

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08314

研究課題名(和文)新規肝硬変治療薬の開発を目指した星細胞脱活性化の分子機序解析

研究課題名(英文) Targeting Cytoglobin gene regulation as a promising strategy for treatment of liver fibrosis

研究代表者

松原 三佐子(佐藤) (SATO-MATSUBARA, Misako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：00635120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：サイトグロビン(CYGB)は哺乳動物のグロビンファミリーに属し、肝臓では主に肝星細胞(HSC)に局在する。CYGBはガス結合能力に加えて、臓器の線維化および発癌に関連する。本研究によりFGF2がCYGBの発現誘導因子であり、FGF2のCYGB発現調節機構が明らかとなった。さらに、マウス線維化疾病モデルを用いた実験によりFGF2が抗線維化作用を有することが分かった。これらの結果から内在性CYGBの発現誘導が新規抗線維化治療法の開発に繋がること示された。

研究成果の概要(英文)：Cytoglobin (CYGB) belongs to the mammalian globin family and is primarily localized in fibroblastic cells of various organs, including hepatic stellate cells (HSCs). In addition to its gas-binding ability, CYGB may be relevant for organ fibrosis and cancer due to its anti-oxidative properties; however, the regulation of CYGB gene expression remains unknown. We report fibroblast growth factor 2 (FGF2) as a key factor for CYGB induction in human HSCs through JNK signaling. ChIP analyses revealed the augmented binding of phospho-c-JUN to its consensus motif in the CYGB promoter, upon FGF2 stimulation. Additionally, FGF2 induced a quiescence-like phenotype of HSCs partly via the ERK pathway. In bile duct-ligated mice, FGF2 administration ameliorated liver fibrosis and significantly reduced activated HSCs. In conclusion, FGF2 triggers CYGB gene expression and deactivation of myofibroblastic human HSCs, indicating its therapeutic potential for treating liver fibrosis.

研究分野：肝臓学

キーワード：Cytoglobin 肝線維化 肝星細胞 抗線維化治療法 FGF2

## 1. 研究開始当初の背景

近年、抗ウイルス薬の発展によりウイルス性肝炎の根治率が大幅に改善されているが、ウイルス排除後に肝硬変、肝がんが発症する場合は少なくない。肝硬変を治療する薬剤は未だなく、肝機能改善を促す対処療法のみである。また、肥満や糖尿病と関連する非アルコール性脂肪肝炎が増加しており、本邦で100万人に達する。とりわけ、大阪など都市部での増加が顕著である。病因を問わず慢性肝炎は肝線維化を誘発し、多くは緩徐に進行するが、自覚症状が出にくいいため肝硬変や肝がんを呈した末期状態で発見される。そのため、難治性肝臓病の早期発見に加えて病気の遅延もしくは線維化を生じた組織を正常状態まで回復させる新たな治療薬の開発が急務である。肝硬変では肝実質が活性化星細胞(HSC)や筋線維芽細胞などの非実質細胞で置換されI型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス物質が蓄積する。本研究室で発見されたCytoglobin (CYGB)は、肝臓ではHSCでのみ発現し、抗酸化作用を持ち、HSCの非活性化維持に重要なたんぱく質である。しかし、CYGBの発現制御機構は不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究で使用されるHHSteC細胞(ScienCell社)は正常肝臓から樹立されたヒト星細胞株であり、同社の培養液およびサプリメント中で静止期HSCとして機能を保持した状態( $\alpha$ SMA低発現)での培養が可能である。サプリメント添加なしではHHSteC細胞は、 $\alpha$ SMAを高発現させ、活性化HSCになる。申請者はこの形質の変化を指標とし、ヒト星細胞の非活性化を誘導する因子を同定する。また、抗線維化治療薬の開発を最終目標として、CYGB誘導因子の機能解析と化合物ライブラリーのスクリーニングを実施する(特許出願のため、本研究内容の一部は割愛した)ことを目的とした。

## 3. 研究の方法

細胞培養: ScienCell社より購入した初代HSC細胞株(HHSteC)とUniversity College London (UCL)より空輸便で送られる初代ヒトHSC細胞(primary hHSCs)は2%FBS/SteCMに付属のSupplement(S)を添加した培養液で培養した。

