

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14997

研究課題名(和文)肝星細胞における物質輸送系の解明を通じた肝障害の軽減のための基礎検討

研究課題名(英文) Mitigation of the liver injury based on the regulation of membrane transport in hepatic stellate cells

研究代表者

前田 和哉 (Maeda, Kazuya)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・講師

研究者番号：00345258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝障害時に肝星細胞の活性化抑制を図り、肝線維化を軽減する新規方法論として、肝星細胞に発現する膜輸送体を標的とした戦略について基礎検討を実施した。遺伝子発現データベースの情報に基づき、複数の条件で同一方向の変動を示すトランスポーターAに着目し検討した。Aの輸送阻害薬をLX-2細胞に添加後、TGF- $\beta$ 依存的なCOL1A1、 $\alpha$ -SMAの発現上昇を確認したところ、阻害薬濃度依存的に発現抑制が観察された。さらに、AのsiRNAを複数調製し、ノックダウンしたところ、概ね上記と同様の発現抑制が確認された。これらよりトランスポーターAの発現が肝星細胞の活性化促進に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This research intended to clarify whether membrane transporters expressed on the hepatic stellate cells (HSCs) can be a novel target for the suppression of the activation status of HSCs in liver injury, which leads to the amelioration of hepatic fibrosis. Based on the gene expression databases, we focused on transporter A, whose expression was similarly changed under multiple conditions. When inhibitors of the transport function of A were added to the LX-2 cells (immortalized HSCs), TGF- $\beta$ -dependent increased expression of COL1A1 and  $\alpha$ -SMA was suppressed in an inhibitor concentration-dependent manner. Moreover, multiple siRNAs for gene A were introduced to LX-2 cells, the similar results were obtained. From these results, it was suggested that expression of transporter A in HSCs may contribute to the progression of the activation of HSCs.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：肝星細胞 トランスポーター OATP2A1 肝線維化

### 1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は、肝非実質細胞の一種であり、平常時は、肝細胞の間で静止状態を保っているが、肝障害時になると、肝実質細胞などから放出される種々のサイトカインや活性酸素種の放出を受けて活性化状態となり、細胞形態が筋芽細胞様に変化する。その折に、活性化星細胞は、肝障害部位に大量のコラーゲンを産生する事により肝線維化を引き起こし、肝障害の病態悪化につながると考えられている。従って、過剰な活性化星細胞の鎮静化は、肝障害の悪化の抑制につながる事が想定されている。これまでに、試験管レベルにおいては、活性化肝星細胞の細胞死を誘導したり、静止状態に戻したりする化合物が複数見つかったり、使用濃度が比較的高く *in vivo* での適用が難しかったり、シグナル伝達阻害剤のような機序だと、*in vivo* では様々な副作用を引き起こしてしまい、創薬に繋がらないという問題を抱えており、現時点では、肝線維化治療薬として承認されている医薬品は存在しない。それ故、肝星細胞の鎮静化に寄与する新たな分子ターゲットの同定は、新たな肝線維化治療薬の創出のために重要と考えられる。

一方、本研究で主題とする膜輸送体と肝星細胞の活性化制御との接点については、現状数は少ないが、例えば、Multidrug resistance-associated protein (Mrp)1 の阻害剤を活性化星細胞に添加したところ、細胞死が誘導されたとの報告もあり、Mrp1 によって排出される何らかの内因性基質の蓄積が星細胞にとって毒性を引き起こす可能性が考えうる (Hannivoort RA et al., *Hepatology*, 48, 624-34 (2008))。このような事象より、肝細胞には毒性を引き起こさず、活性化星細胞だけを選択的に細胞死へと誘導する一つの手段として、活性化星細胞に高発現するトランスポーター群を用いて、活性化時に制御されるべき内因性物質の細胞内外の移動を阻害する戦略が考えうる。しかし、これまで活性化星細胞におけるトランスポーター群の発現プロファイルや物質輸送に関する研究はほとんど執り行われていない。そこで本研究では、細胞内環境のホメオスタシスを維持するために必要と考えられる物質輸送系を制御することにより、肝星細胞の活性化状態を変化させ得る標的分子を探索することとした。

