

令和元年6月17日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19362

研究課題名(和文)胆汁酸の機能解析を基軸とした肝線維化抑制に関連する新規標的因子の探求

研究課題名(英文) Explore of new target factor which related with suppression of liver fibrosis, based on functional analysis of bile acids.

研究代表者

寺西 優雅 (Teranishi, Yuga)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：70733947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁酸の肝細胞への作用はよく知られているが、肝星細胞(HSC)を含めた非実質細胞への影響についてはあまり知られていない。我々は胆汁酸の1種であるリトコール酸(LCA)をヒト初代培養肝星細胞(HHStec)に添加するとHHStecの形態変化とHSCの活性化抑制を示す遺伝子変化を認めることを発見した。HHStecへの既知の胆汁酸受容体作動薬添加ではLCA添加時と同じ遺伝子変化を起こさず、b-RafやMAPKファミリーのリン酸化を認めたことから、LCAがHSCに影響を及ぼす新たな分子機序の一部が判明したと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆汁酸は肝疾患の病態と深い関わりがあり、特にウルソデオキシコール酸やオベチコール酸などの胆汁酸は原発性胆汁性胆管炎や非アルコール性脂肪肝炎の治療薬としても使用されている。胆汁酸の肝細胞への肝底護作用はよく知られているが、肝星細胞への影響は明らかになっていないため、本研究のようにリトコール酸が肝星細胞の活性化抑制をもたらす遺伝子変化の分子機序を明らかにすることで、今後、肝線維化や肝発癌に対する創薬などにつながっていくものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Bile acids are well known to influence on hepatocyte, but not non parenchymal cell, including hepatic stellate cell (HSC). We found that the lithocholic acid (LCA) induces morphological changes of Human Hepatic Stellate Cell (HHStec) and alter the gene expression profile. Interestingly, agonists of the bile acid-related receptors, known to be activated by LCA, did not show the alteration. LCA enhanced phosphorylation of b-Raf and MAPK family. This study uncovered a novel signal pathway activated by LCA in the HSC.

研究分野：肝疾患全般

キーワード：胆汁酸 リトコール酸 肝星細胞 肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

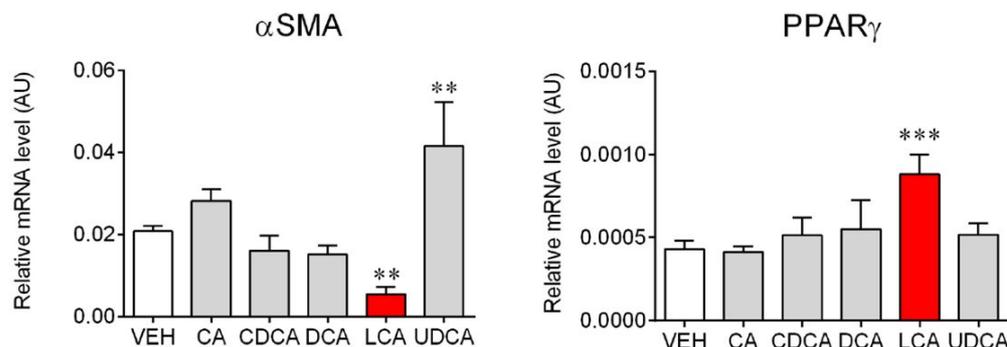
### 1. 研究開始当初の背景

肝硬変は肝実質が活性化星細胞や筋線維芽細胞などに置換されて型コラーゲンを主とする細胞外基質が蓄積した慢性的肝線維化であり、肝細胞癌、静脈瘤、肝不全など生命予後を左右する疾患の原因となる。

当研究グループはこれまで HSC 活性化抑制に Cytoglobin (CYGB) が寄与すること (Cui W, Teranishi Y, et al. BBRC 2012) や CYGB 欠損が肝発癌に関連することを報告した (Thuy le TT, Kawada N, et al. Am J Pathol. 2015)。また CYGB が酸素センサーとして働くことで肝細胞での薬物代謝に関与することを示した (Teranishi Y, et al. Lab Invest. 2015)。CYGB が肝臓では HSC のみに発現することからこの結果は HSC が肝細胞など他の細胞の機能に影響することを示唆している。

ウルソデオキシコール酸 (Ursodeoxycholic acid: UDCA) は本邦では原発性胆汁性肝硬変 (Primary biliary cirrhosis: PBC) の第 1 選択薬である。また近年ではケノデオキシコール酸 (Chenodeoxycholic acid: CDCA) の異性体である Obeticholic acid (OCA) が PBC や NASH に対する新規治療薬として注目を浴びている (Neuschwander-Tetri BA, et al. Lancet 2015)。このように UDCA と OCA は肝庇護作用があり肝細胞に作用することはよく知られているが、HSC を含めた非実質細胞への影響についてはあまり知られていない。臨床試験では抗線維化作用の報告もあるが (Ratziu V, et al. J Hepatol. 2011, Mudaliar S, et al. Gastroenterology 2013)、その分子メカニズムについては不明な点が多い。