In vitro 実験: HHSteC細胞, primary hHSC細胞ともに $1 \times 10^5$ 細胞/mlをSteCMコンプライート培養液で播種し、翌日2%FBS/SteCM、Supplementなし(-)に置換した。リコンビナントヒトFGF2は濃度依存性実験を行った上で至適濃度として4 ng/mlで使用した。FGF2中和抗体は2  $\mu$ g/mlを1時間Sと反応させた後細胞に添加し、72時間後に細胞を回収した。シグナル分子に対する阻害剤実験はU1026 (MEK Inhibitor), Triciribine (AKT inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor)、翻訳および転写阻害実験はActinomycin D,  $\alpha$ -Amanitin, G418、それぞれ至適濃度を検討した後使用した。S(原液)は電気泳動し、ゲル抽出したたんぱく質をショットガンMS解析(LTQ-Orbitrap Velos)し、S中の物質同定を試みた。

ChIP解析: SimpleCHIP Enzymatic Chromatin IP kit( Cell Signaling Technology)を用いてCST社のプロトコールに従って行った。FGF2(4 ng/ml)でHHSteC細胞を6時間処理し37%ホルムアルデヒドで固定した後ChIP Bufferで細胞を回収した。クロマチン断片化確認後Inputコントロールとして同量各サンプル(2%相当)をChIP Bufferから採取し、残りをPhospho-c-JUN(Ser-73) XP rabbit抗体( Cell signaling Technology)と反応させクロマチン免疫沈降を行った。DNAの定量化にはQ-PCR法を用いてInputクロマチン量に対するIPクロマチン量の割合で算出した。

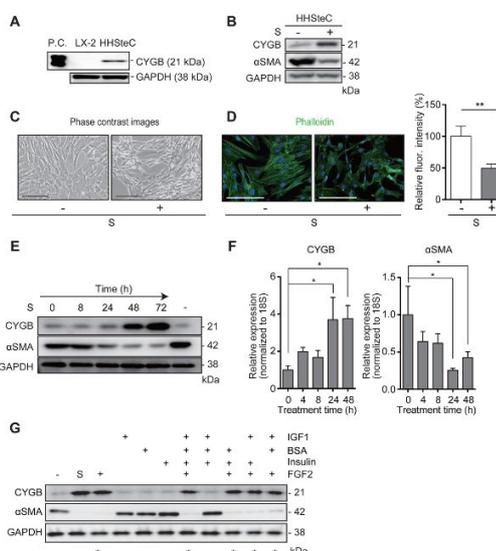
組織免疫染色とPhalloidin染色: 細胞は4%パラホルムアルデヒドで肯定し、Anti-human CYGB抗体(1:300, In house), anti-human  $\alpha$ SMA抗体(1:200, DAKO)で一晩反応した。

二次抗体には Alexa Flour 594-conjugated goat anti-rabbit と Alexa Flour 488 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:500, Thermo Fisher Scientific) を使用した。DAPI で核染色後封入し、BX-X710-AII - 印 One Fluorescence Microscope (Keyence) で検鏡した。

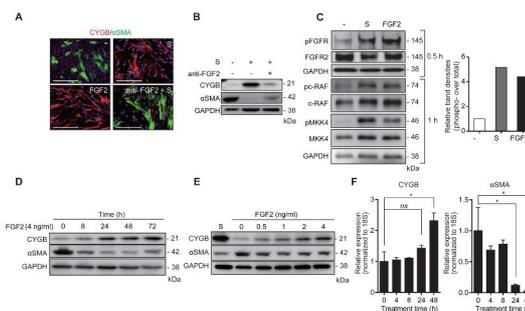
動物実験: C57BL/6J マウス (6 - 8 週齢、♂) 開腹後、胆管結紮を施行した。2 週間後リコンビナントマウス FGF2 (60 ug/kg, Body weight) を尾静脈投与週 2 回し 72 時間後にマウスの肝臓を観察、組織と血液を採取した。摘出した肝臓からたんぱく質、RNA を精製し、Western blot と Q-PCR を用いて FGF2 投与群と非投与群間で発現量を比較した。

