生に関する主な細胞の特定はできなかった。しかし、我々は NK 細胞、NKT 細胞、CD8 陽性 T 細胞ではなく、マクロファージやクッパー細胞が CCl₄ 誘発性の肝星細胞の活性化において重要な役割を果たしていると考えている。これは、微量のジフテリア毒素の投与によりマクロファージを枯渇させた CD11b-DTR マウスでの報告とも一致する [51]。肝線維化形成時のマクロファージ枯渇は結果的に肝障害の軽減や活性化肝星細胞の減少につながる。今後、肝線維化の抑制に関与した細胞種を明確にする必要があるが、CCl₄ で誘発される MCP-1 を介したマクロファージやクッパー細胞の浸潤において IVA-PLA₂ が中心的な役割を果たしていると考えられる。

以上をまとめると、本研究から IVA-PLA₂ 欠損が HFCD 摂取または CCl₄ 投与誘発性の肝線維化を抑制することが明らかとなった。これは COX-2 や 5-LO の薬理的阻害が肝線維化の進行を抑制するという他の報告を裏付ける [36]。さらに、IVA-PLA₂ 欠損による肝線維化の抑制には、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞や NKT 細胞のような他の炎症性細胞ではなく、マクロファージやクッパー細胞の浸潤阻害が関与していることが示唆された。

第2章 新規 IVA-PLA₂ 特異的阻害剤 (ASB14780) の NASH 進展阻止効果

第1節 緒言

現在、NASH に対する薬物療法では肥満と同時に起こる代謝性疾患に対して使われるスタチン、降圧薬、β-ブロッカーが用いられる。しかし、これらの薬物療法は劇的な効果はなく、NASH である患者の罹患率や死亡率は未だ減少しないため、効果的な薬物治療の開発が急務である。一方、最近 NASH が 2 型糖尿病と強い関係性を持つ [52] ことから、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体γ (peroxisome proliferator activated receptor γ: PPARγ) を活性化する物質であるピオグリタゾンが治療薬物として注目されており、肝臓に直接作用する薬物としての有効性が報告されている [53-55]。しかし、ピオグリタゾンを用いた長期的な治療では、体重増加 [55]、うっ血性心不全 [56] や膀胱がん [57] の危険性の増加、あるいは骨密度の減少 [58] などの副作用が報告されているため、ピオグリタゾンに代わる NASH 治療薬が必要である。

当研究室では、第1章の結果も含めた以前の研究において IVA-PLA₂ KO マウスが HFCD 誘発性の脂肪肝や肝線維化、および CCl₄ 誘発性の肝線維化を劇的に軽減させることを見出した [7]。これらの結果は、IVA-PLA₂ 阻害剤が NASH における治療薬の有効な候補であることを示唆している。IVA-PLA₂ 特異的阻害剤はすでに、ワイス・ファーマシューティカルズ社、塩野義製薬社、アストラゼネカ社および Kokotos と Dennis らの研究グループにより開発されている。その化合物の構造はそれぞれインドール誘導体 [59-62] やピロリジン塩基複合体 [63-66] やプロパン-2-オン [67-70] や 2-オキシミド複合体 [71-74] を含有するものである。しかし、これらの化合物は経口投与不可のため、治療薬として用いることができない。一方、我々の共同研究者であるアスピオファーマの研究グループは最近、経口投与でも IVA-PLA₂ 阻害活性を示す新規化合物 ASB14780 {3-[1-(4-phenoxyphenyl)-3-(2-phenylethyl)-1H-indol-5-yl] propanoic acid 2-amino-2-(hydroxymethyl) propanone-1,3-diol salt} を新たに開発した [75]。ASB14780 はインドール誘導体を含有し、疎水性の長鎖アルキル基を含まないため生物学的利用能が高い [75]。ASB14780 のヒト IVA-PLA₂ に対する IC₅₀ 値が 20 nM であり、*in vitro* において優れた IVA-PLA₂ 阻害活性を示す。一方、他の PLA₂ アイソフォームである sPLA₂-IA (コブラ毒由来)、sPLA₂-IIA (ガラガラヘビ毒由来)、sPLA₂-III (ハチ毒由来) および sPLA₂-IB (ブタ膵臓由来) に対する IC₅₀ 値は~10 μM であり阻害活性が極めて低い [75]。そこで、本章では ASB14780 の脂肪肝や肝線維化の進展に対する抑制効果を検証するために、脂肪肝または肝線維化を誘発する NASH モデルマウスに ASB14780 を経口摂取させた。

第2節 材料および方法

2.2.1. 実験動物

5-7週齢の雄性のC57BL/6Nマウス (CLEA Japan, Sizuoka, Japan) を、1週間の予備飼育の後、実験に使用した。すべてのマウスは、12時間の明暗サイクル、1ケージあたりの収容数を5匹までとし、自由摂食および自由摂飲の環境下で飼育した。なお、本研究課題は京都薬科大学動物実験委員会の承認の下に行った。

2.2.2. IVA-PLA₂阻害剤 (ASB14780) 懸濁液の調製

IVA-PLA₂阻害剤であるASB14780は、株式会社アスピオファーマから供与いただいた合成化合物である。投与媒体として、ヒドロキシプロピルセルロース (hydroxypropyl cellulose: HPC) が0.5%になるように滅菌水で溶解した溶液 (0.5% HPC) を用意した。ASB14780はマウスの体重ごとに、0.1または0.3 mg/kg 体重となるように1日1回経口投与した。ASB14780の対照として、0.5% HPCを同様に投与した。

2.2.3. CCl₄誘発性肝線維化モデルマウスの作製およびASB14780の投与

ASB14780の肝線維化の予防効果を検討する実験は、8週齢の雄性の野生型 (C57BL/6N) マウスを用い、対照群、CCl₄単独投与群、CCl₄および低用量ASB14780投与群、CCl₄および高用量ASB14780投与群の4群に分別して行った。肝線維化モデルは、CCl₄が0.31 mL/kg 体重となるように4% CCl₄を週2回、6週間腹腔内投与することで作製した。ASB14780はCCl₄投与の1時間前にゾンデを用いて0.1または0.3 g/kg 体重でCCl₄の投与期間中、連日経口投与した。CCl₄の対照群にはCCl₄の溶媒であるコーンオイルを腹腔内に投与した。また、ASB14780の対照として投与媒体である0.5% HPCを経口投与した。いずれのマウスもCCl₄最終投与から48時間後に解剖し、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。

また、ASB14780の肝線維化の改善効果を検討する実験は、8週齢の雄性の野生型 (C57BL/6N) マウスを用いて下記の4群に分別して行った。6週間CCl₄単独投与群をGroup A、9週間CCl₄単独投与群をGroup B、9週間CCl₄投与および高用量 (0.3 g/kg 体重) ASB14780を並行投与する群をGroup C、9週間CCl₄投与および高用量ASB14780をCCl₄投与6週目から並行投与する群をGroup Dとした。いずれのマウスもCCl₄最終投与から48時間後に解剖し、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。

2.2.4. HFCD誘発性の脂肪肝モデルマウスの作製およびASB14780の投与

ASB14780の脂肪肝予防効果を検討する実験は、6週齢の雄性の野生型 (C57BL/6N) マウスを用いて以下の5群に分別して行った。普通食 (ND; 5.3%脂肪, コレステロール不含) を16週間摂取させ0.5% HPCを連日経口投与した群をGroup 1、NDを16週間摂取させASB14780 (0.3 g/kg 体重) を連日経口投与した群をGroup 2、高脂肪高コレステロール食 (HFCD; 20%脂

肪、1.25% コレステロール) を 16 週間摂取させ 0.5% HPC を連日経口投与した群を Group 3、HFCD を 16 週間摂取させ ASB14780 (0.3 g/kg 体重) を連日経口投与した群を Group 4、HFCD を 16 週間摂取させ 0.5% HPC を 10 週間連日経口投与した後に ASB14780 (0.3 g/kg 体重) を 6 週間連日経口投与した群を Group 5 とした。なお、ASB14780 は 17:00 に HFCD の投与期間中ゾンデを用いて 0.3 g/kg 体重で、ND または HFCD 摂取期間中に連日経口投与し、ASB14780 の対照として 0.5% HPC を投与した。ND および HFCD はいずれも自由摂食させた。いずれのマウスも 6 時間の絶食後に解剖し、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、肝組織および精巣上体脂肪を採取した。

2.2.5. 血清中のバイオマーカーの測定

解剖時に下大静脈から採取した血液は、室温で 1 時間放置後、10,000 g、室温で 10 分間遠心分離した。上清は、血清として -80°C で保存し、バイオマーカーの測定前に氷中で溶解して 10,000 g、4°C で 5 分間遠心分離後に使用した。肝障害の指標となるアラニンアミノトランスフェラーゼ (AST: alanine aminotransferase) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (ALT: aspartate aminotransferase) 活性は、トランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を用いて測定した。また、トリグリセリド (TG: triglyceride) は、トリグリセライド E-テストワコー (Wako Pure Chemical Industries) を用いて測定した。

2.2.6. 肝組織中の CYP2E1 活性測定

CYP2E1 活性の測定は Chang TK らの方法を参考にした [76]。試料はコントロール群の肝組織を用いた。コーンオイル最終投与から 48 時間後に解剖したマウスの肝組織 (30 mg) に 3 倍量の緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M KCl] を加え、ダウンス型ホモジナイザーで破碎した。この肝臓懸濁液を 9,000 g、4°C で 20 分間遠心後、遠心上清をさらに 105,000 g、4°C で 60 分間の超遠心によりマイクロソーム画分 (沈殿) を得た。マイクロソーム画分は 90 μ L の Assay buffer [50 mM KPO₄ (pH 7.4)] に懸濁した。また、この懸濁液の一部を RIPA buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium cholate, 0.1% SDS] で溶解し、Bradford 法によりタンパク質定量を行った。肝マイクロソーム懸濁液 (45 μ L) は、37°C で 5 分間温めた Reaction buffer [Assay buffer, 100 nM *p*-nitrophenol, NADPH regenerating system solution A, NADPH regenerating system solution B] に 5 mg/mL になるように加え、湯浴を用いて 37°C で 90 分間反応させた。一方、*in vitro* における ASB14780 の活性は、未処理の WT マウスの肝組織のマイクロソーム懸濁液 (45 μ L) に Reaction buffer を加え、37°C で 120 分間インキュベートした。反応後、3.3% (v/v) TCA にて酵素反応を止め、10,000 g で 5 分間遠心した。上清を 96 well プレートに 100 μ L 入れ、さらに 0.67 M NaOH を加えてマイクロプレートリーダーを用いて 535 nm の吸光度を測定した。また、吸光度は 95°C で 5 分間熱処理により不活性化したマイクロソーム懸濁液で補正した。検量線は *p*-nitrocatechol の量と吸光度を用いて作成し、未知検体の肝マイクロソーム画分の CYP2E1 により変換された *p*-nitrocatechol の量を求め、CYP2E1 の活性

を p-nitrocatechol (nmol)/min/mg microsomal protein で表した。

2.2.7. 組織学的解析

麻酔下のマウスの心臓から冷生理食塩水を灌流し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓の一部は、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定して包埋した。包埋した肝臓は、ミクロトームを用いて 5 μ m の厚さで薄切し、組織切片を MAS コートスライドガラス (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に貼付した。切片は脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオシン (H&E) またはピクロシリウスレッドで染色した。染色した切片は、倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用い、画像を 1,360 \times 1,240 pixels に設定して最大解像度で撮影した。ピクロシリウスレッド染色により赤く染まったコラーゲン繊維の定量は、U.S. National Institutes of Health software ImageJ 1.47v (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) を用いて行った。

2.2.8. 免疫組織染色

10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した肝臓は、30%スクロースで 1 週間置換した後、O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) と 30%スクロースを 1:1 で混和した溶液で組織片を包埋した。包埋した肝臓はクライオスタットを用いて 10 μ m の厚さで薄切し、この組織切片は MAS コートスライドガラスに貼付した。組織切片は免疫染色の前処理として、Retrievagen A at pH 6.0 (BD Biosciences, Boston, MA, USA) に浸し 90°C で 10 分間賦活化した。その後、 α -SMA 免疫染色用の切片は、Mouse-on-Mouse blocking solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で 1 時間インキュベートした。ブロッキングは、10% horse 血清 (α -SMA 用) または 10% rabbit 血清 (F4/80 用) 含有の Blocking buffer [0.3% Triton X-100 in PBS (-)] に avidin-blocking solution を混和した溶液で室温にて 1 時間インキュベートした。一次抗体反応は、biotin-blocking solution を混和した blocking buffer にて 1,000 倍希釈した α -SMA (Sigma Aldrich)、または 100 倍希釈した F4/80 (CI: A3-1 clone; Abcam) を用い、4°C で一晩放置した。二次抗体反応前にメタノールで希釈した 0.3% 過酸化水素により室温で 30 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ除去を行った。二次抗体反応は、blocking buffer にて 1,000 倍希釈した biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories) または 800 倍希釈した biotinylated rabbit anti-rat IgG (Vector Laboratories) を用い、室温で 30 分間行った。抗体抗原複合体は、Vectastain Elite ABC Standard Kit (Vector Laboratories) と Metal enhanced DAB substrate kit (Thermo Scientific, Rockland, IL, USA) を用いて検出した。また、対比染色としてマイヤーヘマトキシリンによって核を染色した。

2.2.9. ウェスタンブロット解析

-80°C にて凍結した肝組織からタンパク質を、protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics, Indianapolis) を含む冷 Lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% sodium deoxycholate] 中でポッター型ホモジナイザーを用いて氷冷し

ながら抽出した。得られたホモジネートは 15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、タンパク質抽出液として上清を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法により定量した [24]。90 µg の肝タンパク質は、7.5% SDS-PAGE にて分離後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。ニトロセルロース膜は、Blocking buffer [3% スキムミルクおよび 0.05% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T)] と室温で 1 時間インキュベートした。次いで、Can Get Signal solution 1 (TOYOBO) にて 1,000 倍希釈した IVA-PLA₂ 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、blocking buffer にて 1,000 倍希釈した α-SMA 抗体 (Sigma Aldrich)、あるいは blocking buffer にて 1,000 倍希釈した α-Tubulin 抗体 (Cell Signaling Technology) と 4°C で一晩反応させた。翌日、ニトロセルロース膜を TBS-T にて洗浄後、IVA-PLA₂ 抗体 に対して Can Get Signal solution 2 (TOYOBO) にて 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) と、また α-SMA 抗体および α-Tubulin 抗体に対して blocking buffer で 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) と室温で 1 時間反応させた。バンドの検出は、ケミルミワンスーパー (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて LAS-3000 analysis system (Fujifilm, Tokyo, Japan) により行った。また、バンドの定量は ImageJ software を用いて行った。

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

-80°C にて凍結した肝組織は、RNAiso Plus (Takara Bio, Shiga, Japan) 溶液中でダウンス型ホモジナイザーを用いて破碎し、添付の方法に従って総 RNA を抽出した。逆転写は、random primer および ReverTra Ace 逆転写酵素 (Toyobo, Osaka, Japan) を用い、逆転写反応溶液 20 µL 中に総 RNA が 2 µg 相当量になるように調製し、30°C で 10 分、42°C で 40 分、99°C で 5 分の条件で行った。合成した cDNA は、SYBR Green I (Takara Bio) および Table 1 に示したプライマーと混和し、ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) または LightCycler Nano Real-Time PCR system (Roche, Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて、初期変性を 95°C で 30 秒、変性を 95°C で 5 秒、アニーリング/伸長を Table 2-1 に示した温度で 34 秒、40 サイクルの 2 step PCR で反応させた。mRNA 発現量は検量線法を用いて定量し、18S ribosomal RNA または 36B4 により補正した。

2.2.11. 肝組織における脂質含有量の測定

HFCD 食誘発性の脂肪肝モデルマウスにおける肝組織中の脂質は Folch 法を用いて抽出した。肝組織 (50 mg) を Protease inhibitors を含む 200 µL の精製水にてダウンス型ホモジナイザーを用いて破碎し、1.8 mL の chloroform-methanol (2:1) に 150 µL の肝破碎液を加えて一晩放置して脂質を抽出した。1,500 rpm で 5 分間遠心後、下層を新しい試験管に 1.1 mL 移し、全量の 1/5 量の 0.1% KCl を加えて混和した。再び 1,500 rpm で 5 分間遠心後、下層を新しい試験管に移し、窒素乾固により脂質を回収した。脂質は溶解液 [tert-butylalchol, tritonX-100, methanol (3:1:1)] により溶解し、TG をトリグリセライド E-テストワコー (Wako Pure Chemical

Industries) を用いて測定した。タンパク質濃度は、肝組織懸濁液の一部を RIPA buffer で溶解して Bradford 法により定量した。

2.2.12. 統計解析

データは、平均値±標準誤差 (standard error: SE) で示した。独立した群の平均値の有意差を検定するため、Tukey-Kramer post-hoc test に従って次元分散分析 (one-way analysis of variance: ANOVA) にて解析した。P<0.05 は、有意差があるとみなす。統計的計算は、Macintosh 社に対応の Mac statistics Ver. 2.0 (Excel addin) (ESUMI Co., Tokyo, Japan) にて行った。

Table 2-1. Primers used in quantitative real time PCR.

Gene		Sequence	Annealing (°C)
Colla2	F	5'-CCGTGCTTCTCAGAACATCA-3'	60
	R	5'-CTTGCCCCATTCATTTGTCT-3'	
α -SMA	F	5'-CAGCGGGCATCCACGAA-3'	60
	R	5'-GCCACCGATCCAGACAGA-3'	
TGF- β 1	F	5'-GGATACCAACTATTGCTTCAGCTCC-3'	60
	R	5'-AGGCTCCAAATATAGGGGCAGGGTC-3'	
MCP-1	F	5'-TGCATCTGCCCTAAGGTCTTC-3'	63
	R	5'-AAGTGCTTGAGGTGGTTGTGG-3'	
CD11b	F	5'-TGGTTTTAGGAGCACCTCGG-3'	62
	R	5'-TCAGCGTCCATGTCCACAGA-3'	
RANTES	F	5'-TCCAATCTTGACGTCGTGTTTG-3'	60
	R	5'-TCTGGGTTGGCACACACTTG-3'	
18S rRNA	F	5'-TTCGAACGTCTGCCCTATCA-3'	62
	R	5'-ATGGTAGGCACGGCGACTA-3'	
CD36	F	5'-GACCTCACTGAGATTCGGGATA-3'	63
	R	5'-GGTCCTAGACCAGTGTCTGAGC-3'	
L-FABP	F	5'-GCAGAGCCAGGAGAACTTTG-3'	62
	R	5'-GGGTCCATAGGTGATGGTGAG-3'	
CPT1 α	F	5'-GTCAAGCCAGACGAAGAACA-3'	63
	R	5'-CGAGAAGACCTTGACCATAG-3'	
SREBP1c	F	5'-ATCGGCGCGGAAGCTGTCTGGGGTAGCGTC-3'	68
	R	5'-ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT-3'	
ACC	F	5'-GCCTCTTCCTGACAAACGAG-3'	63
	R	5'-TAAGGACTGTGCCTGGAACC-3'	
FAS	F	5'-GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT-3'	63
	R	5'-AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT-3'	
SCD1	F	5'-GTGAGGCGAGCAACTGACTAT-3'	60
	R	5'-GACGGATGTCTTCTTCCAGGT-3'	
DGAT1	F	5'-GGATCTGAGGTGCCATCGT-3'	62
	R	5'-CCACCAGGATGCCATACTTG-3'	
HSL	F	5'-TCAACCGACCAGGAGTGCT-3'	62
	R	5'-CTCGTTGCGTTTGTAGTGCTC-3'	
DGAT2	F	5'-GGCTACGTTGGCTGGTAACTT-3'	62
	R	5'-TTCAGGGTGA CTGCGTTCTT-3'	
MTP	F	5'-TGGACGTTGTGTTACTGTGG-3'	62
	R	5'-TCTTAGGTGTACTTTTGCCC-3'	
36B4	F	5'-GACCTCACTGAGATTCGGGATA-3'	63
	R	5'-GGTCCTAGACCAGTGTCTGAGC-3'	

Cited from Supplemental Table S1 of "Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)".

