



Thrombospondin-1 promotes liver fibrosis by enhancing TGF- β action in hepatic stellate cells

今森, 真

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8786号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490011>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Thrombospondin-1 promotes liver fibrosis by enhancing
TGF- β action in hepatic stellate cells

トロンボスポンジン-1 は肝星細胞における TGF- β 活性化を
増強することにより肝線維化を促進する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

糖尿病・内分泌・総合内科学分野 糖尿病・内分泌内科学

(指導教員：小川 渉教授)

今森 真

【背景・目的】

脂肪組織のインスリン抵抗性は、metabolic dysfunction associated steatotic liver disease (MASLD)、metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) の病態に密接に関与すると考えられているが、分子機序は不明である。我々は、インスリン作用の発現に中心的な役割を担う分子 PDK1 の脂肪細胞特異的欠損 (A-PDK1KO) マウスが、インスリン抵抗性と糖脂質代謝異常に加え MASH を呈すること、PDK1 下流の転写因子 FoxO1 を脂肪細胞特異的に追加欠損する脂肪細胞特異的 PDK1/FoxO1 ダブル欠損 (A-PDK1/FoxO1DKO) マウスにおいて、インスリン抵抗性と糖代謝異常、MASH が改善することを示し、脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路が全身の代謝制御に重要であることを明らかとした。本研究では、脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路と MASH を繋ぐ機序の検討を行った。

【方法・結果】

脂肪組織のインスリン抵抗性と MASH の発生機序を明らかにするために、トランスクリプトーム解析により A-PDK1KO マウスの脂肪組織で発現が増加し、A-PDK1/FoxO1DKO マウスで正常化する因子として細胞外マトリックスタンパク質 TSP-1 を見出した。高脂肪食 (HFD) を摂取した C57BL/6J マウスの精巣周囲脂肪組織における TSP-1 の遺伝子発現は、通常食を摂取したマウスと比較して顕著に増加した。マウス単離脂肪細胞の培養上清のイムノブロット解析により、細胞数に依存して TSP-1 が細胞から分泌されていることが明らかとなった。また、HFD を摂取したマウスでは、通常食と比較してマウス単離脂肪細胞からの TSP-1 分泌が顕著に増加した。以上の結果より、TSP-1 は脂肪組織の機能不全に伴って発現増加するアディポカインである可能性が示唆された。

次に、脂肪細胞における TSP-1 の発現と分泌調節について検討を行った。脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の TSP-1 遺伝子は血清スターブによって有意に増加したが、インスリン刺激によりこの遺伝子発現をインスリン濃度依存的に抑制した。さらに、インスリン刺激により 3T3-L1 細胞から培養液中への TSP-1 分泌が大きく阻害された。また、C57BL/6J マウスにおける絶食と再摂食の影響を解析した。マウスの精巣周囲脂肪組織中における TSP-1 遺伝子発現は絶食により顕著に増加し、再摂食により強く抑制された。以上より、インスリンが生理的条件下の脂肪組織における TSP-1 発現の調節に重要な役割を果たすことが示唆された。次に、マウス単離脂肪細胞におけるインスリン受容体の下流シグナルである PDK1-FoxO1 軸の役割について、解析を行った。インスリンによる TSP-1 遺伝子発現や TSP-1 分泌の抑制は PDK1 阻害剤によって解除されたのに対し、この PDK1 阻害剤の作用は FoxO1 阻害剤によって再度抑制された。これらの結果より、脂肪細胞における TSP-1 の遺伝子発現と分泌は、PDK1-FoxO1 軸を介したインスリンシグナル伝達によって調節されることが示唆された。

我々は TSP-1 と MASH の病理学的関連を検討するために、A-PDK1KO マウスを全身性 TSP-1 欠損マウスと交配させて、TSP-1 欠損バックグラウンドの脂肪細胞特異的 PDK1 欠損 (A-PDK1/TSP-1DKO) マウスを作成した。A-PDK1KO マウスと A-PDK1/TSP-1DKO マウスに HFD を 20 週間与え、解析を行った。A-PDK1/TSP-1DKO マウスの体重は、A-PDK1KO マウスと比べ有意な低下を認めた。一方で、A-PDK1KO マウスと A-PDK1/TSP-1DKO マウスでは、血糖値、血漿インスリン濃度、血漿トリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸濃度などの脂質パラメータに差は認められず、TSP-1 は A-PDK1KO マウスにおけるインスリン抵抗性、高血糖、脂質異常症の病因には寄与しないことが示唆された。