我々は胆汁酸が HSC 活性化を抑制するという仮説をたてた。主要胆汁酸 5 種 (Cholic acid (CA), CDCA, Deoxycholic acid (DCA), LCA, UDCA) をヒト初代培養肝星細胞 (Human Hepatic Stellate Cells: HHSteC) に添加したところ、LCA が HSC 活性化で上昇する  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) mRNA 発現を有意に低下させ、HSC 活性化で低下する peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) mRNA 発現を有意に上昇させることを見出した。また LCA を添加した HSC では細胞の形態変化を認めた。これらの結果は LCA が HSC の活性化を抑制することを示唆している。



以上より LCA の HSC 活性化抑制メカニズムを解析することは、線維化抑制の新規標的因子の発見につながり、将来的には肝硬変の新規治療薬開発に貢献できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

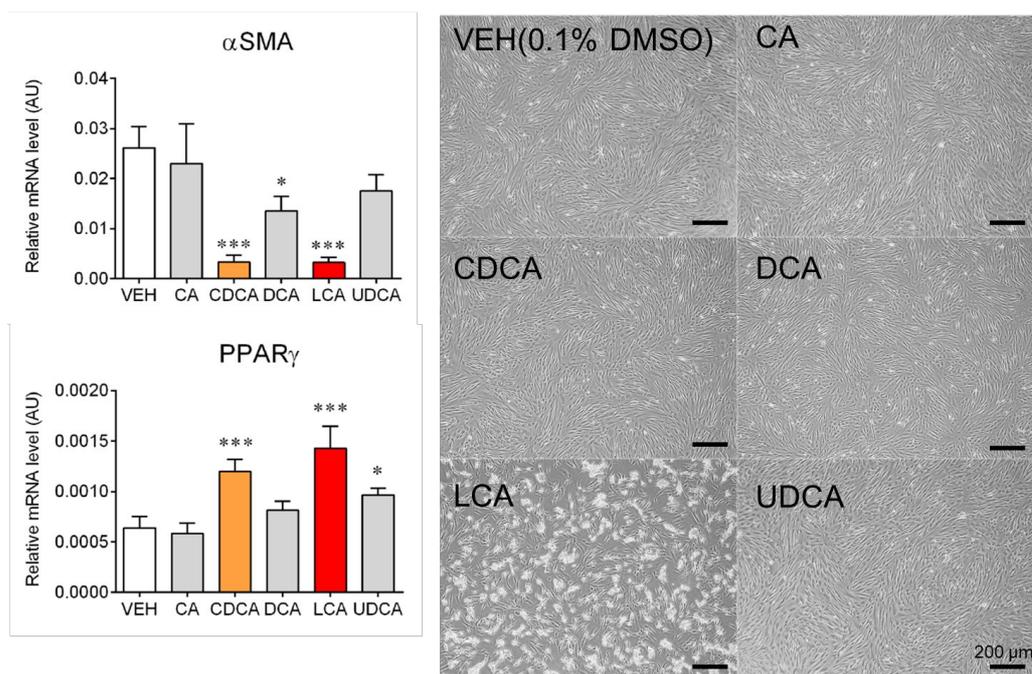
肝星細胞(Hepatic stellatmastere cell: HSC)の活性化は肝線維化と密接な関係にあり、抗線維化治療のターゲットとして注目されている。胆汁酸は腸肝循環しており恒常性維持に寄与しているが、HSC への影響に関して未知である。我々は胆汁酸の1種である Lithocholic acid (LCA)をヒト初代培養肝星細胞(HHSteC)に添加すると HSC 活性化が抑制されることを発見した。本申請課題は LCA が HSC 活性化を抑制する分子メカニズムを明らかにし、肝線維化抑制の新規標的遺伝子を同定することで、将来的には肝硬変の新規治療薬開発に貢献することを目標としたものである。

## 2. 研究の方法

- (1) 事前研究と異なるロットの HHSteC に CA, CDCA, UDCA, DCA を添加し、48 時間培養後の遺伝子発現変化を定量的 PCR で解析した。
- (2) LCA はビタミン D 受容体(VDR)と強い親和性があり活性化することが知られているので、HHSteC に 1.25-(OH)<sub>2</sub> ビタミン D (VitD 100 nM) を添加、48 時間培養後の遺伝子発現変化を定量的 PCR で解析し、LCA の遺伝子変化と比較した。
- (3) HHSteC に VDR, FXR, TGR5, PXR のアゴニストである 1.25-(OH)<sub>2</sub> ビタミン D, FXR 作動薬 (Obeticholic acid, GW4064), タウロリトコール酸, リファンピシンを添加し、HHSteC の  $\alpha$ SMA 遺伝子発現を定量的 PCR で確認した。
- (4) HHSteC で LCA 添加時に  $\alpha$ -SMA の遺伝子発現が減弱する分子機序を解析するために、HHSteC に LCA 100 $\mu$ M を添加し、5, 20, 60 分培養後のシグナル伝達に関わる蛋白リン酸化に関して Western blotting で確認した。