第3節 結果

2.3.1. ASB14780 経口投与による CCl₄ 誘発性の慢性肝障害の抑制

第1章で示した様に、CCl₄長期投与誘発性の肝障害は、IVA-PLA₂ KO マウスでは WT マウスに比し軽減されることが明らかとなった。そこでまず、経口摂取で活性を示す IVA-PLA₂ 阻害剤である ASB14780 が CCl₄ 誘発性の慢性的な肝障害に対して有効であるかを検証した。CCl₄は週2回6週間腹腔内投与し、ASB14780は0.1または0.3 g/kg 体重の用量で連日経口投与した。マウスの体重は、0.3 g/kg の ASB14780 あるいは CCl₄の単独投与群で ASB14780 非投与群と同程度であった (Table 2-2)。しかし、肝重量体重比は、0.3 g/kg の ASB14780 単独投与によって変動は見られなかったが、CCl₄ 単独投与群において CCl₄ 非投与群に比し有意に増加した (Table 2-2)。

次に、CCl₄ 誘発性の慢性肝障害の程度を血清中の AST および ALT レベルの測定により評価した。血清 AST および ALT レベルは、CCl₄ の投与によりそれぞれ 10 および 12 倍に上昇した (Figure 2-1A)。CCl₄により上昇した AST および ALT レベルは、ASB14780 の経口投与により ASB14780 の投与量依存的に有意な減少が認められた (Figure 2-1A)。また、肝障害時では中心静脈周辺において肝実質細胞の細胞質の空胞化や小さな核によって特徴付けられる炎症性細胞の浸潤といった組織学的特徴がみられることが知られていることから、H&E 染色を行った。CCl₄ の単独投与では細胞質の空胞化や炎症性細胞の浸潤といった肝障害および炎症亢進の組織学的特徴が観察されたが、これらの特徴は ASB14780 の並行投与により ASB14780 投与量依存的な減少がみられた (Figure 2-1B)。

CCl₄は肝実質細胞内の CYP2E1 により CCl₃ ラジカルに代謝され、肝障害を誘導する [77,78]。CYP2E1 活性が ASB14780 により阻害されないことを確認するため、CYP2E1 に特異性の高い基質である *p*-nitrophenol を用いて、*p*-nitrophenol から *p*-nitrocatechol への変換量から CYP2E1 代謝活性を測定した。CCl₄非投与 Veh 群マウスの肝ミクロソーム画分の CYP2E1 代謝活性は、ASB14780 投与の有無に関わらず同程度であった (Figure 2-1C)。さらに、CYP2E1 代謝活性における直接的な ASB14780 の影響を評価するために、野生型マウスの肝ミクロソーム画分を ASB14780 存在下で反応させた。CYP2E1 代謝活性は ASB14780 存在下でも阻害されなかった (Figure 2-1D)。以上より、ASB14780 は CCl₃ ラジカルの産生には影響を及ぼさないことが示唆された。以上の結果より、IVA-PLA₂ の阻害により CCl₄ 誘発性の慢性的な肝障害が軽減されることが示唆された。

Table 2-2. Effect of ASB14780 and CCl₄ on the body weights, liver weight and liver to body weight ratios of control and treated animals

The data are presented as means ± S.E. for six to seven individuals (Tukey-Kramer post-hoc analysis).

	ASB (0)/Veh	ASB (0.1)/Veh	ASB (0.3)/Veh	ASB (0)/CCl ₄	ASB (0.1)/CCl ₄	ASB (0.3)/CCl ₄
Body weight (g)	27.6 ± 0.9	26.0 ± 0.5	26.2 ± 0.5	26.2 ± 0.7	24.8 ± 0.2	24.4 ± 0.8
Liver weight (g)	1.20 ± 0.06	1.15 ± 0.08	1.27 ± 0.05	1.63 ± 0.09*	1.42 ± 0.12	1.50 ± 0.08
Liver weight/ Body weight (%)	4.35 ± 0.21	4.41 ± 0.29	4.86 ± 0.17	6.2 ± 0.2*	5.76 ± 0.53	6.17 ± 0.32

ASB, ASB14780; Veh, vehicle. **P* < 0.05 versus ASB(0)/Veh.

Cited from Table 1 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

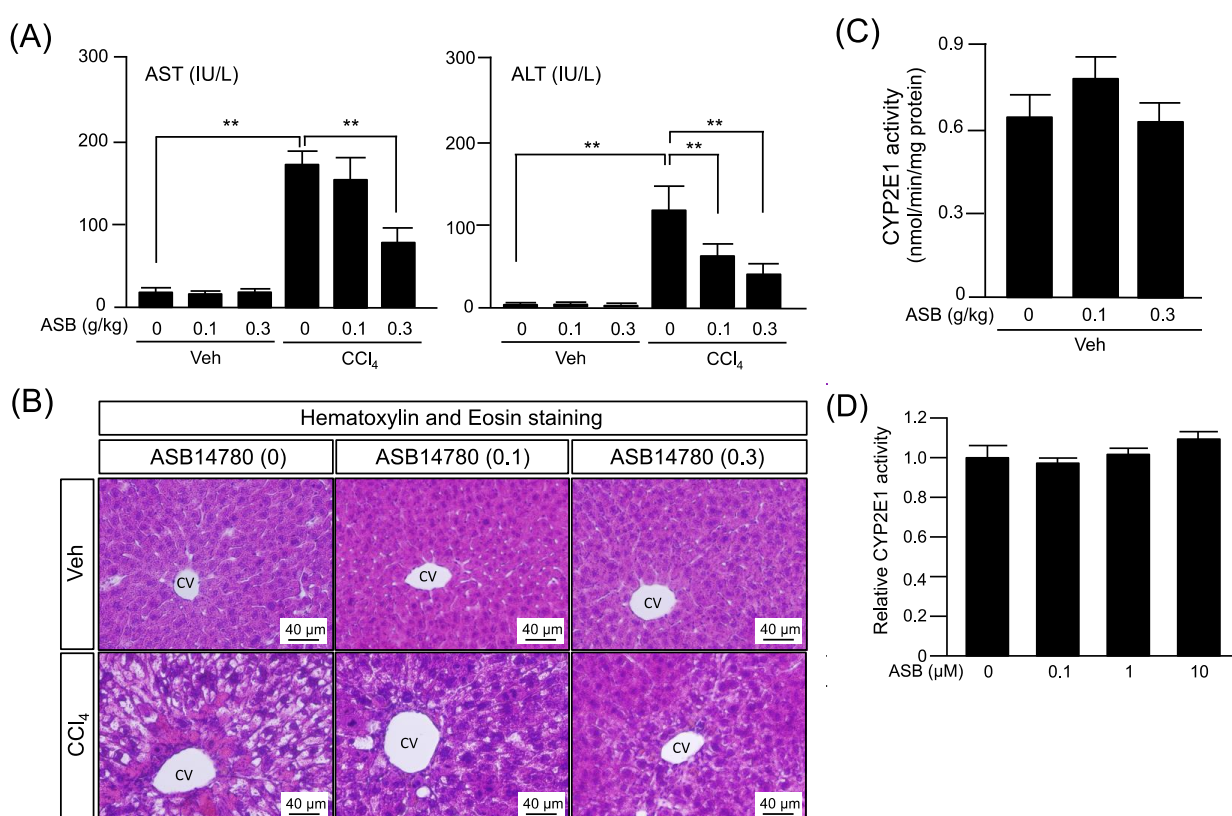


Figure 2-1. Inhibitory effect of the IVA-PLA₂ inhibitor, ASB14780, on CCl₄-induced liver injury.

Six-week-old male C57BL/6 mice were intraperitoneally administered CCl₄ in corn oil at 0.31 mL/kg (2 times/week) for 6 weeks. Mice were concomitantly administered 0.1 or 0.3 g/kg of ASB14780 by oral gavage (once a day 1 h before CCl₄ injection). All of the mice were sacrificed at 48 h after the last injection. (A) The serum levels of AST and ALT were determined using enzymatic assays. (B) Paraffin-embedded liver sections were stained with hematoxylin and eosin; Scale bar, 40 μm. (C) CYP2E1 catalyzes the oxidation of *p*-nitrophenol in mitochondrial fractions and is involved in the metabolism and toxicity of CCl₄. CYP2E1 activity was determined spectrophotometrically. The data are presented as means ± SE (n = 6–7/group) and differences were identified using analysis of variance (ANOVA) with Tukey–Kramer post-hoc analysis (***P* < 0.01). (D) CYP2E1 activity was assessed in vitro in the absence or presence of ASB14780. The data are presented as mean activity (n = 4) relative to control (0 μM) ± SE., and difference were identified using an ANOVA with a Tukey-Kramer *post-hoc* analysis. ASB, ASB14780; CV, central vein; Veh, vehicle.

Cited from Figure 1 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

2.3.2. ASB14780 経口投与による CCl₄ 誘発性の肝線維化の形成抑制

CCl₄ 長期投与による肝線維化の程度を評価するために、肝組織切片をピクロシリウスレッドで染色してコラーゲン繊維を検出した。CCl₄ 投与により増加したコラーゲン繊維の蓄積は ASB14780 の投与量依存的に減少した (Figure 2-2A)。また、ピクロシリウスレッド染色された領域の面積を ImageJ により測定したところ、線維化面積は CCl₄ 単独投与に比し ASB14780 並行投与マウスの肝臓では阻害剤投与量依存的に減少した (Figure 2-2C)。さらに、定量 RT-PCR 法により Colla2 mRNA 発現量を検討したところ、CCl₄ 投与により誘導した発現量が ASB14780 並行投与により有意に減少しており (Figure 2-2E)、ピクロシリウスレッド染色の結果と一致した。また、活性化星細胞のマーカータンパク質である α -SMA の免疫組織染色 (Figure 2-2B)、ウエスタンブロット (Figure 2-2D) および定量 RT-PCR 解析 (Figure 2-2E) を行った。 α -SMA 陽性細胞は、組織免疫染色において、溶媒のみを投与した Veh 群では ASB14780 並行投与の有無に関わらず検出されなかった。一方、CCl₄ 投与群では CCl₄ 単独投与により α -SMA 陽性細胞が多く検出されたが、ASB14780 並行投与により陽性細胞数が減少した (Figure 2-2B)。また、 α -SMA のタンパク質および mRNA 発現量は、ウエスタンブロットおよび定量 RT-PCR 解析においてそれぞれ CCl₄ 単独投与により増加したが ASB14780 並行投与により Veh 群と同程度まで減少し、組織免疫染色の結果と一致した (Figures 2-2D, 2-2E)。さらに、CCl₄ は強力な線維化促進作用を示すサイトカインである TGF- β 1 の mRNA 発現量も増加させたが、ASB14780 はその発現量を投与量依存的に減少させた (Figure 2-2E)。これらの結果は、CCl₄ 誘発性の肝線維化を抑制した IVA-PLA₂ KO マウスでの結果と一致しており、ASB14780 の経口投与により CCl₄ 誘発性の肝線維化が抑制されることが示唆された。

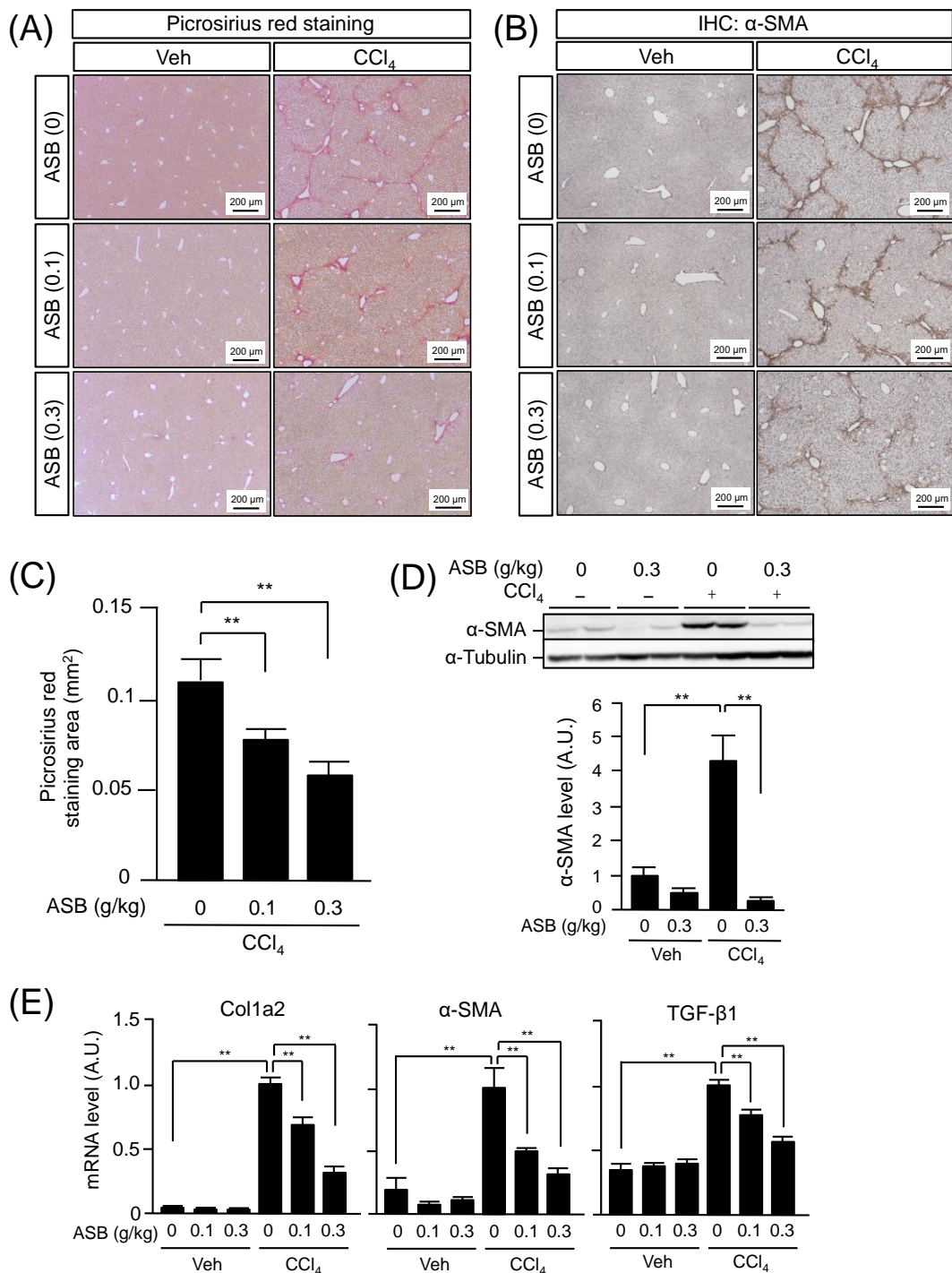


Figure 2-2. Inhibitory effects of ASB14780 on CCl₄-induced collagen deposition and activation of hepatic stellate cells.

(A) Liver sections were stained with Sirius red; Scale bar corresponds to 200 μm. (B) α-SMA expressing cells were detected using immunohistochemistry; Scale bar corresponds to 200 μm. (C) The collagen fibers stained with picrosirius red in (A) were quantified using National Institutes of Health ImageJ software program, and the expression of the α-SMA (top blot) and α-tubulin (bottom blot) proteins (D) in liver extracts was assessed using Western blot analysis. The band intensities were quantified as arbitrary units (A.U.) using National Institutes of Health ImageJ software program. (E) The expression levels of Col1a2, α-SMA, and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) mRNA were assessed using real-time RT-PCR, and were normalized to that of 18S ribosomal RNA. The data are presented as means ± S.E. (A.U., n = 6–7/group), and differences were identified using an ANOVA with a Tukey-Kramer post-hoc analysis (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). ASB, ASB14780; IHC, immunohistochemistry; Veh, vehicle.

Cited from Figure 1 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

2.3.3. ASB14780によるCCl₄誘発性肝線維化における単球およびマクロファージの遊走抑制

肝組織中への単球・マクロファージの遊走は、CCl₄の慢性的な投与により増加する [79]。そこで、CCl₄誘発性の単球・マクロファージの遊走に対するASB14780の効果について検証した (Figure 2-3)。まず、肝組織中のマクロファージを検出するために、マクロファージの表面抗原であるF4/80を免疫組織染色により検出した。Veh群では組織全体にF4/80陽性の常在性マクロファージ(クッパー細胞)の存在が確認され、ASB14780並行投与によってクッパー細胞の分布等に変化はみられなかった。一方、CCl₄投与群ではCCl₄単独投与により中心静脈周辺にF4/80陽性細胞が多く存在したが、ASB14780並行投与によりその集積が減少した (Figure 2-3A)。また、単球・マクロファージのマーカーであるCD11bのmRNA発現を定量RT-PCRにて解析したところ、組織免疫染色の結果と同様に、CD11b mRNAはCCl₄単独投与により顕著な増加みられ、ASB14780並行投与により投与量依存的な抑制がみられた (Figure 2-3B)。これらの結果は、CCl₄により誘発された単球・マクロファージの肝組織への遊走がASB14780の処理により減少したことを示唆する。さらに、単球遊走に関わる単球走化性因子であるMCP-1のmRNA発現量もASB14780並行投与により顕著に減少した (Figure 2-3B)。

第1章でも述べたように、肝線維化の進展へのTリンパ球の関与も示唆されていることから、Tリンパ球の走化性因子であるRANTESのmRNA発現量を評価した。RANTESのmRNA発現量はCCl₄投与により著しく増加したが、ASB14780の並行投与によるRANTESのmRNA発現量の抑制効果はほとんど見られなかった (Figure 2-3B)。さらに、肝組織でのIVA-PLA₂の発現レベルに対するASB14780の影響を評価するために、定量RT-PCRとウエスタンブロット解析を行った。CCl₄投与によりPla2g4a mRNA発現量およびIVA-PLA₂タンパク質は著しく増加し、ASB14780の並行投与により顕著に減少した (Figure 2-4)。肝臓でのCCl₄誘発性の炎症の増幅がASB14780により阻害されたことによって、IVA-PLA₂の誘導が減少したと推測される。したがって、ASB14780はIVA-PLA₂を阻害することで、肝組織への単球およびマクロファージの浸潤阻害を伴うCCl₄誘発性の炎症亢進を阻害し、肝線維化の進行を軽減させたと考えられる。