A-PDK1/TSP-1DKO マウスでは、A-PDK1KO マウスと比較して血漿 AST 値および ALT 値は低下傾向が認められた。A-PDK1/TSP-1DKO マウスは、A-PDK1KO マウスと比較して肝重量が有意に減少した。組織学的解析により、A-PDK1KO マウスと A-PDK1/TSP-1DKO マウスの肝臓において同様に明瞭な脂肪蓄積、炎症性細胞浸潤、および風船様変性が認められたが、A-PDK1/TSP-1DKO マウスで肝線維化の顕著な改善と肝臓のヒドロキシプロリン含量の有意な減少を認めた。これらの結果と一致して、脂肪合成や炎症に関連する遺伝子発現についてマウス間に差はなかったが、A-PDK1/TSP-1DKO マウスでは *Coll1a1*、*Coll1a2*、*Col3a1*、*Timp1* などの線維化関連遺伝子の発現は有意に低下した。HFD を摂取した A-PDK1KO マウスにおける肝線維化の発症に TSP-1 が関与していることが示唆された。

TSP-1 による肝線維化の機序を調べるために、ヒト肝星細胞株 LX-2 細胞における TGF- β 作用に対する TSP-1 の影響について検討した。LX-2 細胞において、TSP-1 処理によって TGF- β 作用の増強が認められ、*COL1A1* や *TIMP1* などの線維化関連遺伝子の発現が有意に増加した。以上より、TSP-1 が肝星細胞で TGF- β の作用を増強することにより、肝線維化を促進することが示唆された。

【考察】

我々は、MASH を呈する A-PDK1KO マウスの脂肪組織で発現が増加し、MASH の改善を伴う A-PDK1/FoxO1DKO マウスで正常化した分泌因子として細胞外マトリックスタンパク質である TSP-1 に着目した。MASH における TSP-1 の病態生理学的な関連性を明らかとするため、全身性 TSP-1 欠損マウスと A-PDK1KO マウスを交配し A-PDK1KO/TSP-1DKO マウスを作成し、HFD を摂取した A-PDK1KO マウスにおいて、TSP-1 の追加欠損が MASH の発症に及ぼす影響を検討した。この TSP-1 の追加欠損は、A-PDK1KO マウスで肝線維化を顕著に改善することが示された。また、TSP-1 は肝星細胞における線維化関連遺伝子の TGF- β による誘導発現を増強することも示された。さらに、マウス単離脂肪細胞および脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を用いた検討により、TSP-1 発現が PDK1-FoxO1 軸を介したインスリンシグナル伝達により制御されていることを明らかとした。以上の結果より、脂肪細

胞の PDK1-FoxO1 軸によって制御される TSP-1 は、肝星細胞の TGF- β 作用を増強することにより、肝線維化を促進することが示唆された。

TSP-1 は、血小板、マクロファージ、脂肪細胞など、様々な細胞から分泌され、血管新生、炎症、組織リモデリングなど幅広い生理学的・病理学的プロセスへの関与が報告されているが、MASLD/MASH の発症における TSP-1 の役割は不明である。今回我々の検討において、TSP-1 は肝星細胞の TGF- β 作用を増強することにより、脂肪組織インスリン抵抗性による肝線維化を媒介することが示された。この結果は、マウスの MASH におけるコリン欠乏 L-アミノ酸高脂肪食モデルにおいて、TSP-1 欠損が肝線維化を改善した先行研究と一致する。

我々は MASH モデルである A-PDK1KO マウスの脂肪組織で発現が変化する分泌蛋白質である TSP-1 に着目し、そのマウスにおいて全身性の TSP-1 欠損が肝線維化を改善することを示したが、肝線維化を促進する TSP-1 の細胞源の特定には至らなかった。TSP-1 は脂肪組織において肝臓よりも高度に発現すること、線維化を伴う慢性肝疾患の患者でも発現が亢進することが報告されている。今後、A-PDK1KO マウスを基に組織特異的な TSP-1 欠損マウスを作出することで、MASH の発症に寄与する TSP-1 の発生源について検討する必要があると考えられる。