#### 4 . 研究成果

まず、ヒト HSC 細胞株として汎用される LX-2 細胞と HHSteC 細胞の CYGB の発現量を比較したところ HHSteC 細胞でのみ CYGB のたんぱく質発現が確認された。また、HHSteC 細胞では S 添加後、CYGB の発現が増加することが分かった。さらに、S 添加した HHSteC 細胞では細胞形態変化に伴い、アクチン重合を示す Phalloidin 染色の減少が確認された。また、S は時間依存的に CYGB の発現を誘導し、同時に活性化 HSC のマーカーたんぱく質である  $\alpha$ SMA の発現を減弱することが分かった。そこで、S 中に CYGB の発現を誘導する因子があるのではないかと考え S 中の含有物質の同定を試みた。結果、IGF1, BSA, Insulin と FGF2、4 種類の物質が同定された。さらに、それらの組み合わせ実験を行い、HHSteC 細胞を処理したところ、FGF2 が S 同様、CYGB の発現を誘導し、 $\alpha$ SMA の発現を抑制することが分かった。

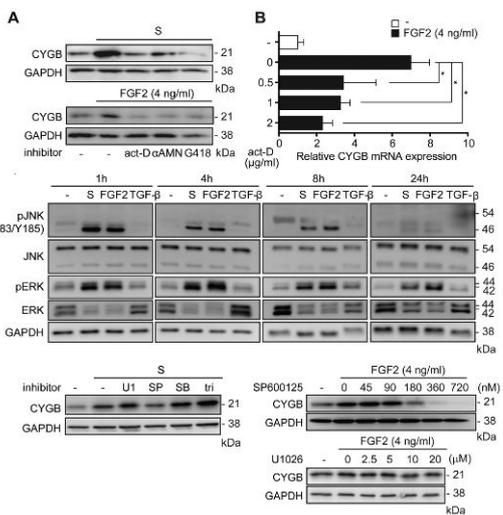


上述の確証実験として、FGF2 の中和抗体をあらかじめ S と 1 時間反応させ、その後、HHSteC 細胞に添加した。結果、S および FGF2 により誘導された CYGB の発現が FGF2 中和抗体前処理で阻害された。FGF2 は、S 同様、FGF 受容体のリン酸化を誘導し、下流の RAF および MKK4 のリン酸化を惹起した。また、FGF2 は時間・濃度依存的に CYGB のたんぱく質・mRNA 発現を誘導し、 $\alpha$ SMA のたんぱく質・mRNA 発現を抑制した。これらの結果から S の含有物である FGF2 が CYGB の発現誘導因子であることが示された。

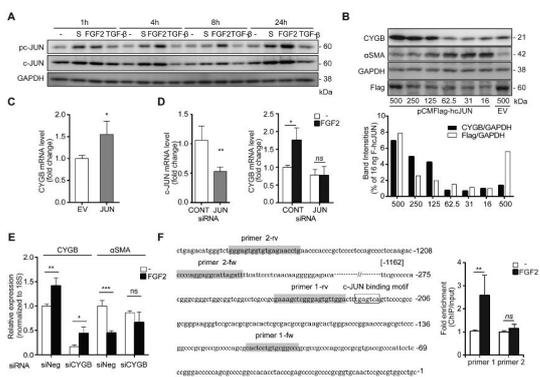


Actinomycin-D、 $\alpha$ -Amanitin と G418 による翻訳・転写阻害剤、いずれにおいても S、FGF2 とともに CYGB の発現誘導が制御された。また、Actinomycin-D は濃度依存的に CYGB の発現を抑制したことから、FGF2 は転写活性を介して CYGB の発現を誘導することが分かった。FGF2 の下流シグナル分子を調べるために、JNK 抗体と ERK 抗体を用いて Western blot を行ったところ、FGF2 処理後 1

時間で JNK、ERK ともにリン酸化が誘導されることが分かった。そこで U1026 (MEK Inhibitor), Triciribine (AKT inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor)を用いて HHStcC 細胞を処理したところ、SP SP600125 のみ CYGB の発現誘導を抑制し、さらに、SP600125 は濃度依存的に FGF2 処理による CYGB の発現誘導を消失した。