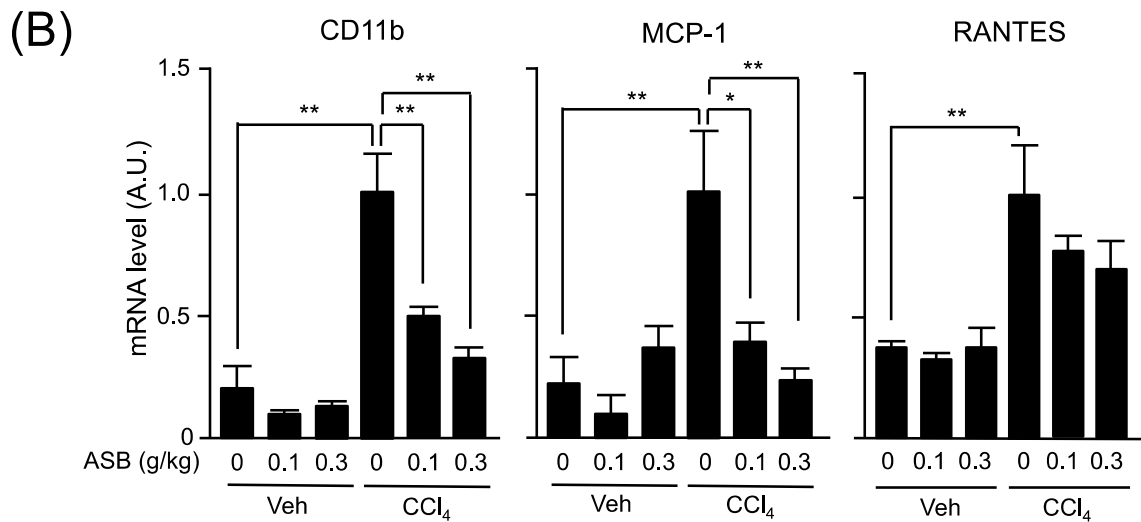
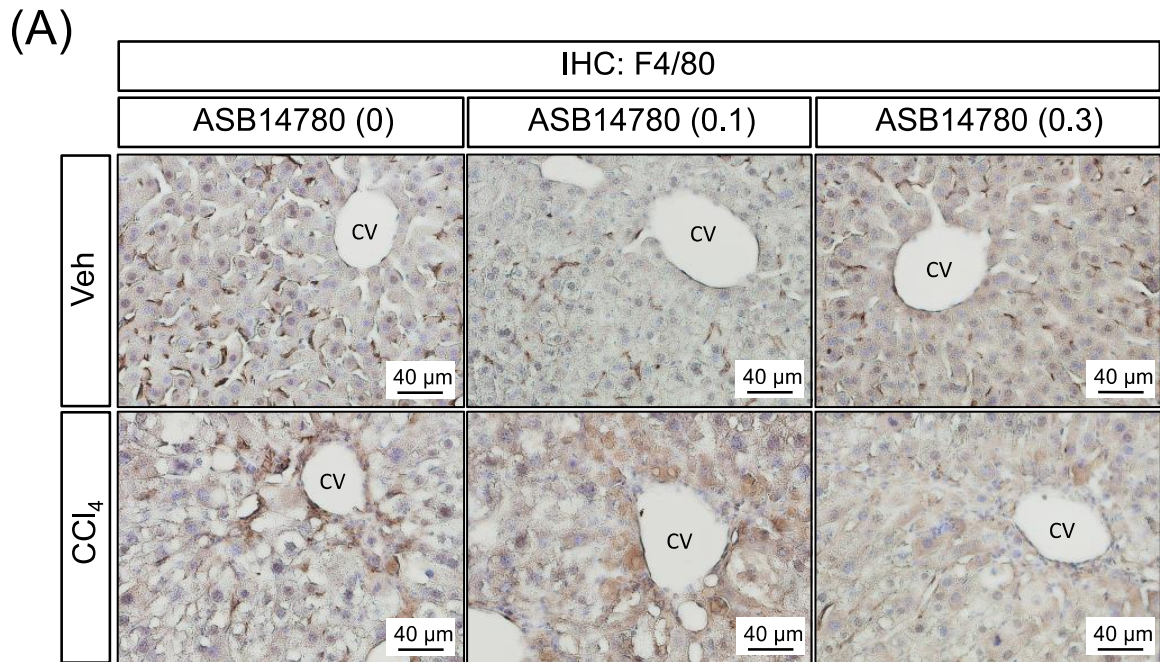


Figure 2-3. Reduced CCl₄-induced infiltration of macrophages and Kupffer cells into the liver after administration of ASB14780

(A) The CCl₄-induced infiltration of macrophages and Kupffer cells was assessed by immunohistochemical staining with an anti-F4/80 antibody; Scale bar corresponds to 40 μm. (B) The expression levels of MCP-1, CD11b, and RANTES mRNA were determined using real-time RT-PCR and were normalized to that of 18S ribosomal RNA. The data are expressed as means ± S.E. [arbitrary units (A.U.), n = 6–7/group], and differences were identified using an ANOVA with a Tukey–Kramer post-hoc analysis (**P* < 0.05; ***P* < 0.01). ASB, ASB14780; Veh, vehicle.

Cited from Figure 3 of “Kanai et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 356, 604-614 (2016)”.

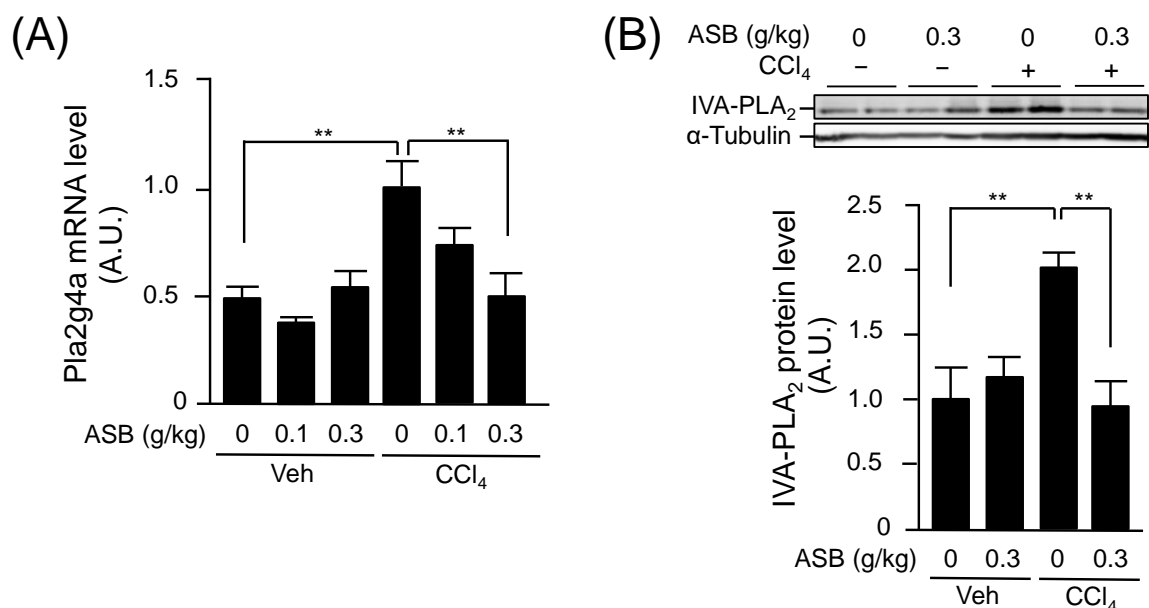


Figure 2-4. Reduction of CCl₄-induced IVA-PLA₂ levels after the administration of ASB14780

(A) The expression levels of Pla2g4a mRNA were assessed using real-time RT-PCR, and were normalized to that of 18S ribosomal RNA. (B) The levels of IVA-PLA₂ (top blot) and α -tubulin (bottom blot) proteins in the liver extracts was assessed using Western blot analysis. The band intensities were quantified using the National Institutes of Health ImageJ software program. The data are expressed as the means \pm S.E. [arbitrary units (A.U.), $n = 6-7$ /group], and differences were identified using an ANOVA with a Tukey-Kramer post-hoc analysis (** $P < 0.01$). ASB, ASB14780; Veh, vehicle.

Cited from Figure 4 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

2.3.4. ASB14780 による CCl₄ 誘発性肝線維化の進展抑制

肝線維化を発症した患者の薬物治療は、通常、疾患の発症後に開始される。そのため、既に形成された肝線維化に対する ASB14780 の効果を検証することは臨床的意義が高い。そこで、この効果を以下に示した 4 群のマウスを準備し検証した。CCl₄ を 6 週間単独投与したマウスを Group A、CCl₄ を 9 週間単独投与したマウスを Group B、CCl₄ を 9 週間投与した期間中 ASB14780 も並行投与したマウスを Group C、さらに CCl₄ を 6 週間単独投与後に CCl₄ を 3 週間投与した期間中 ASB14780 も並行投与したマウスを Group D とした (Figure 2-5A)。肝障害の程度を示す AST および ALT レベル (Figure 2-5B) やピクロシリウスレッド染色で可視化されたコラーゲン繊維の染色面積 (Figures 2-5C, 2-5D) は、Group A および B で同程度に高く、6 週間の CCl₄ 投与で十分に肝線維化が形成された状態にあると示唆された。一方、Group C および D の AST および ALT レベルやコラーゲン繊維の染色面積は、Group B に比し顕著に減少した (Figures 2-5.B-D)。したがって、ASB14780 はすでに形成された線維化状態であっても肝線維化の進展抑制効果をもつことが示唆された。

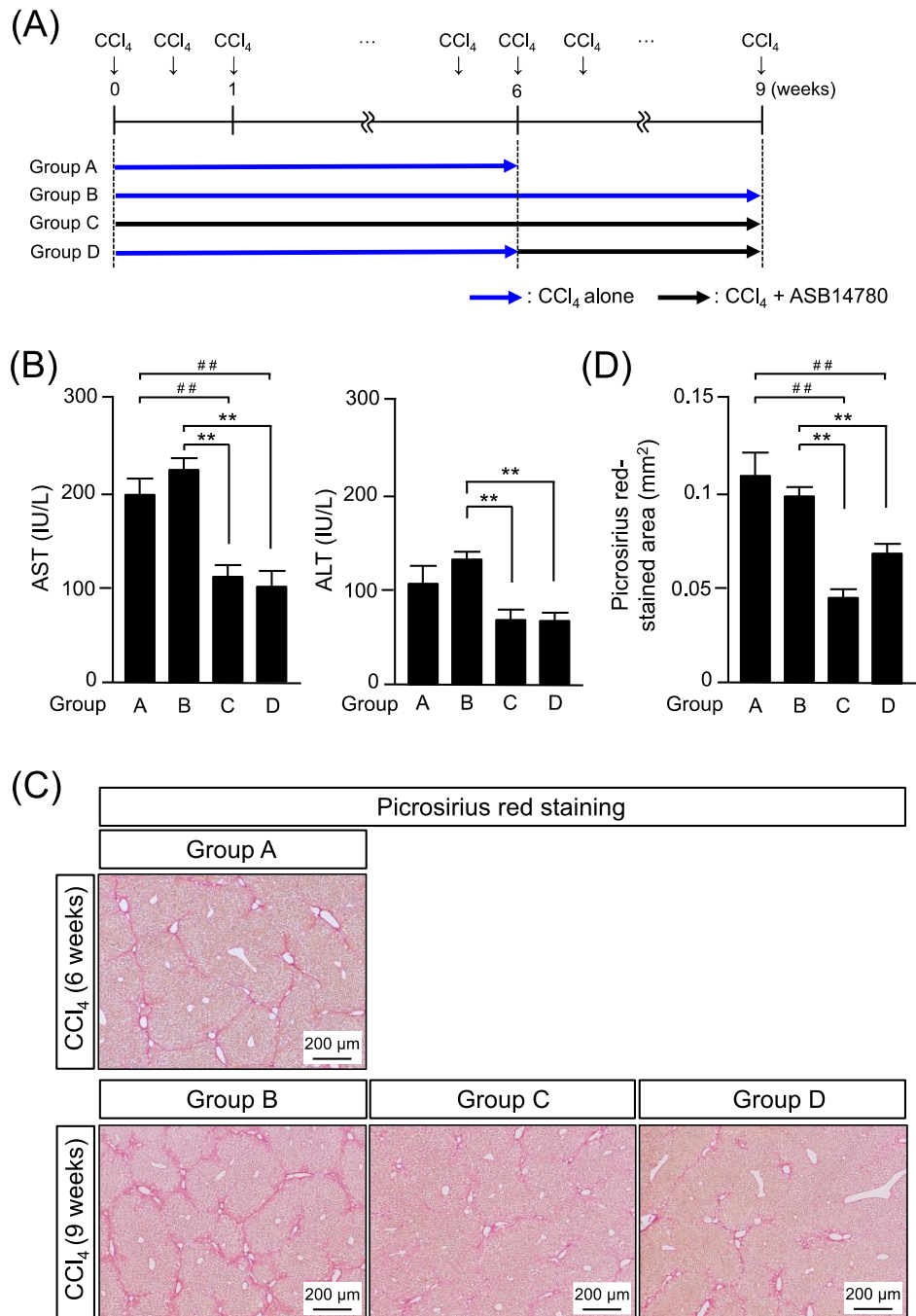


Figure 2-5. Reduction of CCl₄-induced hepatic fibrosis by the administration of ASB14780 after hepatic fibrosis had already developed

Hepatic fibrosis was induced in 6-week-old mice following twice-weekly intraperitoneal injections of CCl₄ in corn oil (0.31 mL/kg). The mice were sacrificed 48 h after the last injection. (A) Group A was injected with CCl₄ for 6 weeks, and groups B, C, and D were injected with CCl₄ for 9 weeks. In addition, group C received 0.3 g/kg ASB14780 by oral gavage every day, administered 1 hour before CCl₄ injection. After 6 weeks of CCl₄ treatment, group D received 0.3 g/kg ASB14780 for another 3 weeks. (B) The serum AST and ALT levels were determined using enzymatic assays. (C) Liver sections were stained with picrosirius red; Scale bar corresponds to 200 μm. (D) The number of collagen fibers was quantified by measuring red areas using the ImageJ software program. The data are presented as the means ± S.E. (n = 6–7/group), and differences were identified using an ANOVA with a Tukey-Kramer post-hoc analysis (***P* < 0.01; ##*P* < 0.01).

Cited from Figure 5 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

2.3.5 ASB14780 による HFCD 誘発性の脂肪肝の抑制

以前の研究では、HFCD を摂取した IVA-PLA₂ KO マウスにおいて脂肪肝の進展の抑制がみられた [17]。本研究では、HFCD 誘発性の脂肪肝の進展に対する ASB14780 の効果を解明するために、まず以下に示す 4 群を用いて検証した。普通食 (ND) を摂取したマウスを Group 1、ND 摂取および ASB14780 を並行投与したマウスを Group 2、HFCD を摂取したマウスを Group 3、および HFCD 摂取および ASB14780 を並行投与したマウスを Group 4 とし、摂食期間をそれぞれ 16 週間とした。マウスの体重と肝重量は、ND 摂取マウスでは、ASB14780 の有無に関わらず一定であった (Group 1 vs. Group 2, Figure 2-6 および Table 2-3, n.s., two-way ANOVA)。一方、Group 1 に比し Group 3 で体重と肝重量は著しく増加し (Figure 2-6, Table 2-3, $p < 0.00001$, two-way ANOVA)、16 週間の HFCD 摂取による体重増加と肝肥大の誘発が示唆された。これに対して、HFCD を摂取し ASB14780 を並行投与したマウスでは、HFCD 摂取による体重増加と肝肥大をほぼ完全に抑制した (Group 3 vs. Group 4, Figure 2-6 および Table 2-3, $p < 0.00001$, two-way ANOVA)。次いで、すでに進展した脂肪肝に対する ASB14780 の効果を検証するために、16 週間の HFCD 摂食および最後の 6 週間のみ ASB14780 を並行投与したマウスを Group 5 とし、各群と比較した。HFCD を摂取した群の間では摂食量の変化がないにも関わらず (Table 2-3)、Group 5 のマウスの体重は、HFCD のみ投与した Group 3 のように増加せず、HFCD と ASB14780 の並行投与群である Group 1 レベルにまで減少した (Figure 2-6B)。

また、肝組織切片の HE 染色による組織学的変化においても、ASB14780 を投与した Group 4 および Group 5 では Group 3 に比し微小空胞変性が劇的に減少した (Figure 2-7A)。さらに、HFCD 摂取に関連して増加する肝組織中のトリグリセリド量も ASB14780 の並行投与により減少した (Group 3 vs. Group 4 および Group 5, Figure 2-7B)。一方、血清中のトリグリセリド量は、ND 摂取の Group 1 に比し HFCD 摂取の Group 3 では高いレベルで検出されたが、ASB14780 の同時または後からの並行投与では減少しなかった (Group 4 および Group 5, Figure 2-7B)。これらの結果は、ASB14780 が HFCD 摂取により増加する血中のトリグリセリド量や摂食量に対しては影響しないが、肝組織中のトリグリセリド量を減少させ、ASB14780 が脂肪肝の形成過程のみならず既に形成された脂肪肝の進展も抑制することを示している。

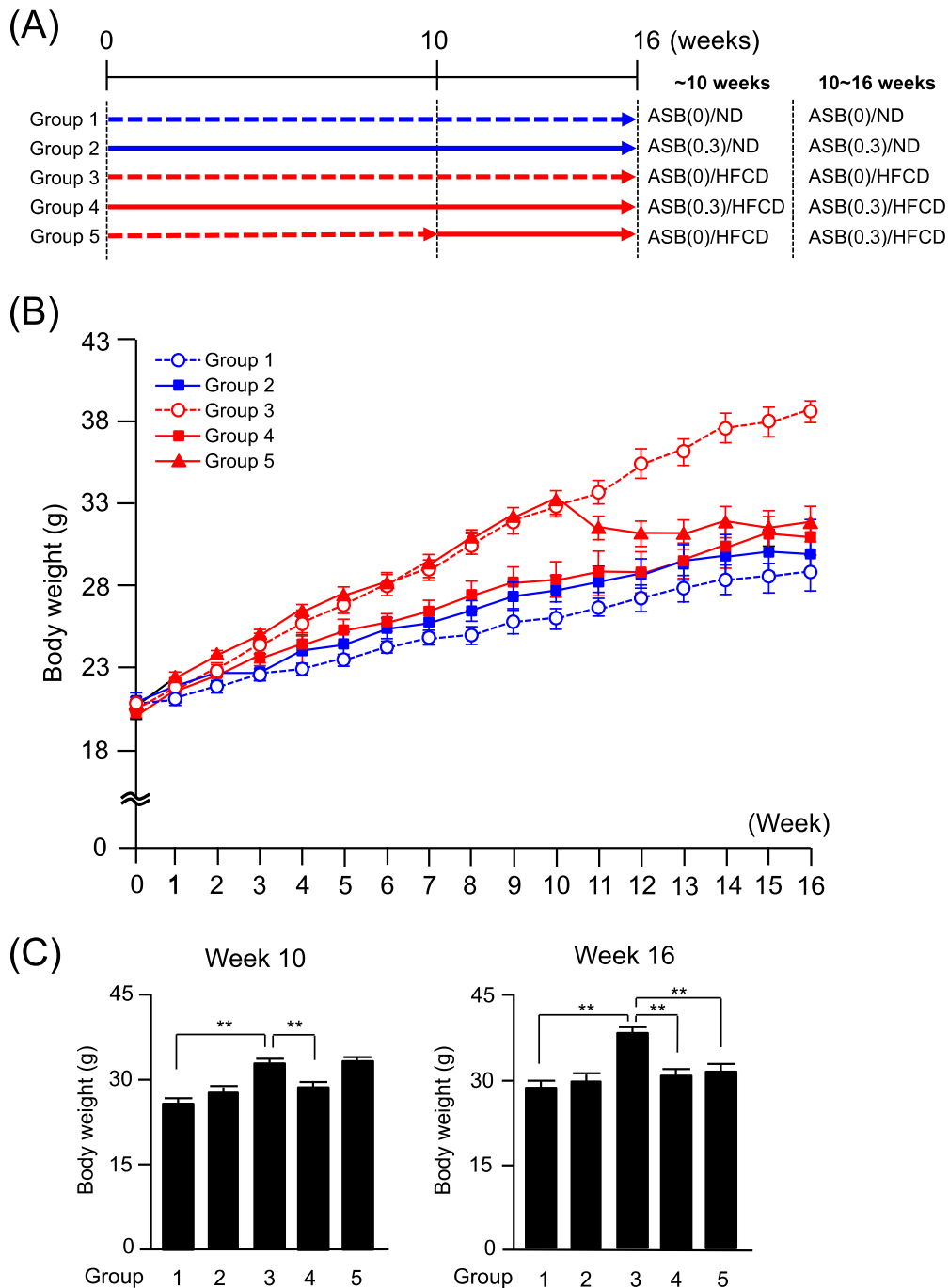


Figure 2-6. ASB14780 suppressed HFD-induced weight gain in mice

Mice were fed an HFCD for 16 week to induce fatty liver. The mice in the treatment groups were administrated the IVA-PLA₂ inhibitor ASB14780 (ASB) at 0.1 or 0.3 g/kg by oral gavage every day. After a 6-hour fast, the mice were sacrificed, and parameters related to fatty liver were assessed. (A) The schedule of the treatment with ASB14780 and the HFCD. The mice were divided into five groups according to the treatment. Broken and solid lines with arrowheads indicate the presence and absence of ASB14780, respectively. Blue and red arrows indicate that the mice were fed an ND and the HFCD, respectively. The body weights were measured every week for 16 weeks for mice fed the ND or HFCD (B), and the body weights were measured at weeks 10 and 16 (C). The data are presented as the means \pm S.E. (n = 4–8/group), and differences were identified using a two-way ANOVA (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Cited from Figure 6 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