TSP-1 の発現の調節機序は、特に脂肪細胞において不明である。我々は、MASH を発現する A-PDK1KO マウスにおいて脂肪組織中の TSP-1 発現が増加し、A-PDK1/FoxO1DKO マウスにおいて MASH の改善により正常化することを見出した。さらに、マウス単離脂肪細胞および 3T3-L1 細胞を用いた検討により、TSP-1 発現が PDK1-FoxO1 軸を介したインスリンシグナル伝達によって制御されていることを明らかとした。FoxO1 は下流の転写因子であり、その活性はインスリンによって負の影響を受ける。マウス TSP-1 遺伝子のプロモーター領域には FoxO1 との結合部位を有するため、脂肪細胞における TSP-1 発現は FoxO1 によって直接制御される可能性がある。そのため、PDK1-FoxO1 軸を介したインスリンシグナル伝達は、脂肪細胞における TSP-1 発現の治療標的となる可能性がある。

以上の結果より、TSP-1 欠損により、マウス脂肪組織のインスリン抵抗性に起因する肝線維化が改善することを示した。また、脂肪細胞における TSP-1 の発現は、PDK1-FoxO1 軸を介したインスリンシグナル伝達によって制御されることを明らかとした。したがって、我々の研究結果において、TSP-1 は脂肪組織のインスリン抵抗性と MASH を結びつける重要なアディポカインと考えられ、MASH 患者における肝線維化の治療標的の開発に資する可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3357 号	氏 名	今森 真
論文題目 Title of Dissertation	<p>トロンボスポンジン-1 は肝星細胞における TGF-β 活性化を増強することにより肝線維化を促進する</p> <p>Thrombospondin-1 promotes liver fibrosis by enhancing TGF-β action in hepatic stellate cells</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 児玉 裕之 Chief Examiner</p> <p>副 査 鈴木 聡 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 康博 Vice-examiner</p>		

(要旨は1, 000字~2, 000字程度)

【背景・目的】

脂肪組織のインスリン抵抗性は、metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) の病態に密接に関与すると考えられているが、分子機序は不明である。我々は、インスリン作用の発現に中心的な役割を担う分子 PDK1 の脂肪細胞特異的欠損 (A-PDK1KO) マウスが、インスリン抵抗性と糖脂質代謝異常に加え MASH を呈すること、PDK1 下流の転写因子 FoxO1 を脂肪細胞特異的に追加欠損する脂肪細胞特異的 PDK1/FoxO1 ダブル欠損 (A-PDK1/FoxO1DKO) マウスにおいて、インスリン抵抗性と糖代謝異常、MASH が改善することを示し、脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路が全身の代謝制御に重要であることを明らかにした。本研究では、脂肪細胞の PDK1-FoxO1 経路と MASH を繋ぐ機序の解析を行った。

【方法・結果】

オミックス解析により A-PDK1KO マウスの脂肪組織で発現が増加し、A-PDK1/FoxO1DKO マウスで正常化する因子として細胞外マトリックスタンパク質 TSP-1 を見出した。脂肪組織における TSP-1 の発現について検討した結果、TSP-1 は脂肪組織の機能不全に伴って発現増加するアディポカインである可能性が考えられた。さらに、脂肪細胞における TSP-1 の発現と分泌調節について解析が行われた。その結果、インスリンが生理的条件下の脂肪組織における TSP-1 発現と分泌調節に重要な役割を果たすこと、PDK1-FoxO1 軸を介したインスリンシグナル伝達によって調節されることが明らかとなった。

TSP-1 と MASH の病理学的関連を検討するために、A-PDK1KO マウスを全身性 TSP-1 欠損マウスと交配し、TSP-1 欠損バックグラウンドの脂肪細胞特異的 PDK1 欠損 (A-PDK1/TSP-1DKO) マウスを作製し、これらマウスに高脂肪食を 20 週間与え解析が行われた。A-PDK1/TSP-1DKO マウスの体重は、A-PDK1KO マウスと比べ有意な低下を認めた。その一方で、両マウス間に血糖値、血漿インスリン濃度、血漿トリグリセリドなどの脂質パラメータに差は認められず、TSP-1 は A-PDK1KO マウスにおけるインスリン抵抗性と糖脂質代謝異常には寄与しないと考えられた。

A-PDK1/TSP-1DKO マウスでは A-PDK1KO マウスと比較して、血漿 AST・ALT 値は低下傾向を認め、肝重量は有意に減少した。組織学的解析により、両マウスの肝臓において同程度の脂肪蓄積、炎症性細胞浸潤、および風船様変性が認められたが、A-PDK1/TSP-1DKO マウスで肝線維化の顕著な改善を認めた。これらの結果と一致して、脂肪合成や炎症に関連する遺伝子発現についてマウス間に差は認められず、A-PDK1/TSP-1DKO マウスでは線維化関連遺伝子の発現は有意な低下を示した。以上より、肝線維化の発症に TSP-1 が関与していると考えられた。

最後に、TSP-1 による肝線維化についてヒト肝星細胞株 LX-2 細胞における TGF- β 作用に対する TSP-1 の影響について検討が行われた。LX-2 細胞において、TSP-1 処理により TGF- β 作用の増強が認められ、線維化関連遺伝子の発現は有意に増加した。以上より、TSP-1 が肝星細胞で TGF- β の作用を増強することにより、肝線維化を促進することが示された。

【考察】

本研究は、MASHを呈するA-PDK1KOマウスの脂肪組織で発現が増加し、MASHの改善を伴うA-PDK1/FoxO1KOマウスで正常化した分泌因子として細胞外マトリックスタンパク質であるTSP-1に着目した。TSP-1は、血小板、マクロファージ、脂肪細胞など、さまざまな種類の細胞から分泌され、血管新生、創傷治癒、炎症、組織のリモデリングなど、幅広い生理学的・病理学的プロセスへの関与が報告されているが、MAFLD/MASHの発症におけるTSP-1の役割は不明である。本研究において、TSP-1は肝星細胞のTGF- β 作用を増強することにより、脂肪組織インスリン抵抗性による肝線維化を媒介することが示されたとの結果は、マウスのNASHにおけるコリン欠損L-アミノ酸高脂肪食モデルにおいて、TSP-1欠損症が肝線維化を改善することを示す先行研究と一致する。

本研究では、全身性のTSP-1欠損が肝線維化を改善することを示したが、肝線維化を促進するTSP-1の細胞源の決定には至らなかった。TSP-1は脂肪組織において肝臓よりも高レベルで発現し、TSP-1発現はA-PDK1KOマウスの肝臓および線維化を伴う慢性肝疾患の患者でも発現が亢進することが報告されている。今後、A-PDK1KO背景に細胞型特異的なTSP-1欠損マウスを樹立することで、MASHの発症に寄与するTSP-1の発生源について検討する必要があると考えられる。

TSP-1の発現を調節する機序は、特に脂肪細胞において不明である。本研究により、TSP-1発現がPDK1-FoxO1軸を介したインスリンシグナル伝達によって制御されていることが明らかとなった。FoxO1は下流の転写因子であり、その活性はインスリンによって負に影響する。マウスTSP-1遺伝子のプロモーター領域にはFoxO1との結合部位を有するため、脂肪細胞におけるTSP-1発現はFoxO1によって直接制御される可能性がある。このように、PDK1-FoxO1軸を介したインスリンシグナル伝達は、脂肪細胞におけるTSP-1発現の治療標的となる可能性がある。

以上の結果より、TSP-1欠損により、マウス脂肪組織インスリン抵抗性に起因する肝線維化が改善することを示した。また、脂肪細胞におけるTSP-1の発現は、PDK1-FoxO1軸を介したインスリンシグナル伝達によって制御されることを明らかとした。したがって、我々の研究結果において、TSP-1は脂肪組織のインスリン抵抗性とMASHを結びつける重要なアディポカインと考えられ、MASH患者における肝線維症の治療標的の開発に資する可能性がある。

本研究は、脂肪細胞由来のMASHの制御因子としてTSP-1に着目し、TSP-1が脂肪組織においてPDK1-FoxO1軸を介したインスリンシグナル伝達によって制御されること、及びその欠損が肝線維化を改善することを示し、MASH患者における肝線維症の新たな治療標的となる可能性を見出した価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。