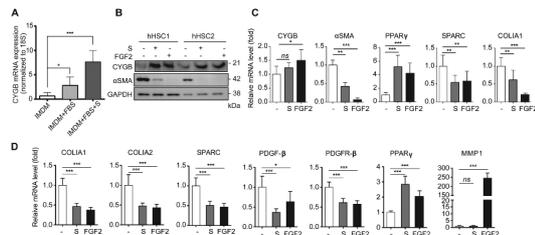


FGF2 は JNK の転写因子である c-JUN のリン酸化を惹起した。そこで、c-JUN に対する siRNA によるノックアウト法や過剰発現、さらに、ChIP 解析を行った結果、FGF2 は c-JUN が CYGB 遺伝子のプロモーター領域に存在する c-JUN - DNA 結合モチーフに結合し CYGB の発現調節を行っていることが明らかとなった。

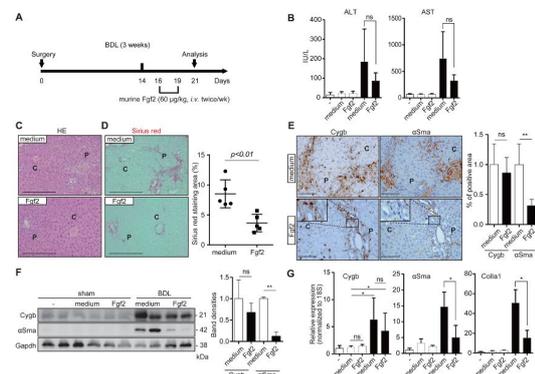


FGF2 による CYGB 発現誘導は UCL から入手した Primary hHSC 細胞でも誘導されることが確認された。そこで、CYGB の発現誘導の意義を調べるためにヒト HSC 細胞の静止

期・活性化に関連する遺伝子の発現パターンを調べた。FGF2 および S 処理は、活性化 HSC で低値である SPARC や COL1A1 の発現を抑制し、静止期で高値である CYGB、PPAR $\gamma$ 、MMP1 の発現を有意に促進した。これらの結果から FGF2 を含有する S 添加の培養条件下では HHStcC 細胞をより生体内の静止期 HSC 細胞に近い状態で保持していると考えられた。



FGF2 の抗線維化作用を調べるために、胆管結紮によるマウス肝線維化疾患モデルを作成し、リコンビナントマウス FGF2 投与による薬効を調べた。結果、FGF2 投与群は、コントロール群 (IMDM のみ) と比べ、ALT,AST 値が有意ではないが減少傾向にあり、HE による組織像、Sirius Red 染色による線維化の程度、どちらも軽減していた。免疫組織染色の結果、FGF2 投与群では CYGB 陽性細胞の数が保持されたまま、 $\alpha$ SMA 陽性細胞が有意に減少した。また、組織より抽出したたんぱく質および mRNA の結果から FGF2 投与群で  $\alpha$ SMA およびコラーゲンの発現が有意に抑制された。



本研究により FGF2 が CYGB の発現誘導因子として発見されその調節機構が明らかとなった。さらに、マウス線維化疾患モデルに

において FGF2 の抗線維化作用が示された。この研究成果は今後の新規抗線維化治療法の開発に繋がると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Sato-Matsubara M, Matsubara T, Daikoku A, Okina Y, Longato L, Rombouts K, Thuy Le TT, Adachi J, Tomonaga T, Ikeda K, Yoshizato K, Pinzani M, Kawada N. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) regulates cytoglobin expression and activation of human hepatic stellate cells via JNK signaling. *J Biol Chem.* Nov 17; 292(46): 18961–18972. (2017) 査読有
2. 松原三佐子、河田則文、サイトグロビンと肝疾患 医学のあゆみ：TPICS, Vol. 261 No. 8, 829-830. (2017) 査読無
3. Sato-Matsubara M, Kawada N. New player in tumor-stromal interaction: Granulin as a novel therapeutic target for pancreatic ductal adenocarcinoma liver metastasis. *Hepatology* Jan;65(1):374-376. (2017) 査読有
4. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Komori A, Toyoda H, Kumada T, Namisaki T, Yoshiji H, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwaru E, Itoh Y, Ide T, Tamori A, Matsubara M, Kawada N, Shirabe K, Tomita E, Honda M, Kaneko S, Nishina S, Suetsugu A, Hiasa Y, Watanabe H, Genda T, Sakaida I, Nishiguchi S, Takaguchi K, Tanaka E, Sugihara J, Shimada M, Kondo Y, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology.* 152(6):1383-1394. (2017) 査読有
5. 松原三佐子、河田則文、肝線維化進展の分子機構、特集 / 肝硬変を理解する—分子機構から実臨床に至るまで—、肝胆膵73号6号 2016年12月号 586-592. (2016) 査読無