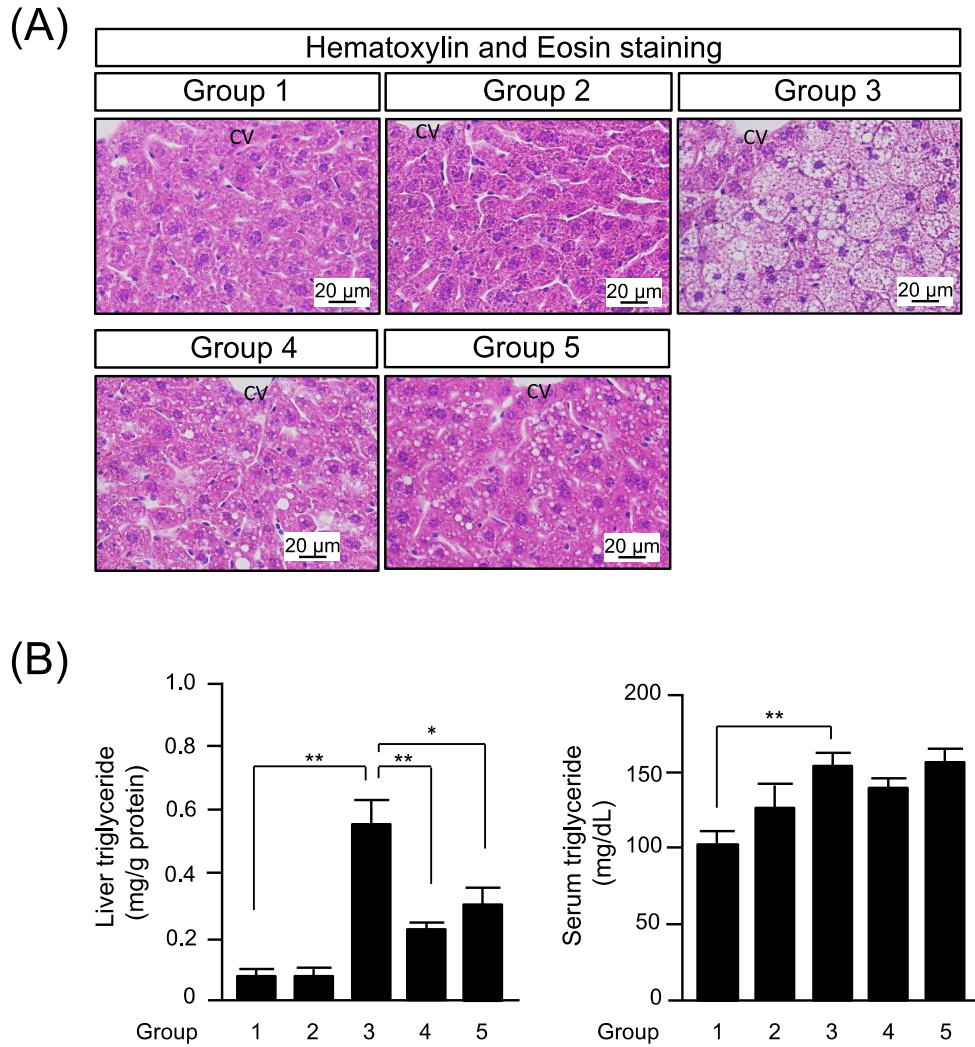


Figure 2-7. Suppression of HFD-induced fatty liver by ASB14780

(A) Paraffin-embedded liver sections were stained with hematoxylin and eosin; Scale bar corresponds to 20 μm . (B) The liver and serum triglyceride levels were determined using enzymatic assays. The data are presented as the means \pm S.E. ($n = 4\text{--}8/\text{group}$), and differences were identified using an ANOVA with a Tukey-Kramer post-hoc analysis ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$).

Cited from Figure 7 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

Table 2-3. The effect of ASB14780 and HFCD on the tissue weights, serum biomarker levels, and food intake of control and treated animals

The data are presented as the means \pm S.E. for four to seven individuals (Tukey-Kramer post-hoc analysis).

	ASB(0)/ND (Group 1)	ASB (0.3)/ND (Group 2)	ASB (0)/HFCD (Group 3)	ASB (0.3)/HFCD (Group 4)	ASB (0 \rightarrow 0.3) /HFCD (Group 5)
Body weight (g) ^d	27.5 \pm 1.1	28.6 \pm 1.3	37.3 \pm 0.8**	29.9 \pm 1.1##	30.8 \pm 1.0##
Liver weight (g)	1.12 \pm 0.06	1.28 \pm 0.10	1.44 \pm 0.06*	1.27 \pm 0.04	1.35 \pm 0.06
Fat pad weight (g)	0.72 \pm 0.11	0.80 \pm 0.10	2.25 \pm 0.15**	1.07 \pm 0.06##	1.31 \pm 0.15#
Serum AST (IU/L)	21.54 \pm 0.91	22.67 \pm 0.91	30.42 \pm 2.57	31.46 \pm 2.09	26.71 \pm 1.84
Serum ALT (IU/L)	6.29 \pm 0.52	5.57 \pm 0.15	9.23 \pm 1.43	7.16 \pm 0.78	8.21 \pm 1.02
Food intake (g)	2.79 \pm 0.07	3.17 \pm 0.12*	2.68 \pm 0.08	2.50 \pm 0.08	2.40 \pm 0.06

ASB, ASB14780.

^dBody weights were measured after a 6-hour fast.

* $P < 0.05$ versus ASB(0)/ND; ** $P < 0.01$ versus ASB(0)/ND; # $P < 0.05$ versus ASB(0)/HFCD; ## $P < 0.01$ versus ASB(0)/HFCD.

Cited from Table 2 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

2.3.6.HFCD 誘発性脂肪肝形成における ABS14780 による脂質生成関連分子の mRNA 発現の阻害

ASB14780 の脂肪肝進展を抑制する分子メカニズムを解明するために、脂質代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現レベルを定量 RT-PCR 法にて検討した (Figure 2-8)。細胞内へ遊離脂肪酸 (free fatty acid: FFA) を輸送する CD36 の mRNA 発現は、ND 摂取マウス (Group 1) に比し HFCD 摂取マウス (Group 3) では著しく増加したが (Figure 2-8A)、HFCD を摂取させ 0.3 g/kg の ASB14780 を並行投与したマウス (Group 4) の肝組織でも Group 3 と同様のレベルであった。一方、ミトコンドリアへ FFA を輸送する [80] 肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (liver fatty acid binding protein: L-FABP) および脂肪酸の酸化における律速段階となる [81] 酵素のカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ 1 α (carnitine palmitoyl-transferase 1 α : CPT1 α) の mRNA 発現は、Group 1 と Group 3 で同程度であり、HFCD 摂食による変動は見られなかった (Figure 2-8A)。

脂肪酸合成と一価不飽和脂肪酸合成に関わるタンパク質をコードする遺伝子であるアセチル-CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA carboxylase: ACC)、脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase: FAS)、ステアシル-CoA 不飽和化酵素 (stearoyl-CoA desaturase 1: SCD-1) の発現レベルは、Group 1 マウスの肝臓に比し Group 3 マウスの肝臓で著しく増加した (Figure 2-8B)。さらに、ACC や FAS や SCD-1 の mRNA 発現を誘導する転写因子であるステロール応答性配列結合タンパク質 (sterol regulatory element-binding protein 1c: SREBP1c) の mRNA 発現量は、Group 1 マウスの肝臓に比し Group 3 マウスの肝臓で増加した (Figure 2-8B)。一方、HFCD を摂取した Group 3 のマウス比し ASB14780 を並行投与した Group 4 のマウスの肝臓では、これらの脂質合成に関与する遺伝子 (SREBP1c, ACC, FAS, SCD-1) の mRNA 発現が減少した。つまり ASB14780 が HFCD 誘発性の脂質合成亢進を阻害したと考えられる。本研究ではさらに、HFCD 摂取によりすでに増加した SREBP1c、ACC、FAS、SCD-1 の mRNA 発現に対する ASB14780 の有効性を検証した。HFCD 摂取 10 週後に ASB14780 を 6 週間並行投与したマウス (Group 5) では、HFCD 摂取マウス (Group 3) に比し体重と肝トリグリセリド量が減少したが、SREBP1c の mRNA 発現量は Group 3 と同程度であった。これに対し、Group 5 のマウスでは、FAS や SCD-1 の発現が Group 3 に比し減少傾向であった。このように、変動が連動していると考えられている SREBP1c、FAS、SCD-1、ACC の mRNA の発現が Group 5 において変動の連動性が検出されなかった、この原因に関しては分からないが、個々の脂質合成遺伝子の転写の抑制する未同定因子による調節機構によってこのような矛盾が生じた可能性がある。

さらに、*de novo* 脂肪酸合成においてジアシルグリセロールをエステル化するジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼ 2 (diacylglycerol acyltransferase 2: DGAT2) は、ASB14780 を並行投与した HFCD 摂取マウス (Group 4) でも減少した (Figure 2-8B)。しかし、超低密度リポタンパク質 (very-low-density lipoprotein: VLDL) の分泌を仲介する DGAT1 およびマイクロソームトリグリセリド転移タンパク質 (microsomal triglyceride protein: MTP) は、Group 1、3 および 4 の 3 群間で顕著な変化はみられなかった (Figure 2-8C)。

最後に、トリグリセリドの加水分解を触媒するホルモン感受性リパーゼ (hormone-sensitive

lipase: HSL) の mRNA 発現は、Group 3 に比し Group 4 のマウスの肝組織で著しく減少した (Figure 2-8C)。これは、ASB14780 による脂質合成の減少 (Figure 2-8B) に由来することを示している。ND を摂取したマウス (Group 1 および 2) での、脂質代謝に関する遺伝子の mRNA 発現レベルにおける ASB14780 単独の効果はほとんどみられなかった。したがって、これらの結果は ASB14780 が HFCD 摂取で亢進する肝組織中の *de novo* 脂肪酸合成を抑制することを示唆する (Figure 2-9)。

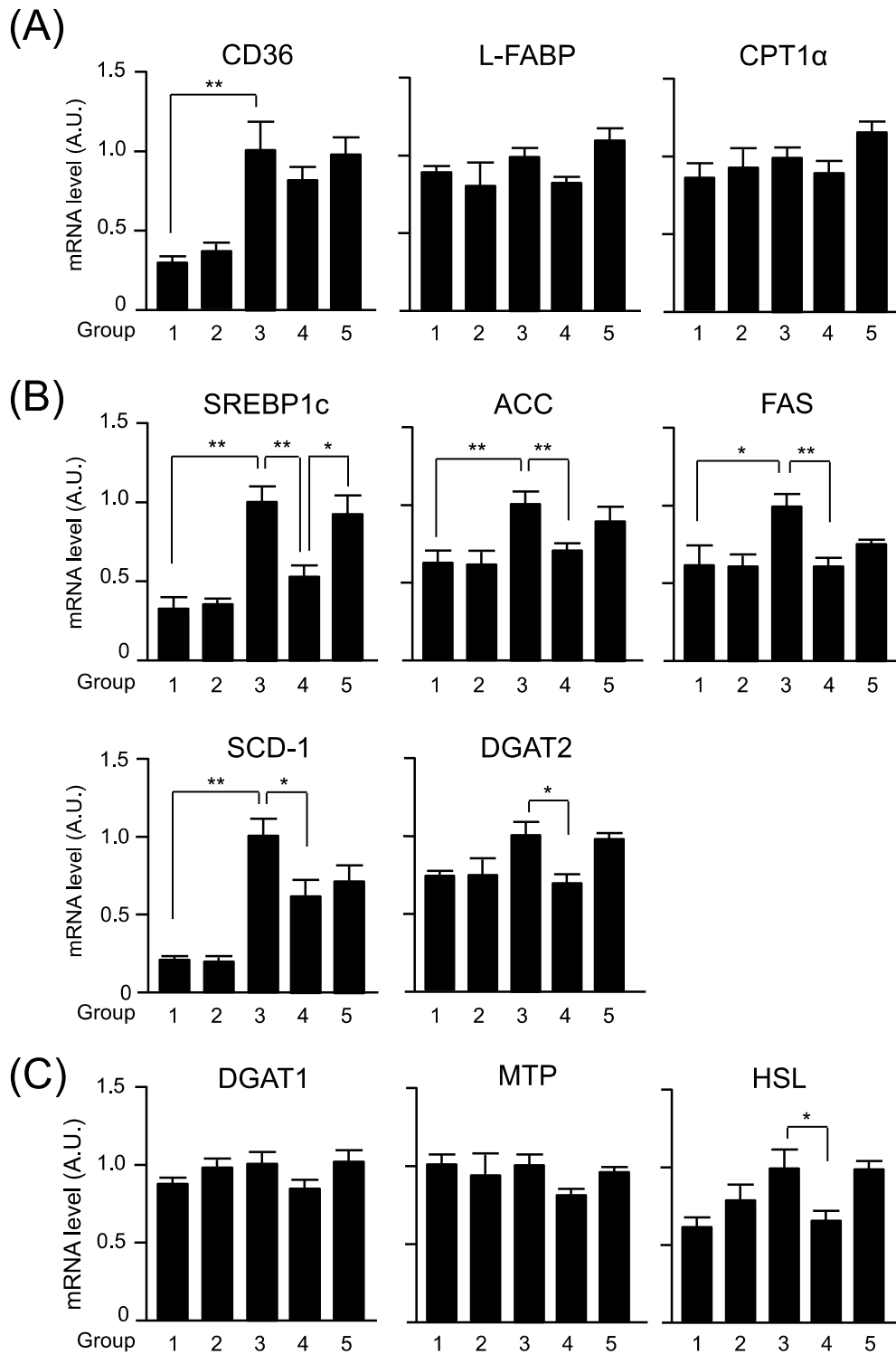


Figure 2-8. Suppression of hepatic lipogenesis-related mRNA expression by ASB14780

The expression levels of CD36, fatty liver acid binding protein (L-FABP), and carnitine palmitoyl-transferase 1 α (CPT1 α) (A); SREBP1c, ACC, FAS, SCD-1, and DGAT2 (B); and DGAT1, microsomal triglyceride protein (MTP), and hormone-sensitive lipase (HSL) mRNA (C) were assessed using real-time RT-PCR and were normalized to that of 36B4. The data are presented as the means \pm S.E. (n = 4–8/group), and differences were identified using an ANOVA with a Tukey-Kramer post-hoc analysis (* P < 0.05; ** P < 0.01; # P < 0.05).

Cited from Figure 8 of “Kanai et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 356, 604-614 (2016)”.

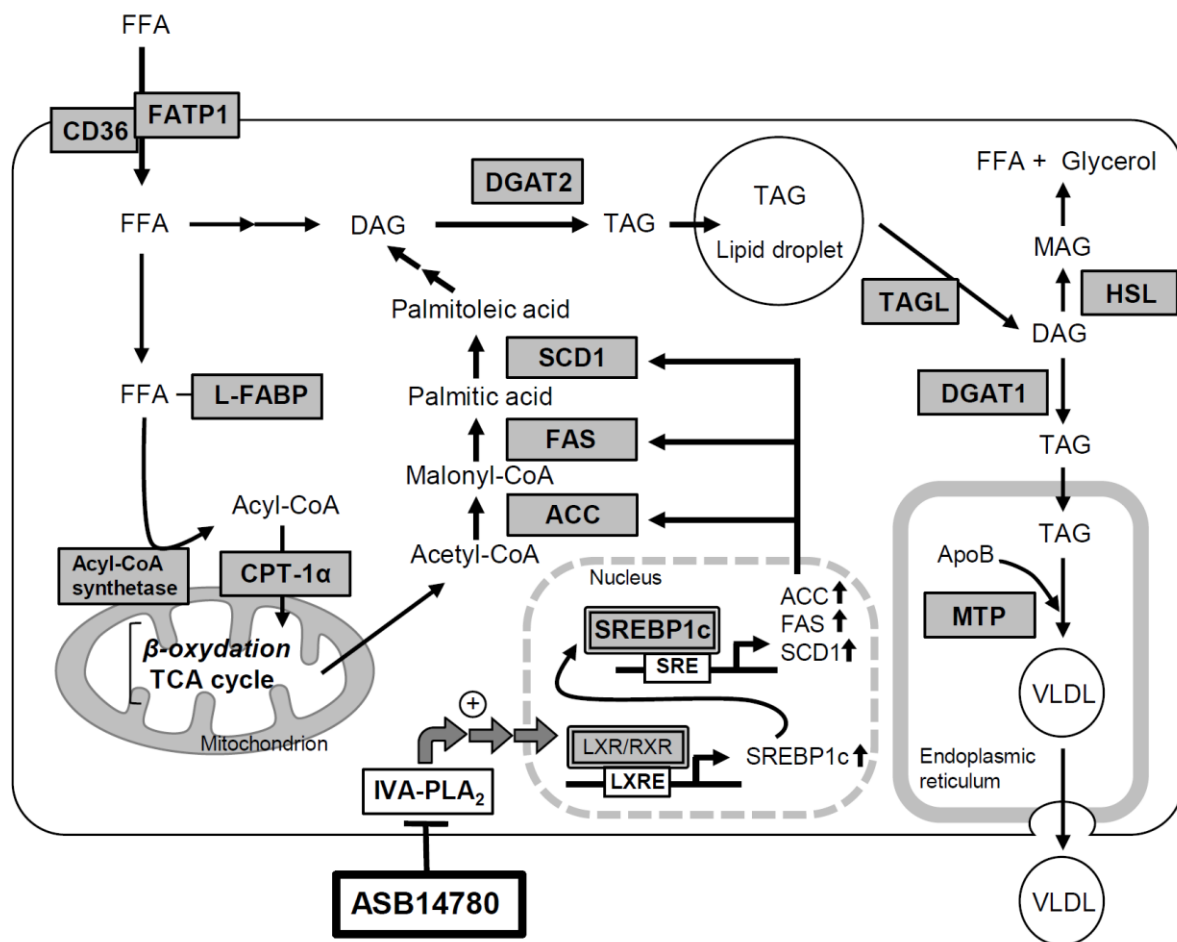


Figure 2-9. Inhibitory effects of ASB14780 on HFCD-induced molecules of hepatic triglyceride biosynthesis

ASB14780 decreased the expression of ACC, FAS, and SCD1 mRNA by downregulating mRNA expression of the transcription factor SREBP1c. SREBP1c is regulated by LXR and IVA-PLA₂ reportedly regulates the transcriptional activity of LXR. Thus ASB14780-mediated inhibition of IVA-PLA₂ activity leads to suppression of triglyceride biosynthesis and lipid droplet accumulation. ACC, acetyl-CoA carboxylase; CD36, fatty acid translocase; CPT-1 α , carnitine-palmitoyltransferase 1; DGAT1, diacylglycerol acyl transferase 1; DGAT2, diacylglycerol acyl transferase 2; FAS, fatty acid synthase; FATP1, fatty acid transporter protein 1; GPAT: glycerol-3-phosphate acyltransferase; HSL, hormone sensitive lipase; L-FABP, fatty acid binding protein; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; SCD1: stearoyl-CoA desaturase; SREBP1c, sterol regulatory element binding protein-1c; TAGL, triacylglycerol lipase.

第4節 考察

当研究室では IVA-PLA₂ KO マウスで HFCD 誘発性の脂肪肝が抑制されることを明らかとしており [17]、さらに第1章で示したように本欠損マウスで CCl₄ 誘発性の肝線維化が抑制されたことを報告した。そこで本研究では、経口投与可能な IVA-PLA₂ 阻害剤である ASB14780 の脂肪肝や肝線維化の進展に対する抑制効果について検証した。ASB14780 の連日投与は CCl₄ 誘発性の肝線維化や HFCD 誘発性の脂肪肝の進展を軽減させ、HFCD 誘発性の肝での脂質合成を著しく抑制した。したがって、本研究結果は ASB14780 が NASH の治療薬の候補となる可能性や IVA-PLA₂ が脂肪肝や肝線維化の治療に対して有効な標的分子となりうることを示唆している。

第1章の研究では、IVA-PLA₂ KO マウスにおいて CCl₄ により誘発される肝組織でのコラーゲン繊維の蓄積、単球・マクロファージの肝への浸潤および MCP-1 の mRNA 発現増加といった炎症亢進に関連した表現型が減少することを示した。本研究においても、ASB14780 が CCl₄ 誘発性の肝組織への単球・マクロファージの浸潤および肝での MCP-1 の mRNA 発現増加を抑制して、IVA-PLA₂ KO マウスと同様に肝線維化の進展を軽減した。また、ASB14780 は IVA-PLA₂ KO マウスで得られた結果と同様に脂肪肝の形成も抑制した。以上の結果は、ASB14780 が IVA-PLA₂ の活性を阻害することで肝線維化および脂肪肝の進展に対して抑制的に働くことを示している。一方、HFCD 摂取の IVA-PLA₂ KO マウスの体重は、HFCD 摂取の WT マウスの体重と同程度の増加を示したが [17]、これに対して、ASB14780 はほぼ完全に HFCD 摂取による体重増加を抑えた。これは、HFCD 誘発性の肥満に対する ASB14780 の抑制効果が、IVA-PLA₂ の阻害活性とは独立した未同定の作用機序により起こっている可能性が考えられる。

最近、肝実質細胞に IVA-PLA₂ を過剰発現させたマウスが Fas 誘導性の肝障害を減少させることが報告されている [82]。一方、このトランジェニックマウスでは D-ガラクトサミン (D-galactosamine: GalN)/リポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS) によって肝障害を誘発させると、血清中の AST や ALT レベルが著しく上昇する [82]。このように、IVA-PLA₂ を介した肝障害の誘発は、肝障害誘発剤の障害誘発機構に依存している可能性が考えられる。GalN/LPS や CCl₄ 誘発性の肝毒性は酸化ストレスを介する [83] と報告されていることから、肝障害に対する肝実質細胞特異的 IVA-PLA₂ 過剰発現マウスでの結果は、本研究で示した IVA-PLA₂ 阻害が CCl₄ 長期投与誘発性の肝障害に対して肝庇護作用を有するという結果と一致している。

過去に実施されたメタアナリシスでは、特にピオグリタゾンのようなチアゾリジンジオン (tiazolidinedione: TZD) を用いた治療において、体重増加 (およそ 70%) と浮腫 (10%未満) の副作用が確認されたものの脂肪変性と炎症を改善させたと報告されている [84]。一方、*Cochrane* 誌の総説では、胆汁酸、抗酸化物質、メトホルミン、TZD 類は糖尿病治療効果があるため、非糖尿病 NASH 患者の治療には不十分な証拠であると示唆している [85-87]。以上のように、NASH に対する薬学的治療は未だに確立していない。本研究では、ASB14780 が既

に形成された脂肪肝または肝線維化の進行をも抑制することを明らかにした。多くの NASH 罹患者はステージが進行した状態から治療を開始することから、ASB14780 の臨床応用実現のためには非常に意義のある結果である。

本研究では、脂質合成遺伝子の FAS、SCD-1、ACC の発現量は、これらの遺伝子の転写因子として知られている SREBP1c の mRNA 発現量と必ずしも相関した結果ではなかった。HFCD 摂取 10 週後に ASB14780 を 6 週間並行投与したマウスでは、FAS や SCD-1 の mRNA 発現量が ND 摂取群と同程度まで減少したにも関わらず、SREBP1c の発現量は HFCD 単独摂取群と同様に高いままであった。同様に、SREBP1c とその下流遺伝子 (FAS、SCD-1、ACC) の mRNA 発現が相関性を示さないという結果は、タモキシフェンによる肝脂肪変性モデルにおいても報告されている [88]。タモキシフェン処理したラット肝臓を用いた Lelliott らもまた、SREBP1c の mRNA 発現レベルはタモキシフェン処理に対して応答しなかったにも関わらず FAS、SCD1、ACC の mRNA レベルはコントロール群よりも減少したと報告している [89]。また、Cole らは、タモキシフェン処理マウスの肝組織中の FAS や SCD1 の mRNA レベルはコントロールマウスに比しそれぞれ著しく増加または減少したが、SREBP1c と ACC の mRNA 発現レベルは両マウス間で変化しなかったと示している [90]。さらに、Gudbrandsen らも、タモキシフェンはラット肝組織において ACC と FAS の活性を減少させたが、SCD-1 の mRNA 発現レベルと活性には影響を及ぼさなかったと示している [91]。このように、これら脂質合成遺伝子は SREBP1c 以外の転写因子によっても発現調節されている可能性が考えられ、今回の結果もその未同定転写因子が関与している可能性も考えられる。

肝硬変になる前の肝線維化は過剰にコラーゲンを産生する活性化星細胞の静止や本来の再生能力により可逆的であるため、原因因子の除去は肝線維化に対して最も効果的な治療となる [92]。例えば、B 型肝炎ウイルスの感染による肝線維化は、ラミブジンのような抗ウイルス薬での治療により回復する [93]。NASH では発症の中心に酸化ストレスの関与が知られており [94,95]、抗酸化物質のビタミン E やシマリリンやホスファチジルコリンが酸化ストレスによる肝星細胞の活性化阻害により肝実質細胞をアポトーシスから保護し、実験的な肝線維化を軽減させるという報告がある [96]。また、炎症反応は肝線維化に先行して起こり肝線維化の進行を促進させるため、抗炎症薬が治療に認められている。特に副腎皮質ステロイドは自己免疫性肝炎や急性アルコール性肝炎を発症した患者における肝線維化の治療に広く用いられている [97]。また、TNF α 産生の阻害作用をもつ抗炎症薬のペントキシフィリンは [98]、NASH 治療薬の候補とされている [99]。本研究で用いた ASB14780 はおそらく IVA-PLA₂ の活性化の阻害を介して [75]、抗炎症作用をもつ副腎皮質ステロイドやペントキシフィリンと同様に、脂肪肝や肝線維化のような NASH の症状の進展を抑制したと考えられる。また、本研究におけるモデルの組織所見から HFCD 誘発性脂肪肝は Matteoni 分類では脂肪沈着と肝細胞の風船様変性を示す Type3 であり、CCl₄ 誘発性肝線維化は Brunt 分類の小葉中心部の線維化状態を示す Stag1 であったと考えられるため、進行中であっても肝硬変になる前の可逆性に NASH 対しては ASB14780 が有効であると示唆される。

以上をまとめると、本章で示した結果は経口投与可能な IVA-PLA₂ 選択的阻害剤である ASB14780 が NASH を軽減させ、さらに HFCD 関連の肥満も改善できる可能性を示した。加えて、ASB14780 は脂肪肝や肝線維化が既に形成された段階であっても、経口摂取により肝臓での脂質蓄積や線維化の進展を抑制できることが明らかとなった。ASB14780 の治療効果を明確にするためには今後さらなる研究が必要であるが、経口摂取で活性を示す ASB14780 は NASH に対する有望な治療薬として期待できる。

第3章 IVA-PLA₂欠損下でのオートファジー増強による CCL₄誘発性肝細胞死の抑制

第1節 諸言

第1章および第2章での研究成果や、これまでの研究 [17] で、IVA-PLA₂の欠損あるいは阻害が高脂肪食誘発性の脂肪肝形成やCCL₄誘発性の肝線維化の進行を抑制できる可能性を示した。また、第1章で示したように、IVA-PLA₂ KO マウスではCCL₄長期投与による肝障害も軽減された。他にも Guiying らの報告では長期的なCCL₄投与による肝障害ではIVA-PLA₂の発現が増加するが、IVA-PLA₂過剰発現マウスではGalN/LPS誘発性の急性肝不全の増悪化が見られ、一方、Fas誘発性の急性肝不全に対しては抵抗性を示すとしており、IVA-PLA₂の関わり方は肝障害誘発機構に依存する可能性が考えられる [82]。このように、IVA-PLA₂が肝障害において重要な役割を演じている可能性が高いが、どのように関与しているかについては不明な部分が多い。

本研究において単にオートファジーと表記したマクロオートファジーは、細胞質タンパク質や細胞内オルガネラの非選択的な分解機構である [100-102]。オートファジーが誘導されている細胞の特徴として、オートファゴソームと称される多くの小胞が細胞内に観察される。オートファゴソームは細胞内で隔離されているリソソームと融合することで、オートファゴソーム内の細胞構成要素を分解する。オートファジー誘導に対するマーカーの1つに微小管関連タンパク質1軽鎖3B (microtubule-associated protein 1 light chain 3B: LC3) が知られており、オートファジーの誘導によりオートファゴソーム内のLC3がオートファジーを促進するLC3-Iから脂質付加反応を受けたLC3-IIへと変換される [103,104]。栄養枯渇のようなストレスにさらされた細胞内では、細胞内エネルギーの恒常性を維持するためにオートファジーの代謝回転が増加する。今までに報告された研究においても、オートファジーは微生物の侵入や細胞生存の亢進のような細胞応答を介する宿主防御機構であると示されている [105,106]。近年、IVA-PLA₂とその代謝物の脂質メディエーターがマクロファージでのオートファジーを誘導したという報告がある [107]。しかし、IVA-PLA₂が肝実質細胞のような他の細胞でのオートファジーに関与しているかどうかは未だ明らかでない。本研究では、まず化学物質誘発性の肝毒性に対するIVA-PLA₂欠損の影響を解明するために、肝実質細胞においてIVA-PLA₂欠損がCCL₄誘発性の細胞毒性を軽減させるかを検証した。加えて、IVA-PLA₂が肝実質細胞でのオートファジーの恒常的な阻害に関与しているかを検証した。

第2節 材料および方法

3.2.1. 実験動物および CCl₄ 誘発性肝障害モデルマウスの作製

IVA-PLA₂ KO マウスは、C57BL/6J マウスで 15 世代、さらに C57BL/6N 系統で 10 世代の戻し交配により得た。マウスの遺伝子型は、PCR 法を用いて判定した [22]。すべてのマウスは、12 時間の明暗サイクル、1 ケージあたりの収容数を 5 匹までとし、自由摂食および自由摂飲の環境下で飼育した。また、すべての実験において、雄性のマウスを使用した。12 週齢の IVA-PLA₂ 欠損マウスおよび同腹の野生型に CCl₄ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) が 1.5 mL/kg 体重の量になるように 10% CCl₄ を単回腹腔内投与して肝障害モデルを作製した。CCl₄ の対照として CCl₄ の溶媒であるコーンオイルを腹腔内に投与した。CCl₄ 投与から 24 または 48 時間後にマウスを解剖し、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。なお、本研究課題は京都薬科大学動物実験委員会の承認の下に行った。

3.2.2. TUNEL 法によるアポトーシスの検出および免疫組織染色

TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色は DeadEnds™ Fluorometric TUNEL system (Promega, Madison, WI, USA) を用いて添付の方法に従って行った。MAS コートスライドガラス上のパラフィン切片は、脱パラフィン後、免疫染色の前処理として Retrieval A at pH 6.0 (BD Biosciences, Boston, MA, USA) に浸し 90°C で 10 分間賦活化した。4% パラホルマリンで 15 分間固定後、20 μg/mL Proteinase K 処理を室温で 10 分間行った。その後、Equilibration buffer [200 mM potassium cacodylate (pH 6.6), 25 mM Tris-HCl (pH6.6), 0.2 mM DTT, 0.25 mg/mL BSA, 2.5 mM cobalt chloride] と室温で 10 分間インキュベートした後、rTdT incubation buffer [90 μL Equilibration buffer, 10 μL Nucleotide mix (0.05 mM fluorescein-12-dUTP, 0.1 mM dATP, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), 2 μL rTdT enzyme] と 37°C で 1 時間反応させた。次いで、切片を 2 × SSC と室温で 15 分間インキュベートした後、Albumin の免疫組織染色を行った。免疫染色は、スライドを 10% rabbit 血清含有の Blocking buffer [0.3% Triton X-100 含有 PBS(-)] と室温にて 1 時間インキュベートした。一次抗体反応は、blocking buffer にて 100 倍希釈した Mouse albumin antibody (Goat polyclonal; Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) を用い、4°C で一晩放置することで行った。二次抗体反応は、blocking buffer にて 400 倍希釈した Alexa Fluor 594 conjugate rabbit anti-goat IgG (H+L) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、室温で 1 時間インキュベートすることで行った。また、対比染色として核を DAPI (Dojindo, Kumamoto, Japan) にて染色し、退光防止剤を含む封入剤である ProLong Gold Reagent (Thermo Fisher Scientific) にて封入した。染色した切片は、倒立型リサーチ顕微鏡を用い、画像を 1,360 × 1,240 pixels に設定して撮影した。

3.2.3. マウス初代培養肝細胞の培養およびトランスフェクション

初代培養の肝実質細胞は非再循環方式のコラゲナーゼ還流により採取し、以前に報告され

た方法に多少の改善を加えて培養した [108]。11-13 週齢の雄性の野生型または IVA-PLA₂ KO マウスの腹腔内に、生理食塩水にて 80 倍希釈した Avertin stock solution を 0.2 mL/10 g (体重) になるように投与し麻酔した。なお、Avertin stock solution は 0.16% (w/v) の濃度で Avertin (2,2,2-Tribromoethanol; Sigma-Aldrich) を *t*-Amyl alcohol に溶解して作製した。灌流は、ペリスタポンプに繋いだ 25G 翼状針を門脈に挿入し、40°C に温めた 30 mL の生理食塩水で行った。灌流の際は、下大静脈を切断して放血されていることを確認した。その後、40°C に温めた 30 mL の Hanks' EGTA 液 [10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA (pH8.0) 含有 HBSS(-)], 40°C に温めた 30 mL の Hanks' collagenase 液 [1.2 mM CaCl₂, 0.6 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 0.1% collagenase type I 含有 HBSS(-)] の順で灌流した。灌流の速度はそれぞれ 6 mL/分で行った。胆嚢を切除した肝臓は、5 mL の冷 Hanks' 液 [1.2 mM CaCl₂, 0.6 mM MgSO₄, 10 mM HEPES を含有 HBSS(-)] を入れたシャーレ中で滅菌済みのピンセットを用いて肝膜を裂き、肝組織から肝細胞を遊離させた。肝細胞懸濁液は孔径 200 μm のナイロンメッシュに通し、さらに 8 mL の冷 Hanks' 液を用いてシャーレ中に残った細胞を回収し、同じナイロンメッシュに通し懸濁した。細胞懸濁液は、30 g、4°C で 5 分間遠心分離した後、上清を除去して 5 mL の冷 Hanks' 液で再懸濁させた。さらに、30 g、4°C で 3 分間遠心分離し、上清を除去して 5 mL の冷 Hanks' 液で再懸濁後、50% Percoll 上に静かに重層させた。その後、1800 g、4°C で 15 分間遠心分離し、上清を除去して沈殿した肝細胞に 8 mL の冷 Hanks' 液で再懸濁させた。これを 30 g、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を除去後に 5 mL の冷 DMEM 培地 [10% FBS, 250 μg/mL kanamycin, 1 mM insulin, 1 mM dexamethasone 含有] に細胞を懸濁し、2×10⁶ cells/10-cm dish になるように collagen-coated type I dish に播種した。播種した細胞は、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で静置し、2-3 時間後に接着しなかった細胞を除去して新しい DMEM 培地に交換した。その後、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で 1 日間培養し、これを肝実質細胞として実験に使用した。

プラスミド DNA は、オートファゴソームに集積するタンパク質である LC3 と enhanced green fluorescent protein (EGFP) を組み込んだ pEGFP-LC3 (Addgene, Cambridge, MA, USA; plasmid #21073) を用いた [104]。肝実質細胞は、播種翌日に Opti-MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific (Gibco), MA, USA) に交換し、20 μg/dish の Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と 4.5 μg/dish の pEGFP-LC3 を混合して静置後に添加し、CO₂ インキュベーター内で 48 時間処理した。トランスフェクションした肝実質細胞は、40 μM のクロロキン含有 Opti-MEM 培地に交換し、CO₂ インキュベーター内で 6 時間処理した [109]。対照として、クロロキン非処理群は新しい Opti-MEM 培地に交換した。その後、倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus) を用い、画像を 1,360 × 1,240 pixels に設定して撮影した。トランスフェクション効率、撮影した画像から全細胞数に対する LC3-II 陽性細胞 (蛍光細胞) 数の割合で算出した。

3.2.4. ウェスタンブロット解析

-80℃にて凍結した肝組織からタンパク質を、protease inhibitor cockrail tablet (Roche Diagnostics, Indianapolis) を含む冷 Lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% sodium deoxycholate] 中でポッター型ホモジナイザーを用いて氷冷しながら抽出した。得られたホモジネートは 15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、たんぱく抽出液として上清を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法により定量した。50 µg の肝タンパク質は 12% SDS-PAGE にて分離後ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。ニトロセルロース膜は第 2 章と同様の blocking buffer とインキュベートし、次いで blocking buffer にて 500 倍希釈した抗 HEL 抗体 (Nikkenseil, Shizuoka, Japan)、あるいは blocking buffer にて 500 倍希釈した抗 α -Tubulin 抗体 (Cell Signaling Technology) と 4℃で一晩反応させた。翌日、抗 HEL 抗体または抗 α -Tubulin 抗体に対して T-TBS にて 2,500 倍または 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) と室温で 1 時間反応させた。バンドの検出は、Chemi-Lumi One Super (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)を用いて LAS-3000 analysis system (Fujifilm, Tokyo, Japan) により行った。また、バンドの定量は ImageJ software を用いて行った。

オートファジーの検出を目的としてクロロキン処理した肝実質細胞は、撮影後にスクレイパーを用いて 15 mL チューブに回収し、3000 rpm、4℃で 5 分間遠心分離した。上清を除去後、冷 PBS (-) を加えて細胞を懸濁し、1.5 mL チューブに回収して 4000 rpm、4℃で 5 分間遠心分離した。上清を完全に除去し、沈殿物をボルテックスミキサーでほぐした後、protease inhibitor cockrail tablet を含む細胞溶解液 [0.2% SDS, 1% deoxycholic acid, 100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 2% NP-40] を 100 µL 加え、30 分水中に放置した。その後、10000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離し、タンパク質抽出液として上清を回収した。質濃度は Bradford 法により測定した。タンパク質抽出液は 3 µg/µL となるように可溶化液 [6% SDS, 9mM EGTA, 3 mM EDTA, 150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.03% BPB, 15% glycerol] と混合し 95℃で 5 分間加熱した。検出するタンパク質は EGFP-LC3 および Albumin で、それぞれ 30 µg および 5 µg の肝細胞タンパク質は 10% SDS-PAGE にて分離後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写したこの際、転写には blotting buffer [20% methanol, 48 mM Tris-HCl (pH6.8), 39 mM Glycine] を用い、セミドライ式ブロッキング装置にて 2 mA/cm² で 60 分間行った。ニトロセルロース膜は、EGFP-LC3 検出では 0.1% Tween-20 含有の TBS-T でスキムミルクが 3%になるように懸濁した blocking buffer、Albumin 検出では TBS-T で BSA が 3%になるように溶解した blocking buffer と室温で 1 時間インキュベートした。次いで、各々の blocking buffer にて 1,000 倍希釈した抗 GFP 抗体 (Wako Pure Chemical Industries)、2,000 倍希釈した抗 Albumin 抗体 (Bethyl Laboratories, TX, USA) と室温で 1 時間反応させた。翌日、抗 GFP 抗体に対して EGFP-LC3 用 blocking buffer にて 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Vector Laboratories, CA, USA)、抗 Albumin 抗体に対して TBS-T で 5,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) を用いて、それぞれ室温で 1 時間反応させた。バンド

の検出は、Chemi-Lumi One Super (Nacalai tesque) を用いて LAS-3000 analysis system (Fujifilm) により行った。また、バンドの定量は ImageJ software を用いて行った。

第3節 結果

3.3.1. IVA-PLA₂ 欠損マウスにおける CCl₄ 単回投与誘発性肝障害の抑制

化学物質誘発性の肝毒性に対する IVA-PLA₂ 欠損の影響を解明するために、CCl₄ を IVA-PLA₂ KO マウスの腹腔内に単回投与した。肝毒性は CCl₄ 投与から 48 時間後の血清 AST および ALT レベルにより評価した。IVA-PLA₂ KO マウスの血清 ALT レベルは同腹の WT マウスに比し有意に減少した (Figure 3-1A)。血清 AST レベルもまた IVA-PLA₂ KO マウスでは同腹の WT より減少したが、統計的有意差はなかった (Figure 3-1A)。次に CCl₄ 投与 24 時間後の肝組織を HE 染色および TUNEL 染色することにより組織学的に評価した (Figure 3-1B)。HE 染色において、IVA-PLA₂ KO マウスでは同腹の WT に比し障害された領域 (非染色領域) が顕著に減少した。また TUNEL 染色において、障害された領域が多くの TUNEL 陽性細胞を含んでいることが分かり、死細胞数は WT に比し IVA-PLA₂ KO マウスで顕著に減少していた。