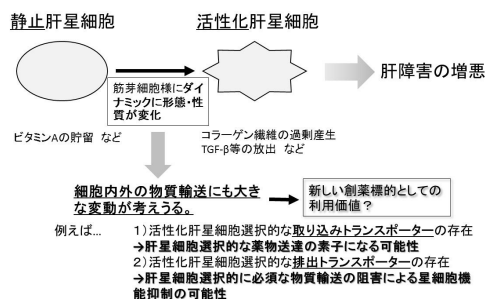


図 1 : 本研究の考え方

### 2. 研究の目的

本研究では、肝障害時に活性化肝星細胞を細胞死もしくは活性化状態から静止状態への鎮静化を図ることにより、肝線維化を抑制し、肝障害の進行を軽減する新規手段を構築することにある。その戦略の一つとして本研究では、活性化星細胞に発現する輸送系のうち、静止状態から活性化状態に変化する際に発現が増減するようなトランスポーターを第一の標的として、内因性基質の移動を阻止することにより肝星細胞の状態を制御しうるかについて実証するための基礎検討を実施する。そのため、肝星細胞の静止状態と活性化状態の間で発現が大きく変動するトランスポーター群の発現プロファイルの探索を行うと共に、それらの機能を阻害したときに活性化星細胞の生存や活性化状態・機能に影響が出るかについて検討を実施する。それにより、活性化星細胞選択的な細胞死もしくは静止状態への鎮静化を引き起こす戦略を考案することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 肝星細胞が活性化した際に発現レベルが上昇するトランスポーター群の同定

既報 (De minics S et al., *Gastroenterol*, 132, 1937-46, 2007) において、*in vitro* 実験でプラスチックプレートに静止期の星細胞を播種した後の活性化状態における遺伝子発現、および四塩化炭素投与および胆管結紮による肝障害誘起モデルマウスより単離した活性化肝星細胞における遺伝子発現を静止期の星細胞と比較した遺伝子発現データが報告されている。このデータを利用して、膜輸送体の発現量がすべての条件で変動している蛋白を検索した。さらに、ヒト肝由来の培養細胞である HepG2 と活性化星細胞における遺伝子発現を比較した既報 (Hetherington AM et al., *Data Brief*. 10: 385-389 (2017)) の遺伝子発現データも併せて検索し、肝細胞由来細胞と比較して活性化肝星細胞に比較的選択的な遺伝子発現を示す膜輸送体を検索した。

(2) LX-2 細胞を用いた TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現を観察するタイムコースの最適化

ヒト肝星細胞由来不死化細胞であり肝星細胞研究で汎用されている細胞株である LX-2 細胞を用いて、TGF- $\beta$  を添加した際に、肝星細胞の活性化の指標となる  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) および collagen type 1 alpha 1 (COL1A1) の mRNA およびタンパクレベルの発現について定量的 PCR および Western blot 法を用いて経時的に観察し、TGF- $\beta$  の添加・非添加の間で最も大きな差が見られる添加後の時間を決定した。

(3) 標的とする膜輸送体 A に対する阻害薬を添加した際の LX-2 細胞における TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現に関する検討

(1) の検討結果より両方の検索にヒットし、かつ比較的倍率の大きな SLC トランスポーターの一つである A を標的として、その阻害定数が既知の阻害薬 X を添加した条件下において、LX-2 細胞における TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現がどのように変動するかについて検討を実施した。X の濃度依存的な遺伝子発現への影響を観察すると共に、A に対する阻害率が異なる別の複数の阻害薬を用いた時の影響についても同時に観察した。

(4) 膜輸送体 A に対する siRNA をトランスフェクションした際の LX-2 細胞における TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現に関する検討

膜輸送体 A に対して 3 種の異なる siRNA を作製し、LX-2 細胞にトランスフェクションすることで、A の発現量が低下した条件下における TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の発現変動について検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 肝星細胞が活性化した際に発現レベルが上昇するトランスポーター群の同定

既報の遺伝子発現データを検索することにより、マウス肝星細胞がいかなる条件においても活性化した際に有意に発現が上昇する SLC トランスポーターについて調べたところ、少なくとも 5 種のトランスポーターが探索され、大きいものでは 10 倍以上の遺伝子発現の活性化状態依存的な上昇が観察されていた。一方、HepG2 (肝細胞由来) 細胞と活性化肝星細胞の間の遺伝子発現比較を実施した結果を SLC トランスポーターに着目して、肝星細胞の方で高い発現を示す遺伝子を探索したところ、少なくとも 2 種のトランスポーターが前者のデータにおいて発現上昇が見られている遺伝子と合致する膜輸送体が同定された。これら膜輸送体は、肝細胞と比較して、肝星細胞に高発現しており、かつ活性化状態において大きな発現上昇を示すことから、これらの機能を阻害することができれば、肝星細胞の活性化状態に比較的选择的に影響を与えることができると推察した。

(2) LX-2 細胞を用いた TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現を観察するタイムコースの最適化

LX-2 細胞において、TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子およびタンパク質レベルの上昇を観察するにあたって、TGF- $\beta$  を LX-2 細胞に添加後何時間において差が見やすいかについて、経時的なサンプリングにより定量を行った結果、mRNA およびタンパク質の両方において、COL1A1 は TGF- $\beta$  添加後 24 時

間後が最も発現量の差が大きい一方で、 $\alpha$ -SMA については、TGF- $\beta$  添加後 48 時間後が最も発現量の差が大きいことを見出した。従って、以後の in vitro 実験においては、この時点における発現量を比較することとした。

(3) 標的とする膜輸送体 A に対する阻害薬を添加した際の LX-2 細胞における TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現に関する検討

(1) の検討の結果、肝星細胞に発現が多く、かつ活性化状態において発現量が大きく増加する膜輸送体 A を標的として選択し、以後の検討を進めることとした。A の比較的強力な阻害剤であることがわかっている阻害薬 X を既報の阻害定数と比較して大過剰濃度で LX-2 細胞に添加した条件下で TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の mRNA、蛋白発現を確認したところ、TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA、COL1A1 の発現上昇が阻害薬 X の共存により有意に低下することを見出した (図 2, 3)。さらに、X の濃度依存性を観察したところ、明確な依存性が観察され、発現上昇の程度と、阻害定数より推察される X の A に対する阻害率の間には、良好な関係性が見出された。さらに、A の阻害強度が異なる別の複数の阻害薬をそれぞれ添加して検討したところ、阻害率と概ね相関する形で TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA、COL1A1 の発現上昇が観察された。これらのデータは、膜輸送体 A の輸送機能の阻害が肝星細胞の活性化抑制に繋がることを示唆するものであると考えることができる。

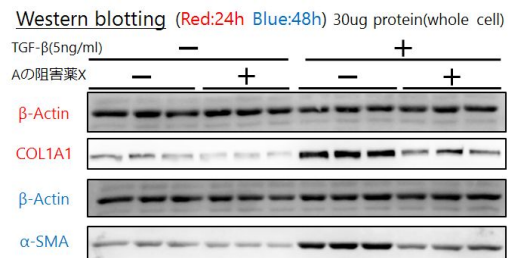


図 2 : TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の蛋白発現の上昇に与える A の阻害薬 X の影響

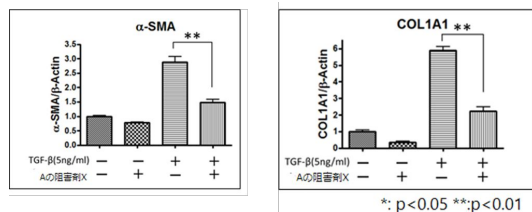


図 3 : TGF- $\beta$  依存的な  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の蛋白発現の上昇に与える A の阻害薬 X の影響 (上記データのバンド濃度の定量化データ)

(4) 膜輸送体 A に対する siRNA をトランスフェクションした際の LX-2 細胞における TGF- $\beta$  依存性  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の遺伝子発現に関する検討

膜輸送体 A に対して、siRNA を 3 種類別の箇所について合成し、LX-2 細胞に導入後、TGF- $\beta$  依存性  $\alpha$ -SMA および COL1A1 の mRNA、蛋白発現を観察した。その結果、いずれの siRNA も A の mRNA 発現を有意に低下させることが確認された。一方で、COL1A1 については、3 種類全ての siRNA において、A の mRNA 発現の低下割合の順位と合致する形で COL1A1 の発現低下が観察されたのに対して、 $\alpha$ -SMA については、2 種類の siRNA では有意な発現低下が見られたのに対して、1 種類の siRNA では、発現上昇が観察された。この結果については、おそらく後者の siRNA の off-target に対する遺伝子発現抑制効果が影響した可能性があると考えており、以上の検討から (3) の結果も併せて考えると、膜輸送体 A の機能・発現を阻害することにより肝星細胞の活性化を抑制可能であることが示唆される結果を得ることができたと考えている。

以上、(1) ~ (4) の検討を通じて、SLC トランスポーター群に属する膜輸送体 A の輸送機能を制御することによって、肝星細胞の活性化状態を変動させることができる可能性が示唆された。今後、膜輸送体 A のノックアウト動物を用いた肝障害モデルにおける肝線維化の進行割合について調べると共に、膜輸送体 A が輸送している標的基質の探索およびその効率的な制御法についてさらなる検討を進めていく予定である。これらの検討を通じて、これまで開発がされてこなかった新規機序の抗線維化治療薬の新たな標的を提案すると共に、候補化合物の選択に至ることを最終目標としたいと考えている。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

・末國篤人、前田和哉、楠原洋之、Suppression of the TGF-beta-induced activation of LX-2 cells, an immortalized hepatic stellate cell line, by sulfobromophthalein (BSP)、第 17 回東京大学生命科学シンポジウム、2017 年 4 月 15 日、東京大学安田講堂 (東京都文京区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 和哉 (MAEDA, Kazuya)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号 : 0 0 3 4 5 2 5 8