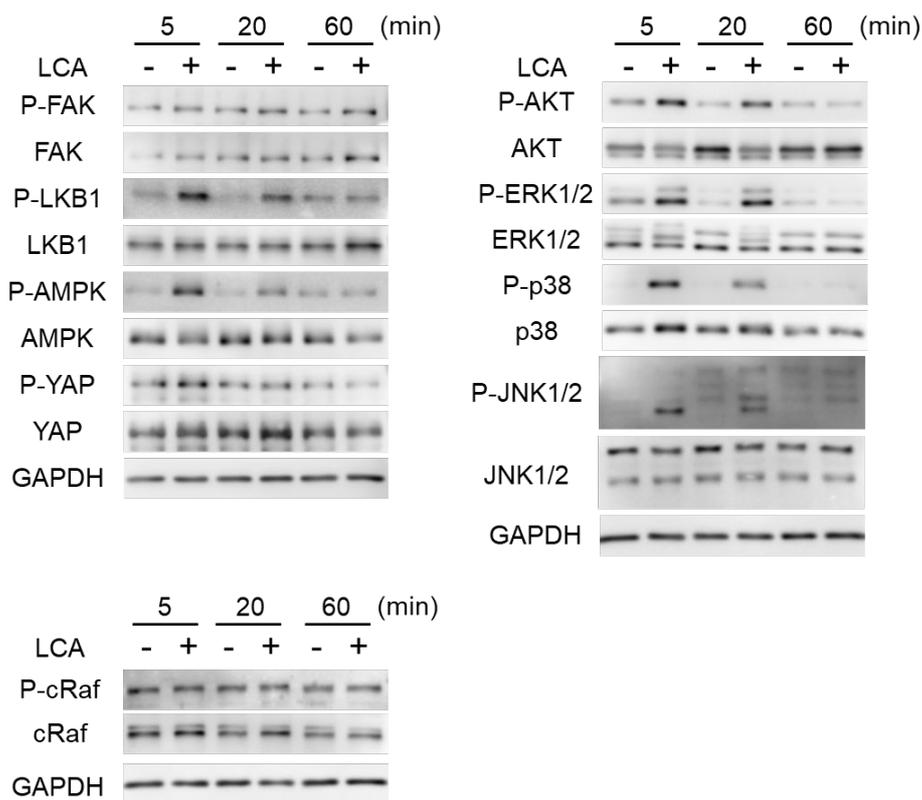
## 3. 研究成果

- (1) 事前研究では LCA のみに用量依存的  $\alpha$ -SMA 発現減弱と PPAR $\gamma$  発現増強を観察したが、CDCA でも同様の变化を示した。HHSteC はリトコール酸(LCA)添加のみでスフェロイド様の形態変化を示した。



- (2) VitD は HHSteC の  $\alpha$ SMA 発現を減弱させたが、PPAR $\gamma$  発現は増強させなかった。また VitD は VDR の標的遺伝子 CYP24A1 発現を増強させたが、LCA は CYP24A1 発現を変化させなかった。以上より LCA の遺伝子発現変動は VDR 以外の因子を介して作用していると推定された。

- (3) 1.25-(OH)<sub>2</sub> ビタミン D, GW4064, タウロリトコール酸, リファンピシンのいずれにおいても LCA 添加時と同様の変化を認めるものがなく、LCA 添加時にもこれらの受容体のターゲット遺伝子の発現変化が明らかではなかった。  
このことから、LCA 添加時に HHSteC の -SMA 遺伝子発現が減弱するメカニズムには新たな経路が関与していることが示唆された。
- (4) LKB-1, AMPK, AKT 及び MAPK ファミリーに属する ERK1/2, JNK1/2, p38 は 5, 20 分でリン酸化を認めた。しかしながら cRaf, FAK, YAP はいずれの時間帯でも変化を認めなかった。ただし、bRaf のリン酸化、特に抗がん剤の耐性に寄与すると考えられているスプライシングバリエーション体のリン酸化活性が上昇していた。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Odagiri N, Matsubara T, Higuchi M, Takada S, Urushima H, Sato-Matsubara M, Teranishi Y, Yoshizato K, Kawada N, Ikeda K.  
Involvement of ERK1/2 activation in the gene expression of senescence-associated secretory factors in human hepatic stellate cells.  
Mol Cell Biochem. 2019 May;455(1-2):7-19. 査読あり  
DOI: 10.1007/s11010-018-3466-x.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：松原 勤

ローマ字氏名：(MATSUBARA, tsutomu)

研究協力者氏名：河田 則文

ローマ字氏名：(KAWADA, norifumi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。