3.3.2. IVA-PLA₂ 欠損マウスにおける CCl₄ 単回投与による脂質過酸化産生に対する影響

第1章でも言及したように、CCl₄ の毒性発揮に重要な薬物代謝酵素である CYP2E1 の発現レベルは IVA-PLA₂ KO マウスと WT マウス間で同程度であったことから、CCl₄ より生じる CCl₃ レベルは同程度であると推測される。これを確認するために、脂質過酸化の指標となる 13-HPODE (13-hydroperoxyoctadecanoic acid) 付加タンパク質レベルを抗 HEL (hexanoyl-lysine adduct) 抗体を用いて検出し、脂質過酸化による肝障害への影響を評価した。CCl₄ 単回投与では、特に 70-kDa 付近の 13-HPODE 付加タンパク質レベルが著しく増加した (Figure 3-2A)。しかし、70-kDa 付近の 13-HPODE 付加タンパク質レベルは CCl₄ 単回投与の WT および IVA-PLA₂ KO マウスで同程度であった (Figures 3-2B, 3-2C)。このように、IVA-PLA₂ KO マウスでも WT マウスと同程度の酸化ストレスが引き起こされていると考えられ、IVA-PLA₂ の欠損は CCl₃ の産生を介した脂質過酸化反応には影響しないことが示唆された。

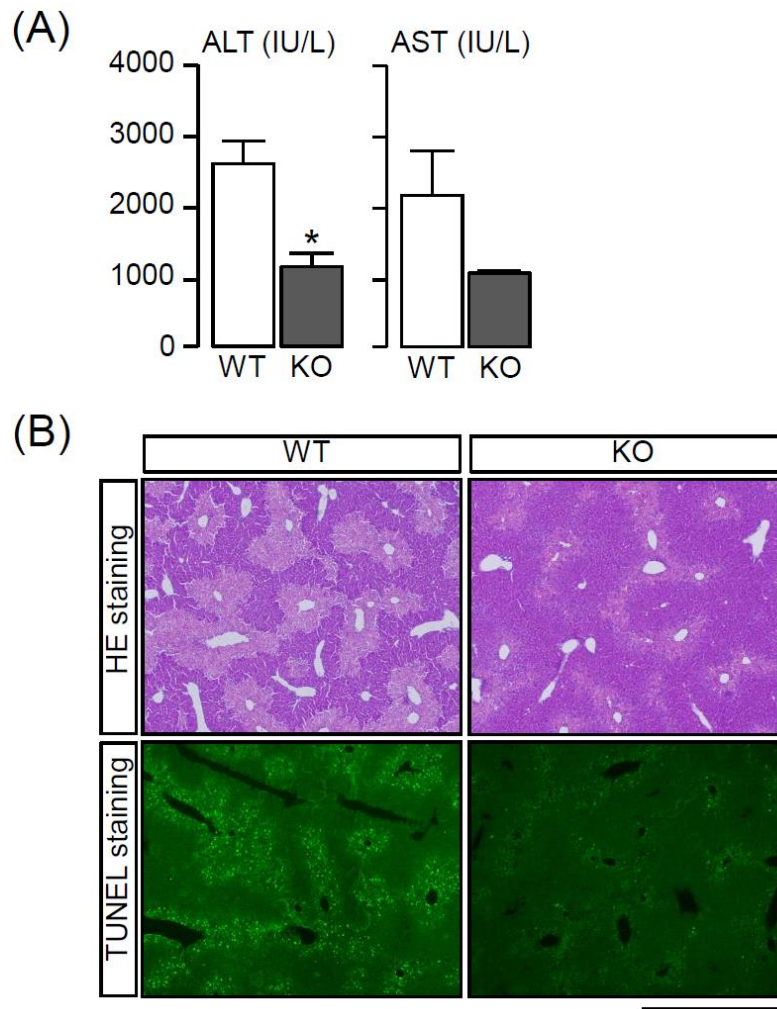


Figure 3-1. The reduction of CCl₄-induced hepatotoxicity in IVA-PLA₂-deficient mice.

WT and KO mice ($n = 3$ in each genotype) were injected with CCl₄ (1.5 mL/kg, i.p.). (A) At 48 h after the injection, blood was collected, and the levels of ALT and AST were measured by enzymatic assays. The values are presented as means (IU/L) \pm S.E. Student's t-test was used to analyze the statistical significance of the differences between the WT and KO mice ($*P < 0.05$). (B) At 24 h after the injection, the histological changes were analyzed using hematoxylin and eosin (HE) staining (upper panels), and cell death was detected by TUNEL staining (lower panels). Scale bar: 1 mm.

Cited from Figure 1 of "Ishihara et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 471, 15-20 (2016)".

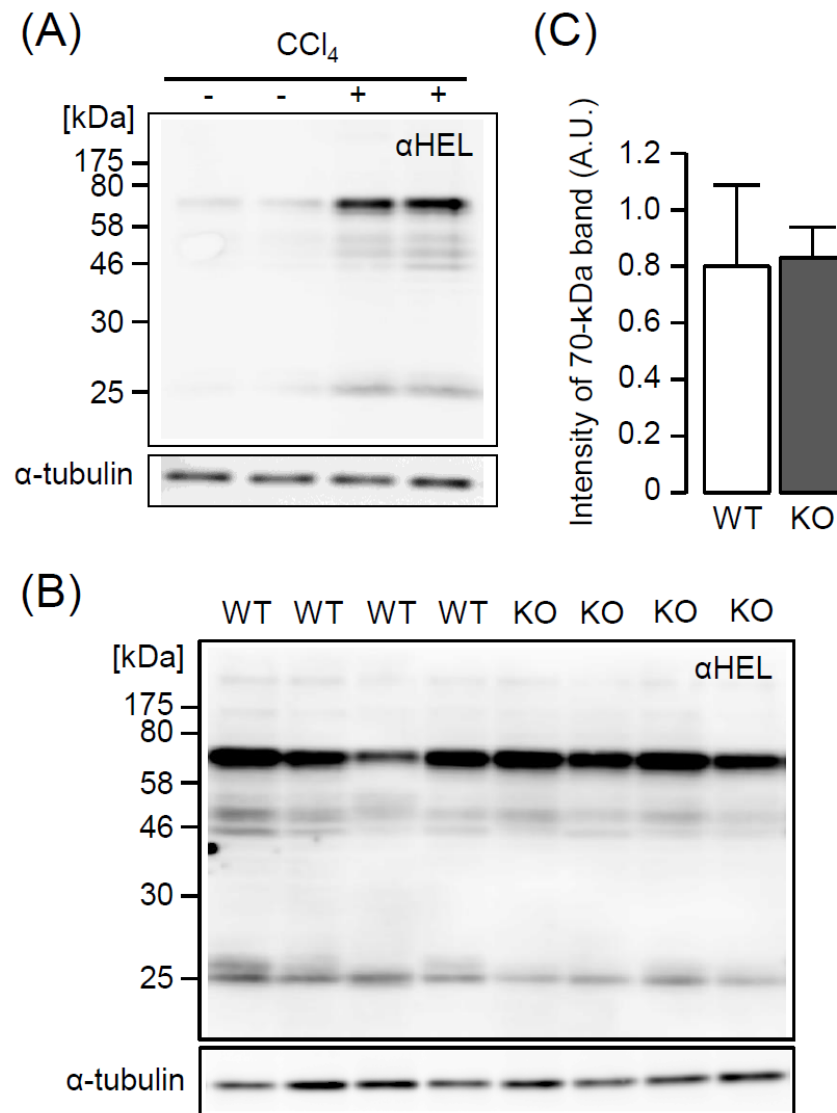


Figure 3-2. The unaffected index of lipid peroxidation induced by CCl₄ in IVA-PLA₂-deficient mice. (A) Corn oil (vehicle) or CCl₄ (1.5 mL/kg) was intraperitoneally injected into WT mice. (B) CCl₄ (1.5 mL/kg) was intraperitoneally injected into WT and KO mice. At 48 h after the injection, the 13-HPODE adducted proteins were detected by a Western blot analysis. Western blots of the protein extracts (30 μg) from the liver which were probed both an anti-HEL antibody or anti-α-tubulin antibody (loading control). (C) The band intensities after an immunoreaction with the anti-HEL antibody (approximately 70-kDa) were quantified using the ImageJ software program (NIH). The values were normalized against those of α-tubulin. Each value represents the mean (arbitrary unit [A.U.] ± S.E. (n = 4 in each genotype). The statistical significance of the differences between the WT and KO mice determined using Student's t-test. Cited from Figure 2 of "Ishihara et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 471, 15-20 (2016)".

3.3.3. CCl₄ 単回投与による肝実質細胞の細胞死の誘導

実際に CCl₄ が肝実質細胞の細胞死を誘発することを確認するために、肝実質細胞のマーカーであるアルブミンの免疫組織染色と TUNEL の二重染色をした。その結果、TUNEL 陽性細胞はアルブミン陽性細胞に存在しており (Figure 3-3)、CCl₄ により肝実質細胞の細胞死が誘導されることが明らかとなった。

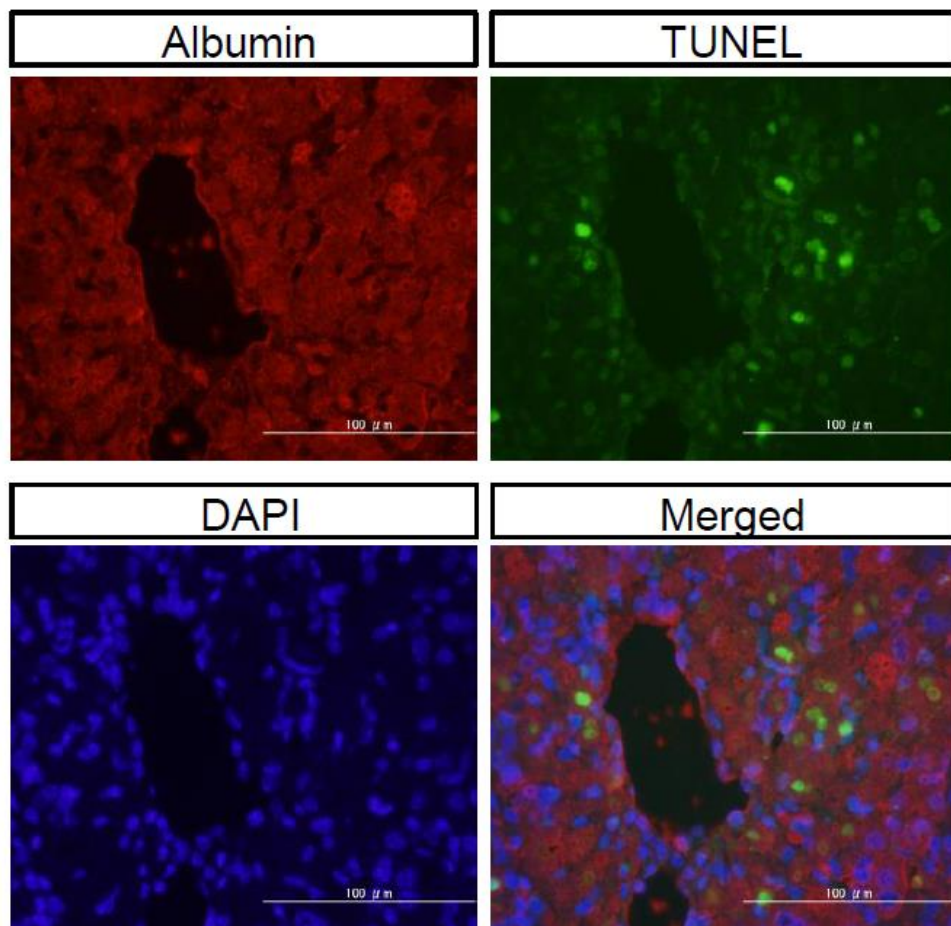


Figure 3-3. The induction of cell death in hepatocytes with a single dose of CCl₄.

Double staining was performed to detect TUNEL- (green) and albumin- (red) positive cell cells in liver sections from WT mice treated with CCl₄. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 100 μm.

Cited from Figure 3 of “Ishihara et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 471, 15-20 (2016)”.

3.3.4. IVA-PLA₂欠損マウスの初代培養肝細胞における恒常的オートファジーの促進

オートファジーはアポトーシス性細胞死と密接に関連していると報告されている [105,106]。そこで、我々は IVA-PLA₂ の欠損がオートファジー誘導に及ぼす影響について調べた。オートファゴソーム内の LC3-II の蓄積および LC3-I から LC3-II への転換はオートファジーの代表的な特徴であり、オートファジーの一般的な評価法として広く用いられる [104,110,111]。そこで、まず初代培養肝細胞および肝細胞株の Huh-7、HepG2 細胞の血清飢餓状態におけるオートファジーの誘導について検討した。しかし、抗 LC3 抗体を用いたウエスタンブロットでは、血清飢餓状態によっていずれの細胞においても、オートファジー指標となる LC3-II のバンドは検出されなかった (データは示さず)。これは飢餓状態におかれた細胞のリソソーム中での LC3-II の過度の分解によって、細胞内での LC3-II の蓄積量が少ない可能性が考えられる。このため、我々は飢餓状態のオートファジーではなく恒常的なオートファジーを WT および IVA-PLA₂ KO マウスの初代培養肝細胞を用いて評価した。恒常的オートファジーについては、リソソームとオートファゴソームの融合を阻害してオートファジーの進行を妨げるクロロキンを処理することでオートファゴソームを蓄積させ、その蓄積量を測定することで、クロロキン処理中の恒常的オートファジーのレベルとした。蛍光顕微鏡によりオートファゴソームを観察するために、EGFP 結合 LC3 タンパク質を初代培養肝細胞にトランスフェクションした。クロロキン存在下の WT 肝細胞ではオートファゴソームを示す EGFP-LC3 が集積した複数の小さい点が検出され、一方、IVA-PLA₂ KO マウスの肝細胞では WT よりも顆粒状の EGFP-LC3 の数が多くその大きさも大きかった (Figure 3-4A)。抗 GFP 抗体を用いた免疫ブロット解析では、LC3-II を示すバンドがクロロキンの有無に関わらず WT マウス肝細胞に比し IVA-PLA₂ KO マウス肝細胞で濃かった (Figures 3-4B, 3-4D)。なお、トランスフェクション効率はいずれの条件下でも同等に認められた (Figure 3-4C)。これらの結果から、IVA-PLA₂ 欠損は肝実質細胞の恒常的オートファジーを増強することが示唆された。

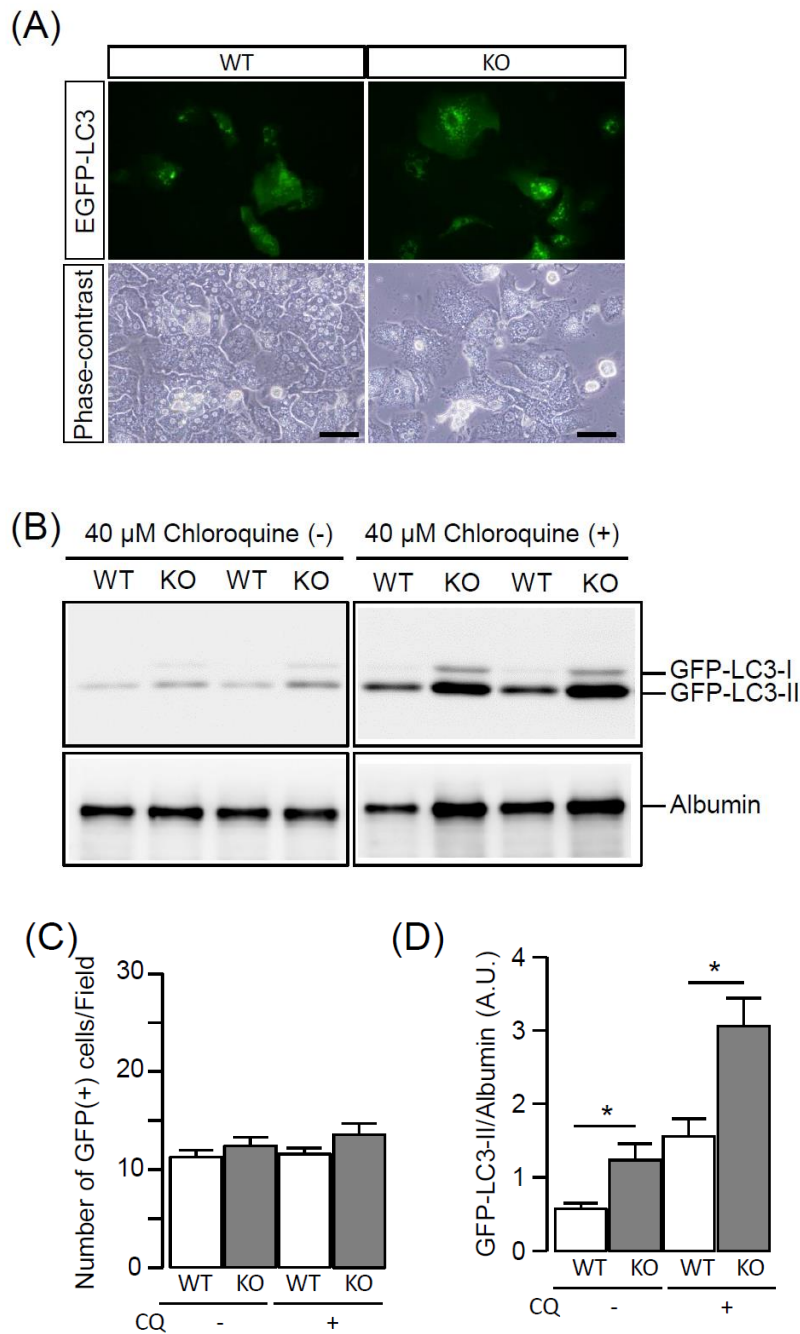


Figure 3-4. The enhancement of constitutive autophagy in primary hepatocytes from IVA-PLA₂-deficient mice

Primary cultured hepatocytes were transiently transfected with an EGFP-LC3 expressing plasmid. At 42 h after the transfection, 40 μ M chloroquine was treated to primary cultured hepatocytes expressing the EGFP-LC3. (A) The GFP-LC3 expression in hepatocytes was observed by fluorescence microscopy, and the cell morphology was visualized by optical microscopy. Scale bar: 50 μ m. (B) Western blots of protein extracts (30 μ g) from hepatocytes probed with an anti-GFP antibody or anti-albumin antibody. (C) The transfection efficiency was estimated as the percentage of GFP-positive cells per total cells in a microscopic fields were examined for each experimental condition. Each value represents the mean (the number of cells) \pm S.E. (n = 3 in each group). (D) The band intensities of EGFP-LC3-II were quantified using the ImageJ software program (NIH). The values were normalized against those of albumin, which reflects the number of hepatocytes. Each value represents the mean (arbitrary unit [A.U.] \pm S.E. (n = 3 in each group). The statistical significance of the differences between the WT and KO hepatocytes was determined using Student's t-test (* P < 0.05)

Cited from Figure 3 of "Ishihara et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 471, 15-20 (2016)".

第4節 考察

本研究においては、IVA-PLA₂ KO マウスでは CCl₄ 誘発性の急性肝障害が WT マウスに比し減少し、さらに肝細胞において恒常的なオートファジーが亢進していることを示した。近年、オートファジーとアポトーシスの間の密接な関連性を示唆する研究が複数報告されている [112]。多くはオートファジーのアポトーシス抑制活性と、細胞障害減弱作用が示唆されているが、特定の場合では、オートファジーのアポトーシス誘導活性や、細胞障害作用の報告もみられる。オートファジー遺伝子である *atg7* を肝実質細胞特異的に欠損させたマウスでは、GalN/LPS 誘発性の肝障害が悪化する [113]。これは、オートファジーが GalN/LPS により引き起こされる細胞障害から肝実質細胞を保護していることを示唆する。今回の結果と既知のこれらの知見を合わせると、IVA-PLA₂ 欠損が CCl₄ 誘発性の急性肝障害を抑制した要因の一部に、肝実質細胞でのオートファジーの増強が関与している可能性が考えられる。本研究結果は IVA-PLA₂ の新たな機能として、CCl₄ 誘発性の肝毒性の増強および肝実質細胞での恒常性オートファジーの抑制という2点を明らかにした。

本研究は脂質膜からアラキドン酸を遊離させる IVA-PLA₂ を欠損したマウスにおいて CCl₄ 誘発性の急性肝障害が軽減されることを示した。同様に、肝障害に対してアラキドン酸カスケード関連因子の阻害が肝障害の軽減に有効であるという報告がされている。COX 阻害剤であるインドメタシン (COX-1, COX-2 阻害剤) およびニメスリド (選択的 COX-2 阻害剤) は GalN/LPS 誘発性の肝障害から肝臓を保護する [114]。また、5-LO の欠損はアセトアミノフェン誘発性の肝毒性を軽減するという報告もある [115]。これらの報告は、エイコサノイドが CCl₄ 誘発性の肝毒性に対する促進因子である可能性を示唆する。一方、本研究結果とは異なる報告もある。IVA-PLA₂ 過剰発現マウスは、GalN/LPS 刺激による急性肝障害を生じたのに対して、Fas 刺激による急性肝障害に抵抗性を示した [82]。GalN/LPS および CCl₄ 誘発性の肝毒性はいずれも酸化ストレスを介すると報告されており [83]、これを考慮すると本研究結果は他の結果と一致する。このように、肝障害における IVA-PLA₂ を介した反応は肝障害を誘発した物質に依存するかもしれない。

本研究では、IVA-PLA₂ が肝細胞における恒常性オートファジーに対して抑制的に働いていると示唆された。しかし、IVA-PLA₂ を過剰発現させたマクロファージでは、インターフェロン γ 誘発性のオートファジーが促進されることも報告されている [105]。それゆえ、オートファジーに対する IVA-PLA₂ の役割もまた肝障害と同様に、細胞種や刺激の種類に依存しているのかもしれない。本実験では、CCl₄ 単回投与により肝実質細胞の細胞死を伴う急性的な肝障害を誘発した。つまり、炎症細胞が肝毒性に寄与したわけではなく、肝実質細胞で代謝された CCl₄ ラジカルが肝実質細胞へ直接的なダメージを与えたと考えられる。一方、マクロファージおよび活性化星細胞を含む線維形成細胞は、CCl₄ 長期投与により誘発される肝線維化を伴う肝障害の進展と進行を仲介する。オートファジー遺伝子である *Atg5* を単球特異的に欠損させたマウスでは、CCl₄ 投与により肝組織中の線維形成細胞の蓄積と肝線維化が促進する [116]。この報告は、マクロファージを介して進展する CCl₄ 誘発性の肝線維化において、マク

ロファージに生じたオートファジーにより肝線維化の進行が抑制されることを示唆している。それゆえ、マクロファージ内の IVA-PLA₂ とオートファジーの相互的な関係は肝線維化の機序を解明するにあたり興味深い。第 1 章で示したように、CCl₄ 長期投与により誘発される肝線維化が IVA-PLA₂ KO マウスで抑制されたことや本研究結果から、我々は CCl₄ を長期間投与した IVA-PLA₂ KO マウスのマクロファージでオートファジーが亢進されたのかもしれないと推察している。

以上をまとめると、IVA-PLA₂ の欠損は CCl₄ 単回投与による急性肝障害と肝細胞死を肝実質細胞の恒常性オートファジーの促進を介して抑制する可能性が考えられた。今後さらなる研究が必要ではあるが、我々は IVA-PLA₂ が急性肝障害の治療標的分子となることを期待している。

総括

本研究では NASH に対する新規治療観点の提唱を目指しており、炎症の制御が治療につながる可能性を考え、炎症反応を担う IVA-PLA₂ に着目して 3 つの検証を行った。第 1 章では HFCD または CCl₄ 誘発性の NASH モデルマウスにおける IVA-PLA₂ の影響を検証した。第 2 章では、臨床的応用を視野に入れ、経口活性型の新規 IVA-PLA₂ 阻害剤 ASB14780 を用いて NASH モデルマウスに対する阻害剤の有効性を検証した。第 3 章では、NASH 発症に先行して生じる肝障害に対する IVA-PLA₂ の影響を肝実質細胞に焦点を当てて検証した。これらの検討結果から以下の知見が得られた。

1. 脂肪肝形成から肝線維化に至る通常の NASH 発症過程をたどる HFCD 誘発性肝線維化モデルマウスにおいて、プロテオーム解析により IVA-PLA₂ 欠損マウスで肝線維化に対して抑制的に関与したタンパク質を 3 つ同定した。また、組織学的検知からも IVA-PLA₂ 欠損マウス肝臓でコラーゲン線維の増加の抑制を観察した。さらに、脂肪肝を介さずに 2nd hit となる酸化ストレスから肝線維化を形成する CCl₄ 誘発性肝線維化形成モデルにおいて、IVA-PLA₂ KO マウスでは WT マウスでみられたコラーゲン蓄積や肝星細胞活性化を示す α -SMA や TGF β 1 の mRNA 発現量の増加を有意に抑制した。また、IVA-PLA₂ KO マウスにおいて、TGF β 1 の産生に関わる炎症性細胞のうち単球やマクロファージの浸潤は抑制されたが、CD8 陽性 T 細胞などは WT マウスと同程度に浸潤していた。したがって、IVA-PLA₂ は肝線維化形成に関与しており、単球やマクロファージの浸潤を促進させる機構がこの線維化形成に関与していることが示唆された。
2. 新規経口活性型 IVA-PLA₂ 阻害剤の ASB14780 の連日の投与は、CCl₄ で誘発される肝組織でのコラーゲン線維の蓄積、単球/マクロファージの誘導、MCP-1 の mRNA 発現増加を抑制し、第 1 章における IVA-PLA₂ KO マウスでの結果と同様に肝線維化の進展を軽減させた。HFCD 誘発性脂肪肝モデルでは、ASB14780 の連日の投与は肝臓における SREBP1c などの脂質合成関連分子の mRNA 発現増加を抑え、脂肪肝の進行を抑制した。また、ASB14780 はほぼ完全に HFCD 摂取による体重増加を抑えたが、IVA-PLA₂ KO マウスでは体重減少は見られなかったため、HFCD 誘発性の肥満に対する ASB14780 の薬理学的効果は IVA-PLA₂ の活性抑制とは独立した作用機序であると考えられた。さらに、ASB14780 は CCl₄ や HFCD 処理で病変が形成された状態において脂肪肝や肝線維化の進行を抑え、肝組織の回復を促した。したがって、ASB14780 は少なくとも可逆性の NASH 病変に対して有効であり、IVA-PLA₂ が脂肪肝や肝線維化の治療において有効な標的分子となる可能性が示された。
3. CCl₄ 単回投与による肝障害・肝毒性モデルにおいて、IVA-PLA₂ KO マウスでは WT マウスに比し血清 AST および ALT レベルの上昇は軽減されており、肝実質細胞に生じた細胞死も抑制されていた。細胞死に対してオートファジーが抑制的に働く報告があることから、

IVA-PLA₂がオートファジーに関与している可能性を考えた。クロロキン処理による恒常的なオートファジーが検出できる条件下では、IVA-PLA₂ KO マウス由来の初代培養肝細胞は WT 由来の細胞に比しオートファジーの指標である LC3-II を増加させた。したがって、肝実質細胞の IVA-PLA₂ は恒常的なオートファジーを抑制しており、酸化ストレス下における急性肝障害を促進させたと考えられる。また、これが継続的な酸化ストレスに伴う肝組織での炎症の惹起にもつながったと考えられる。

以上本研究から、IVA-PLA₂ は HFCD や CCl₄ 誘発性の肝線維化の進展や CCl₄ 誘発性の急性肝障害に対して促進的に作用していることが示唆された。IVA-PLA₂ を介した CCl₄ 誘発性の肝線維化の進展機序の 1 つとして、MCP-1 の発現誘導によるマクロファージの肝組織への集積が考えられる。また、IVA-PLA₂ は肝実質細胞の恒常的なオートファジーを抑制しており、酸化ストレスによる肝障害の亢進に寄与したと考えられる。肝組織において MCP-1 はクッパー細胞や類洞・静脈内皮細胞または肝星細胞などの様々な非実質細胞から産生されている可能性が推測できるが、CCl₄ 単回投与においても IVA-PLA₂ KO マウスが肝障害や肝細胞死を抑制したことを考慮にいと、NASH 進展には肝実質細胞の IVA-PLA₂ が大きく寄与したと考えられる。IVA-PLA₂ により制御される脂質メディエーターは数多く存在しており、作用する細胞や NASH の進行段階においても異なる働きをする可能性があるため、IVA-PLA₂ を介した NASH 進展のメカニズムの解明にはさらなる研究が必要であるが、IVA-PLA₂ の抑制は NASH に対する新しい治療標観点であると期待できると考えている。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 病態生化学分野 秋葉聡教授、薬理学分野 大矢進教授、臨床薬理学分野 中田徹男教授に深謝致します。本研究および本論文を遂行するにあたり、終始適切な御指導を賜りました病態生化学分野 石原慶一講師に深謝致します。また、本研究を進めるにあたり適切な御意見をいただきました同研究室 河下映里助教に、さらに実験に際してご協力をいただきました同研究室内の学生の方々に感謝致します。また、貴重な IVA-PLA₂ 阻害剤 ASB14780 を供与いただいたアスビオファーマ株式会社 林靖浩研究員、永平和広研究員、友尾敏幸研究員に深謝致します。

引用文献

- 1) Masahide Hamaguchi, Noriyuki Takeda, Takao Kojima, Akihiro Ohbora, Takahiro Kato, Hiroshi Sarui, Michiaki Fukui, Chisato Nagata, and Jun Takeda : Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome. *World J. Gastroenterol.* 18, 1580-1516 (2012)
- 2) Eugenia E. Calle, Carmen Rodriguez, Kimberly Walker Thurmond, and Michael J. Thun : Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.*, 348, 1625-1638 (2003)
- 3) Jeffrey D. Browning and Jay D. Horton : Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J. Clin. Invest.*, 114, 147-152 (2004)
- 4) Herbert Tilg and Alexander R. Moschen : Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, 52, 1836-1846 (2010)
- 5) Paul Angulo : Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.*, 346, 1221-1231 (2002)
- 6) David E. Kleiner, Elizabeth M. Brunt, Mark Van Natta, Cynthia Behling, Melissa J. Contos, Oscar W. Cummings, Linda D. Ferrell, Yao-Chang Liu, Michael S. Torbenson, Aynur Unalp-Arida, Matthew Yeh, Arthur J. McCullough, and Arun J. Sanyal : Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 41, 1313-1321 (2005)
- 7) Jeanne M. Clark : The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol.*, 40, S5-S10 (2006) (Suppl. 1)
- 8) C. P. Day : Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 16, 663-678 (2002)
- 9) Isabelle A. Leclercq, Geoffrey C. Farrell, Jaqueline Field, David R. Bell, Frank J. Gonzalez, and Graham R. Robertson : CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J. Clin. Invest.*, 105, 1067-1075 (2000)
- 10) Richard S. Surwit, Cynthia M. Kuhn, Christina Cochrane, James A. McCubbin, and Mark N. Feinglos : Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37, 1163-1167 (1988)
- 11) Martin Weltman, Geoffrey Farrell, and Christopher Liddle : Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology*, 111, 1645-1653 (1996)
- 12) Atul Sahai, Padmini Malladi, Hector Melin-Aldana, Richard M. Green, and Peter F. Whittington : Upregulation of nonalcoholic steatohepatitis in a dietary murine model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G264-G273 (2004)
- 13) Richard Kirsch, Vivian Clarkson, Enid G. Shephard, David A. Marais, Mohamed A. Jaffer, Vivienne E. Woodburne, Ralph E. Kirsch, and Pauline de la M. Hall : Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, atrain and sex difference studies. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 18, 1272-1282 (2003)

- 14) Mary E. Rinella and Richard M. Green : The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J. Hepatol.*, 40, 47-51 (2004)
- 15) Charles S. Lieber, Maria A. Leo, Ki M. Mak, Youging Xu, Qi Cao, Chaoling Ren, Anatoly Ponomarenko, and Leonore M. DeCarli : Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 502-509 (2004)
- 16) Marion A. M. den Boer, Peter J. Voshol, Folkert Kuipers, Louis M. Havekes, Johannes A. Romijn : Hepatic steatosis: a mediator of the metabolic syndrome. Lessons from animal models. *Arterioscler. Thromb. Vac. Biol.*, 24 644-649 (2004)
- 17) Hiromi Ii, Naoki Yokoyama, Shintaro Yoshida, Kae Tsutsumi, Shinji Hatakeyama, Takeshi Sato, Keiichi Ishihara, and Satoshi Akiba : Alleviation of high-fat diet-induced fatty liver damage in group IVA phospholipase A₂-knockout mice. *PLoS ONE*, 4, e8089 (2009)
- 18) Ralph H. Schaloske and Edward A. Dennis : The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 1246-1259 (2006)
- 19) Silvia Perez, Patricia Aspichueta, Begona Ochoa, and Yolanda Chico : The 2-series prostaglandins suppress VLDL secretion in an inflammatory condition-dependent manner in primary rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 160-171 (2006)
- 20) Nobuyuki Enomoto, Kenichi Ikejima, Shunhei Yamashita, 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.*, 279, G100-G106 (2000)
- 21) Md. Abdul Mazid, Abu Asad Chowdhury, Kohjiro Nagao, Kohji Nishimura, Mitsuo Jisaka, Tsutomu Nagaya, and Kazushige Yokota : Endogenous 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J₂ synthesized by adipocytes during maturation phase contributes to upregulation of fat storage. *FEBS Lett.*, 580, 6885-6890 (2006)
- 22) Naonori Uozumi, Kazuhiko Kume, Takahide Nagase, Noriaki Nakatani, Satoshi Ishii, Fumi Tashiro, Yoshinori Komagata, Kazushige Maki, Koichi Ikuta, Yasuyoshi Ouchi, Jun-ichi Miyazaki, and Takao Shimizu : Role of cytosolic phospholipase A₂ in allergic response and parturition. *Nature*, 390, 618-622 (1997)
- 23) Keiichi Ishihara, Kyoko Nakata, Nobuyuki Yamagishi, Shinichi Iwasaki, Nobuo Kireike, and Takumi Hatayama : A comparative proteomic analysis of the rat brain during rebound hyperphagia induced by spacerestriction. *Mol. Cell. Biochem.*, 276, 21-29 (2005)
- 24) Marion M. Bradford : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976)

- 25) L. C. U. Junqueira, G. Bignolas, and R. R. Brentani : Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, 11, 447-455 (1979)
- 26) Ijaz S. Jamall, V.N. Finelli, and S.S. Que Hee : A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal. Biochem.*, 112, 70-75 (1981)
- 27) Kerstin G. Blom, Mousumi Rahman Qazi, Jislene B. Noronha Matos, B. Dean Nelson, Joseph W. DePierre, and Manuchehr Abedi-Valugerdi : Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin. Exp. Immunol.*, 155, 320-329 (2009)
- 28) Maria Guido, Massimo Rugge, Gioacchino Leandro, Isabel M. Fiel, and Swan N. Thung : Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts. *Hepatology*, 26, 310-314 (1997)
- 29) Chantal A. Rivera, Blair U. Bradford, K. J. Hunt, Yukito Adachi, Laura W. Schrum, Dennis R. Koop, Elmar Burchardt, Richard A. Rippe, and Ronald G. Thurman : Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281, G200-207 (2001)
- 30) Alison Crawford, Jill Marie Angelosanto, Kim Lynn Nadwodny, Shawn D. Blackburn, and E. John Wherry : A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection. *PLoS Pathog.*, 7, e1002098 (2011)
- 31) Svetlana Radaeva, Rui Sun, Barbara Jaruga, Van T.Nguyen, Zhigang Tian, and Bin Gao : Natural killer ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cell in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*, 130, 435-452 (2006)
- 32) Alaa Melhem, Muhanna Nidal, Amal Bishara, Carlos E. Alvarez, Yaron Ilan, Taiser Bishara, Amjad Horani, Mithal Nassar, Scott L. Friedman, and Safadi Rifaat : Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J. Hepatol.*, 45, 60-71 (2006)
- 33) Valery Krizhanovsky, Monica Yon, Ross A. Dickins, Stephen Hearn, Janelle Simon, Cornelius Miething, Herman Yee, Lars Zender, and Scott W. Lowe : Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134, 657-667 (2008)
- 34) Nidal Muhanna, Sarit Doron, Ori Waid, Amjad Horani, Ahmed Eid, Orit Pappo, Scott L Friedman., and Rifaat Safadi : Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes. *Hepatology*, 48, 963-77 (2008)
- 35) Ogyi Park, Won-IL Jeong, Lei Wang, Hua Wang, Zhe-Xiong Lian, M. Eric Gershwin, and Bin Gao : Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology*, 49, 1683-1694 (2009)
- 36) Anna Planaguma, Joan Claria, Rosa Miquel, Marta Lopez-Parra, Esther Titos, Jaime L. Masferrer,

- Vicente Arroyo, and Joan Rodes: The selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 reduces liver fibrosis by mechanisms involving non-parenchymal cell apoptosis and PPARgamma activation. *FASEB J*, 19, 1120-1122 (2005)
- 37) Raquel Horrillo, Anna Planaguma, Ana Gonzalez-Periz, Natalia Ferre, Esther Titos, Rosa Miquel, Marta Lopez-Parra, Jaime L. Masferrer, Vicente Arroyo, and Joan Claria : Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 323, 778-786 (2007)
- 38) Alex Y. Hui, Andrew J Dannenberg, Joseph J. Y. Duung, Kotha Subbaramaiah, Booheng Du, Peter Olinga, Scott L. Friedman : Prostaglandin E₂ inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1 (1) in hepatic stellate cells. *J. Hepatol.*, 41, 251-258 (2004)
- 39) Sankhavaram R. Panini, Lin Yang, Antonio E. Rusinol, Michael S. Sinensky, Joseph V. Bonventre and Christina C. Lesline : Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *J. Lipid Res.*, 42, 1678-1686 (2001)
- 40) Svetlana Radaeva, Rui Sun, Barbara Jaruga, Van T. Nguyen, Zhigang Tian, and Bin Gao : Natural killer cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*, 130, 435-452 (2006)
- 41) Alaa Melhem, Nidal Muhanna, Amal Bishara, Carlos E. Alvarez, Yaron Ilan, Taiser Bishara, Amjad Horani, Mithal Nassar, Scott L. Friedman, and Rifaat Safadi : Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J. Hepatol.*, 45, 60-71 (2006)
- 42) Valery Krizhanovsky, Monica Yon, Ross A. Dickins, Stephen Hearn, Janelle Simon, Cornelius Miething, Herman Yee, Lars Zender, and Scott W. Lowe : Senscence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134, 657-667 (2008)
- 43) Nidal Muhanna, Sarit Doron, Ori Wald, Amjad Horani, Ahmed Eid Orit Pappo, Scott L. Friedman, Rifaat Safadi : Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocyte. *Hepatology*, 48, 963-977 (2008)
- 44) Ogyi Park, Won-IL Jeong, Lei Wang, Hua Wang, Zhe-Xiong Lian, M. Eric Gershwin, and Bin Gao : Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology*, 49, 1683-1694
- 45) Fabio Marra, Roberto G. Romanelli, Carlo Giannini, Paola Failli, Sabbina Pastacaldi, Maria Cristina Arrighi, Massimo Pinzani, Giacomo Laffi, Paolo Montalto, and Paolo Gentilni : Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 29, 140-148 (1999)
- 46) William A. Muller : New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. *J. Exp. Med.*, 194, F47-F51
- 47) Li Huang, Annie Zhao, Frederick Wong, Julia M. Ayala, Mary Struthers, Feroze Ujjaimwalla, Samuel D. Wright, Marty S. Springer, Jilly Evans, and Jisong Cui : Leukotriene B4 strongly

- increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocyte. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24, 1783-1788 (2004)
- 48) Eva Efsen, Andrea Bonacchi, Sabbina 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*, 33, 713-721
- 49) Karen M. Kassel, Grace L. Guo, Ossama Tawfik, and James P. Luyendyk : Monocyte chemoattractantprotein-1 deficiency does not affect stratosis or inflammation in livers of mice fed a methionine-choline deficient diet. *Lab. Invest.*, 90, 1794-1804 (2010)
- 50) Ekihiro Seki, Samuele De Minicis, Sayaka Inokuchi, Kojiro Taura, Katsumi Miyai, Nico Rooijen, Robert F. Schwabe, and David A. Brenner : CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*, 50, 185-197 (2009)
- 51) Jeremy S. Duffield, Stuart J. Forbes, Christothea M. Constandinou, Spike Clay, Marina Partolina, Srilatha Vuthoori, Shengji Wu, Richard Lang, and John P. Iredale : Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invedt.*, 115, 56-65 (2005)
- 52) Giulio Marchesini, Simona Moscatiello, Silva Di Domizio, and Gabriele Forlani : Obesity-associated liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 93, S74-80 (2008)
- 53) Renata Belfort, Stephen A. Harrison, Kenneth Brown, Celia Darland, Joan Finch, Jean Hardies, Bogdan Balas, Amalia Gastaldelli, Femin Tio, Josph Pulcini, Rachele Berria, Jenni Z. Ma, Sunil Dwivedi, Russell Havranek, Chris Finche, Ralph DeFronzo, George A. Bannayan, Steven Schenker, and Kenneth Cusi : A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 355, 2297-2307 (2006)
- 54) Guruprasad P. Aithal, James A. Thomas, Philip V. Kaye, Adam Lawson, Stephen D. Ryder, Ian Spendlove, Andrew S. Austin, Jan G. Freeman, Linda Morgan, and Jonathan Webber : Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 135, 1176-1184 (2008)
- 55) Arun J. Sanyal, Naga Chalasani, Kris V. Kowdley, Arthur McCullough, Anna Mae Diehl, Nathan M. Bass, Brent A. Neuschwander-Tetri, Joel E. Lavine, James Tonascia, Aynur Unalp, Mark Van Natta, Jeanne Clark, Elizabeth M. Brunt, Davit E. Kleiner, Jay H. Hoofnagle, and Patricia R. Robuck : Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 362, 1675-1685 (2010)
- 56) Rodrigo M. Lago, Premranjan P. Singh, Richard W. Nesto : Congestive heart failure and cardiovascular death in patients with prediabetes and type 2 daibetes given thiazolidinediones: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Lancet*, 370, 1129-1136 (2007)
- 57) Carlo Piccinni, Domenico Motola, Giulio Marchesini, and Elisabetta Poluzzi : Assessing the

- association of pioglitazone use and bladder cancer through drug adverse event reporting. *Diabetes Care*, 34, 1369-1371 (2011)
- 58) Beata Lecka-Czenik : Bone loss in diabetes: use of antidiabetic thiazolidinediones and secondary osteoporosis. *Curr. Osteoporos Rep.*, 8, 178-184 (2010)
- 59) John C. McKew, Frank Lovering, James D. Clark, Jean Bemis, YiBin Xiang, Marina Shen, Wen Zhang, Juan C. Alvarez and Diane Joseph-McCarthy : Structure-activity relationships of indole cytosolic phospholipase A₂α inhibitors: Substrate mimetics. *Bioorg Med. Chem. Lett.*, 13, 4501-4504 (2003)
- 60) John C. McKew, Megan A. Foley, Paresh Thakker, Mark L. Behnke, Frank E. Lovering Fuk-Wah Sum, Steve Tam, Kun Wu, Marina W. H. Shen, Wen Zhang, Mario Gonzalez, Shanghao Liu, Aun Mahadevan, Howard Sard, Soo Peang Khor, and James D. Clark : Inhibition of cytosolic phospholipase A₂α: Hit to lead optimization. *J. Med. Chem.*, 49, 135-158 (2006)
- 61) Katherine L. Lee, Megan A. Foley, Lihren Chen, Mark L. Behnke, Frank E. Lovering, Steven J. Kirincich, Weiheng Wang, Jaehul Shim, Steve Tam, Marina W. H. Shen, SooPeang Khor, Xin Xu, Debra G. Goodwin, Manjunath K. Ramarao, Cheryl Nickerson-Nutter, Frances Donahue, M. Shery Ku, James D. Clark, and John C. McKew : Discovery of Ecopladib, an indole inhibitor of cytosolic phospholipase A₂α. *J. Med. Chem.*, 50, 1380-1400 (2007)
- 62) John C. Mckew, Katherine L. Lee, Marina W. H. Shen, Paresh Thakker, Megan A. Foley, Mark L. Behnke, Baihua Hu, Fuk-Wah Sum, Steve Tam, Yonghan Hu, Lihren Chen, Steven J. Kirincich, Ronald Michalak, Jennifer Thomason, Xin Xu, Frances Donahue, M. Sherry Ku, James Keith, Cheryl L. Nickerson-Nutter, William M. Abraham, Cara Williams, Martin Hegen, and James D. Clark : Indole cytosolic phospholipase A₂α inhibitors: discovery and in vitro and in vivo characterization of 4-{3-[5-chloro-2-(2-[(3,4-dichlorobenzyl)sulfonyl]amino)ethyl]-1-(diphenylmethyl)-1H-indol-3-yl]propyl}benzoic acid, efipladib. *J. Med. Chem.*, 51, 3388-3413 (2008)
- 63) Kaoru Seno, Takayuki Okuno, Koichi Nishi, Yasushi Murakami, Fumihiko, Watanabe, Takaharu Matsuura, Masaki Wada, Yasuhiko Fujii, Masaaki Yamada, Tomoyuki Ogawa, Tetsuo Okada, Hiroshi Hiroshi Hashizume, Makoto Kii, Shin-ichiro Hara, Sanji Hagishita, Yukiko Chikazawa, Masahiko Ueno, Isao Teshirogi, Takashi Ono, and Mitsuaki Ohtani : Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A₂. *J. Med. Chem.*, 43, 1041-1044 (2000)
- 64) Kaoru Seno, Takayuki Okuno, Koichi Nishi, Yasushi Murakami, Katsutoshi Yamada, Shozo Nakamoto, and Takashi Ono : Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A₂. Part 2: synthesis of potent and crystallized 4-triphenylmethylthio derivative 'Pyrrophenone'. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 587-590 (2001)
- 65) Takashi Ono, Katsutoshi Yamada, Yukiko Chikazawa, Masahiko Ueno, Shozo Nakamoto, Takayuki Okuno, and Kaoru Seno : Characterization of a novel inhibitor of cytosolic

- phospholipase A₂α, pyrrophenone. *Biochem. J.*, 363, 727-735 (2002)
- 66) N. Flamand, S. Picard, L. Lemieux, M. Pouliot, S. G. Bourgoïn, and P. Borgeat : Effects of pyrrophenone, an inhibitor of group IVA phospholipase A₂, on eicosanoid and PAF biosynthesis in human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.*, 149, 385-392 (2006)
- 67) Stephen Connolly, Colin Bennion, Sarah Bottetell, Pamela J. Croshaw, Catherine Hallam, Kim Hardy, Paul Hartopp, Clive G. Jackson, Sarah J. King, Louise Lawrence, Antonio Mete, David Murray, David H. Robinson, Gillian M. Smith, Linda Stein, Iain Walters, Edward Wells, and W. John Withnall : Design and synthesis of a novel and potent series of inhibitors of cytosolic phospholipase A₂ based on a 1,3-disubstituted propan-2-one skeleton. *J. Med. Chem.*, 45, 1348-1362 (2002)
- 68) Joachim Ludwig, Stefanie Bovens, Carsten Brauch, Alwine Schulze Elfringhoff, and Matthias Lehr : Design and synthesis of 1-indol-1-yl-propan-2-ones as inhibitors of human cytosolic phospholipase A₂α. *J. Med. Chem.*, 49, 2611-2620 (2006)
- 69) Mark Hess, Alwine Schulze Elfringhoff, and Matthias Lehr : 1-(5-Carboxy- and 5-carbamylindol-1-yl)propan-2-ones as inhibitors of human cytosolic phospholipase A₂α: bioisosteric replacement of the carboxylic acid and carboxamide moiety. *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 2883-2891 (2007)
- 70) Alexandra Fritsche, Alwine Schulze Elfringhoff, Jorg Fabian, and Matthias Lehr : 1-(2-Carboxyindol-5-yloxy)propan-2-ones as inhibitors of human cytosolic phospholipase A₂α: synthesis, biological activity, metabolic stability, and solubility. *Bioorg Med. Chem.*, 16, 3489-3500 (2008)
- 71) George Kokotos, Stavroula Kotsovolou, David A. Six, Violetta Constantinou-Kokotou, Christopher C. Beltzner, and Edward A. Dennis : Novel 2-oxoamide inhibitors of human group IVA phospholipase A₂. *J. Med. Chem.*, 45, 2891-2893 (2002)
- 72) George Kokotos, David A. Six, Vassilios Loukas, Timothy Smith, Violetta Constantinou-Kokotou, Dimitra Hadjipavlou-Litina, Stavroula Kotsovolou, Antonia Chiou, Christopher C. Beltzner, and Edward A. Dennis : Inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ by novel 2-oxoamides in vitro, in cells, and in vivo. *J. Med. Chem.*, 47, 3615-3628 (2004)
- 73) Daren Stephens, Efrosini Barbayianni, Violetta Constantinou-Kokotou, Anna Peristeraki, Davio A. Six, Jennifer Cooper, Richard Harkewicz, Raymond A. Deems, Edward A. Dennis, and George Kokotos : Differential inhibition of group IVA and group VIA phospholipases A₂ by 2-oxoamides. *J. Med. Chem.*, 49, 2821-2828 (2006)
- 74) David A. Six, Efrosini Barbayianni, Vassilios Loukas, Violetta Constantinou-Kokotou, Dimitra Hadjipavlou-Litina, Daren Stephens, Alan C. Wong, Victoria Magrioti, Panagiota Moutevelis-Minakakis, Sharon F. Baker : Structure-activity relationship of 2-oxoamide inhibition of group IVA cytosolic phospholipase A₂ and group V secreted phospholipase A₂. *J. Med. Chem.*,

50, 4222-4235 (2007)

- 75) Toshiyuki Tomoo, Takashi Nakatsuka, Toyoko Katayama, Yasuhiro Hayashi, Yusuke Fujieda, Maki Terakawa, and Kazuhiro Nagahira : Design, synthesis, and biological evaluation of 3-(1-Aryl-1H-indol-5-yl)propanoic acids as new indol-based cytosolic phospholipase A₂ α inhibitors. *J. Med. Chem.*, 57, 7244-7262 (2014)
- 76) Thomas K. H. Chang, Charles L. Crespi, and David J. Waxman : Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed *p*-nitrophenol hydroxylation. *Methods Mol. Biol.*, 320, 127-131 (2006)
- 77) Toshikazu Noguchi, Kuo-Lan Fong, Edward K. Lai, Steve S. Alexander, M. Margaret King, Larry Olson, J. Lee Poyer, and Paul B. McCay: Specificity of a Phenobarbital-induced cytochrome P-450 for metabolism of carbon tetrachloride to the trichloromethyl radical. *Biocheml. Pharmacol.*, 31, 615-624 (1982)
- 78) Sreedevi Avasarala, Lei Yang, Yan Sun, Alice Wan-Chi Leung, Wood-Yee Chan, Wing-Tai Cheung, and Susanna Sau-Tuen Lee : A temporal study on the histopathological, biochemical and molecular responses of CCl₄-induced hepatotoxicity in Cyp2e1-null mice. *Toxicology*, 228, 310-322 (2006)
- 79) Claudia Mitchell, Dominique Couton, Jean-Pierre Couty, Marie Anson, Anne-Marie Crain, Vinciane Bizet, Laurent Renia, Stanislas Pol, Vincent Mallet, and Hekene Gilgenkrantz : Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am. J. Pathol.*, 174, 1766-1775 (2009)
- 80) Hye-Kyung Kim and Judith Storch : Free fatty acid transfer from rat liver fatty acid-binding protein to phospholipid vesicles. Effect of ligand and solution properties. *J. Biol. Chem.*, 267, 77-82 (1992)
- 81) J. Denis McGarry and Nicholas F. Brown : The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.*, 244, 1-14 (1997)
- 82) Guiying Li, Weina Chen, Chang Han, and Tong Wu : Cytosolic phospholipase A₂ α protects against Fas- but not LPS-induced liver injury. *J. Hepatol.*, 55, 1281-1290 (2011)
- 83) Naomi Osakabe, Akiko Yasuda, Midori Natsume, Chiaki Sanbongi, Yoji Kato, Toshihiko Osawa, and Toshikazu Yoshikawa : Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Rad. Biol. Med.*, 33, 798-806 (2002)
- 84) Giovanni Musso, Roberto Gambino, Maurizio Cassader, and Gianfranco Pagano : A meta-analysis of randomized trials for the treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 52, 79-104 (2010)
- 85) Flavio Lirussi, Lorenzo Azzalini, Serena Orando, Rocco Orlando, and Francesco Angelico : Antioxidant supplements for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD004996 (2007)

- 86) Francesco Angelico, Marco Burattin, Cesare Alessandri, Maria Del Ben, and Flavio Lirussi : Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD005166 (2007)
- 87) Rocco Oriando, Lorenzo Azzalini, Serena Orando, and Flavio Lirussi : Bile acids for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev.*, CD005160 (2007)
- 88) Min-Ho Lee, Ji-Won Kim, Ju-Han Kim, Kyung-Sun Kang, Gu Kong, and Mi-Ock Lee : Gene expression profiling of murine hepatic steatosis induced by tamoxifen. *Toxicol. Lett.*, 199, 416-424 (2010)
- 89) Christopher J. Lelliott, Miguel Lopez, R. Keira Curtis, Nadeene Parker, Matthias Laudes, Giles Yeo, Mercedes Jimenezp-Linan, Johannes Grosse, Asish K. Saha, David Wiggins, David Hauton, Martin D. Brand, Stephen O’Rahilly, Julian L. Griffin, Geoffrey F. Gibbons, and Antonio Vidal-Puig : Transcript and metabolite analysis of the effects of tamoxifen in rat liver reveals inhibition of fatty acid synthesis in the presence of hepatic steatosis. *FASEB J.*, 19, 1108-1119 (2005)
- 90) Laura K. Cole, Rene L. Jacobs, and Dennis E. Vance : Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis. *Hepatology*, 52, 1258-1265 (2010)
- 91) Oddrun Anita Gudbrandsen, Therese Halvorsen Rost, and Rolf Kristian Berge : Causes and prevention of tamoxifen-induced accumulation of triacylglycerol in rat liver. *J. Lipid Res.*, 47, 2223-2232 (2006)
- 92) Ramon Bataller and David A. Brenner : Liver fibrosis. *J.Clin. Invest.*, 115, 209-218 (2005)
- 93) Young-Oh Kweon, Zachary D. Goodman, Jules L. Dienstag, Eugene R Schiff, Nathaniel A Brown, Elmar Burkhardt, Robert Schoonhoven, David A. Brenner, and Michael W. Fried : Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J.Hepatol.*, 35, 749-755 (2001)
- 94) Giulio Marchesini and Gabriele Forlani : NASH: from liver diseases to metabolic disorders and back to clinical hepatology. *Hepatology*, 35, 497-499 (2002)
- 95) Paul Angulo : Nonalcoholic fatty liver disease. *New Engl. J. Med.*, 346, 1221-1231 (2002)
- 96) Santiago Tome and Michael R. Lucey : Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol. Ther.*, 19, 707-714 (2004)
- 97) Albert J. Czaja and Herschel A Carpenter : Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.*, 40, 646-652 (2004)
- 98) Herbert Tilg : The role of cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.*, 28, 179-185 (2010)
- 99) Claudia O. Zein, Lisa M. Yerian, Prema Gogate, Rocio Lopez, John P. Kirwan, Ariel E. Feldstein,

- and Arthur J. McCullough : Pentoxifylline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology*, 54, 1610-1619 (2011)
- 100) Beth Levine, and Daniel J. Klionsky : Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*, 6, 463-477 (2004)
- 101) Aaron Ciechanover, Amir Orian, and Alan L. Schwartz : Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays*, 22, 442-451 (2000)
- 102) Natalia B. Nedelsky, Peter K. Todd, and J. Paul Taylor : Autophagy and the ubiquitin-proteasome system: Collaborators in neuroprotection. *Biochim. Biophys. Acta*, 1782, 691-699 (2008)
- 103) Noboru Mizushima, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori, Yae Tanaka, Tomoko Ishii, Michael D. George, Daniel J. Klionsky, Mariko Ohsumi, and Yoshinori Ohsumi : A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395, 395-398 (1998)
- 104) Yukiko Kabeya, Noboru Mizushima, Takashi Ueno, Akitsugu Yamamoto, Takayoshi Kirisako, Takeshi Noda, Eiki Kominami, Yoshinori Ohsumi, and Tamotsu Yoshimori : LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, 19, 5720-5728 (2000)
- 105) Maximiliano G. Gutierrez, Sharon S. Master, Sudha B. Singh, Gregory A. Taylor, Maria I. Colombo, and Vojo Deretic : Autophagy is a Defense Mechanism inhibiting BCG and mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*, 119, 753-766 (2004)
- 106) Beth Levine : Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 120, 159-162 (2005)
- 107) Hai-Yan Qi, Mathew P. Daniels, Yueqin Liu, Li-Yuan Chen, Sara Alsaaty, Stewart J. Levine, and James H. Shelhamer : A cytosolic phospholipase A₂-initiated lipid mediator pathway induces autophagy in macrophages. *J. Immunol.*, 187, 5286-5292 (2011)
- 108) James E. Klaunig, Peter J. Goldblatt, David E. Hinton, Michael M. Lipsky, Jacob Chacko, and Benjamin F. Trump : Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro*, 17, 913-925 (1981)
- 109) Che-Pei Kung, Anna Budina, Gregor Balaburski, Marika K. Bergenstock, and Maureen E. Murphy : Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 21, 71-100 (2011)
- 110) Daniel J. Klionsky et al. : Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4, 151-175 (2008)
- 111) Noboru Mizushima and Tamotsu Yoshimori : How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3, 542-545 (2007)
- 112) Guillermo Marino, Mireia Niso-Santano, Eric H. Baehrecke, and Guido Kroemer : Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15, 81-94 (2014)
- 113) Muhammad Amir, Enpeng Zhao, Luis Fontana, H. Rosenberg, Kathryn Tanaka, G. Gao, and

- Mark J. Czaja : Inhibition of hepatocyte autophagy increases tumor necrosis factor-dependent liver injury by promoting caspase-8 activation. *Cell Death Differ.*, 20, 878-887 (2013)
- 114) Emily C. Liong, Jia Xiao, Thomas Y. H. Lau, Amin A. Nanji, and George L. Tipoe : Cyclooxygenase inhibitors protect D-galactosamine/lipopolysaccharide induced acute hepatic injury in experimental mice model. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 861-866 (2012)
- 115) Miriam S. N. Hohmann, Renato D. R. Cardoso, Felipe A. Pinho-Ribeiro, Jefferson Crespigio, Thiago M. Cunha, Jose C. Alves-Filho, Rosiane V. Da Silva, Phileno Pinge-Filho, Sergio H. Ferreira, Fernando Q. Cunha, Rubia Casagrande, and Waldiceu A. Verri Jr. : 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced hepatotoxicity and lethality. *Biomed.Res. Int.*, 2013, 627046 (2013)
- 116) Jasper Lodder, Timothe Denaes, Marie-Noele Chobert, JingHong Wan, Jamel El-Benna, Jean-Michel Pawlotsky, Sophie Lotersztajn, and Fatima Teixeira-Clerc : Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice. *Autophagy*, 11, 1280-1292 (2015)