6. Adachi J, Hashiguchi K, Nagano M, Sato M, Sato A, Fukamizu K, Ishihama Y, Tominaga T. Improved Proteome and Phosphoproteome Analysis on a Cation Exchanger by a Combined Acid and Salt Gradient. *Anal Chem.* 2016 88(16):7899-903. (2016) 査読有

7. 松原三佐子、河田則文、肝疾患とサイトグロビン 肝細胞研究会：研究交流、2015.7.29, 36. (2015) 査読無

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 松原 三佐子、翁 良徳、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文、第 31 回 肝類洞壁細胞研究会学術集会 肝星細胞における TGFβ1・Smad シグナルを介した Cytoglobin 発現制御機構 (2017.11.24-25)
2. 松原 三佐子、榎屋 正浩、河田 則文、吉里 勝利、第 24 回 肝細胞研究会 旭川市民文化会館 造血細胞由来の活性化肝星細胞におけるサイトグロビンの発現 (2017.6.30-7.1)
3. 松原 三佐子、河田 則文、第 53 回日本肝臓学会総会(広島) 肝星細胞を標的とした抗線維化治療薬の開発 (2017.6.8-9)
4. 松原 三佐子、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文、第 30 回 肝類洞細胞研究会学術集会 富山国際会議場 ヒト肝星細胞における FGF2 の Cytoglobin 遺伝子発現制御 (2016.11.25-26)
5. 松原 三佐子、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文、第 23 回 肝細胞研究会、大阪大学中之島センター、FGF2 は Cytoglobin と αSMA 遺伝子発現を制御し肝星細胞の脱活性化を促進する (2016.7.8)
6. 松原 三佐子、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文、肝免疫フォーラム、東京 芝パークホテ

ル、平成 28 年 2 月 13 日 一般講演 「ヒト星細胞におけるサイトグロビン遺伝子発現調節機構の分子機序解析」(2016.2.13)

7. 松原 三佐子、河田 則文、第 41 回日本肝臓学会西部会、名古屋国際学会、一般演題口演 「肝硬変 5(その他)」ヒト肝星細胞におけるサイトグロビン遺伝子発現調節機構の分子機序解析(2015.12.3-4)
8. Sato-Matsubara M, Matsubara T, Daikoku A, Rombouts K, Ikeda K, Yoshizato K, Pinzani M, Kawada N. AASLD 2015, poster session, Session Title: Gene Expression and Therapy, Nov. 14<sup>th</sup>, Identification of FGF2 as a cytoglobin regulatory factor leading to the deactivation of human hepatic stellate cells (517), San Francisco (2015.11.13-17)
9. Sato-Matsubara M, Matsubara T, Daikoku A, Rombouts K, Ikeda K, Yoshizato K, Pinzani M, Kawada N. ISHSR 2015, 18th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, poster session, FGF2 deactivates human hepatic stellate cells following induction of cytoglobin and down-regulation of  $\alpha$ SMA expressions, Asilomar, California (2015.11.11-13)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

1. 名称：抗線維化剤  
発明者：河田 則文、池田 一雄、松原 勤、松原 三佐子  
権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：2017-241997

出願年月日：2017 年 12 月 18 日

国内外の別：国内

2. 名称：肝星細胞におけるサイトグロビン誘導物質

発明者：河田 則文、松原 三佐子

権利者：大阪市立大学

種類：特許

番号：2015-077604

出願年月日：2015 年 4 月 6 日国内外の

別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/liver/office/information.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 三佐子 (MATSUBARA, Misako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：00635120

(2) 研究分担者

松原 勤 (MATSUBARA, Tsutomu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20628698

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )