

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10713

研究課題名(和文) 星細胞活性化分子を軸とした新規膵疾患治療標的分子の確立

研究課題名(英文) Establishment of novel target molecules for pancreatic diseases by regulating stellate cell activation

研究代表者

雷 小峰 (LEI, XIAOFENG)

昭和大学・医学部・普通研究生

研究者番号：00595069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性膵炎発症におけるHic-5の機能に着目し解析を行った。まず正常膵臓組織と比較し膵炎組織ではHic-5の発現が増加した。さらにHic-5は膵臓間質にあるPSCに発現していることは判明した。Hic-5欠損マウスでは慢性膵炎の進行が抑制されることが明らかとなった。さらにHic-5欠損によりPSCの活性化を著明に抑制できた。そのメカニズムとして、Hic-5がTGF- β の経路を活性化することによりPSCの活性化と膵臓線維化を誘導していることがわかった。以上の結果より、Hic-5は新たなPSC活性化マーカーであり、慢性膵炎の新規治療ターゲットとなり得る分子と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膵実質細胞そのものを治療標的としている現在の治療概念と異なり、間質に存在する星細胞に着目する点に特色がある。またPSCの組織線維化や治療抵抗性への寄与からもその重要性は明らかである。また疾患の発症機構を細胞外環境応答因子という側面から解析する点は学術的意義が多いと思う。これまでに、心血管領域の疾患を中心に解析を行ってきたが、さらにHic-5が様々な他の疾患発症に関与する。また将来的な創薬ターゲットとして、癌、線維症、血管疾患などの生活習慣に起因する複数の疾患を同時に標的にできる治療ターゲット分子となる可能性を含むことから革新性が期待される。その発見が社会的意義やインパクトは大きい。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate whether Hic-5 activates pancreatic stellate cells (PSCs) and thereby promotes development of pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis (CP). We used immunofluorescence and immunohistochemistry to analyze expression levels of Hic-5 in human and mouse pancreatic tissue. Hic-5 expression was strongly upregulated in activated PSCs cultured from human pancreatic tissue and mouse pancreatic fibrosis taken from wild-type mice with cerulein-induced CP. In Hic-5 knockout mice, pancreatic fibrosis and PSC activation were significantly attenuated. In the activated PSCs of Hic-5 knockout mice, the TGF- β /Smad2 signaling pathway was significantly inhibited, resulting in reduced collagen production and reduced α -smooth muscle actin expression. Together, these results show that Hic-5 is a potential marker of activated PSCs and therapeutic target for the treatment of CP.

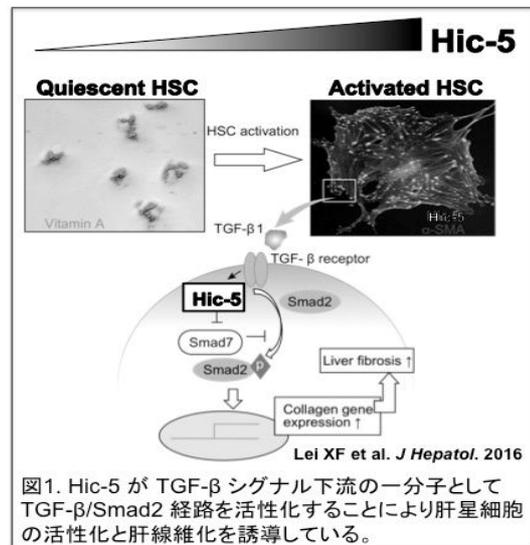
研究分野：膵臓

キーワード：膵臓線維化 膵臓星細胞 Hic-5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎、膵癌等の膵疾患は原因や進展機序について不明な部分が多い上、根本的な治療法のない難治性膵疾患である。これまでの疫学研究や遺伝性膵炎の臨床経過、基礎検討などから膵線維化は慢性膵炎、膵癌のリスクファクターであることや、膵星細胞 (PSC) が慢性膵炎等における膵線維化において中心的役割を担っていることが明らかにされている。PSC は正常膵組織の間質においてビタミン A を含む脂肪滴を有する静止細胞として存在するが、膵障害により産生された炎症性サイトカイン、酸化ストレスや TGF- β 1 等の因子の刺激で筋線維芽細胞様の活性化 PSC になり、慢性膵炎の進行や膵癌の悪性度を高める方向に促す。近年、国内外で PSC の活性化を抑えることで膵炎を抑制し膵癌治療効果を増強できるという研究成果が次々に報告されている。故に PSC の活性化および活性化 PSC の機能を抑制することは、膵疾患の予防、治療につながる戦略の一つとなる。申請者は、肝線維化発症時にその中心的役割を担う肝星細胞活性化制御分子として Hydrogen Peroxide-inducible Clone 5 (Hic-5, 別名 TGF- β 1i1) を同定した (Lei XF et al. *J Hepatol.* 2016 図 1)。さらに近年、Hic-5 の膵線維化発症への関与を見出したことから、本研究では慢性膵炎や膵癌発症における Hic-5 の機能に着目し解析を行う。



2. 研究の目的

Hic-5 が新規膵疾患治療ターゲットとなり得る分子であるか最終判断することを目指すと共に、治療ターゲットとして新規分子を提唱し、本疾患予防・治療法の実現に向けて分子基盤の構築を行うことを目的とする。

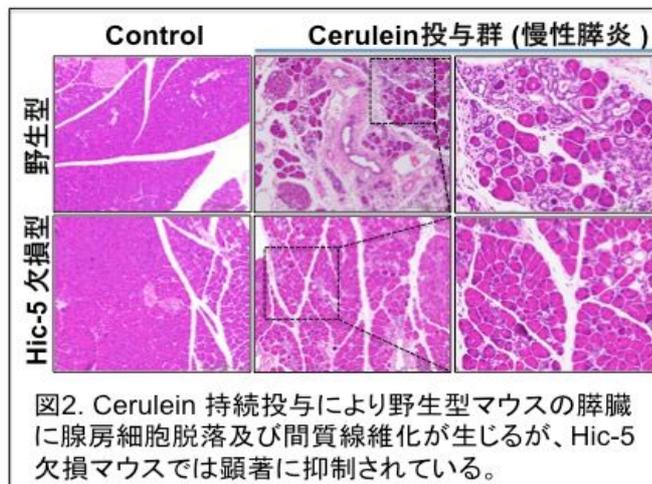
3. 研究の方法

本研究ではまずヒト慢性膵炎組織及びマウス慢性膵炎モデルで、Hic-5 の発現を確認し、さらに組織学解析ではその発現細胞は活性化膵星細胞か確定する。Hic-5 欠損により抑制された慢性膵炎の進行度を評価する。並行して Hic-5 欠損膵癌モデルマウスの作成と表現型解析を行う。マウスの表現型変化をマウス個体レベルおよび組織学的解析を中心にした解析を行い、またそのメカニズムに関してマウス、ヒトより分離した初代培養膵星細胞を用いて、細胞生物学的、分子生物学的解析を行う。解析に必要な手法はすでにこれまでの研究でほぼ確立しており、期待成果の実現性は高いと考える。

4. 研究成果

1) ヒト慢性膵炎及び慢性膵炎マウスモデルにおける Hic-5 の発現。

Hic-5 と膵疾患関連の報告はなされてないが、プロテオミクス解析後の大量データベースを用いて検索したところ、Hic-5 の発現が正常膵臓と比較して慢性膵炎で 2 倍近く、膵癌で 4.77 倍に増加していることが明らかとなった。ヒト慢性膵炎、膵癌組織の Hic-5 免疫染色結果においても、Hic-5 は正常組織と比較し間質に著しく発現上昇していることが明らかとなっている。さらに、二重蛍光免疫染色法で Hic-5 は膵臓間質にある PSC に発現していることを同定した。また Hic-5 欠損マウスを用いて組織レベル、タンパク質



レベルで病態の進行度を比較したところ、Hic-5 欠損マウスでは慢性膵炎の腺房細胞脱落及び間質線維化が著明に抑制されることや線維化マーカーである SMA 発現とコラーゲン I 産生は低下していたことが明らかとなった (図 2)。

2) マウス/ヒト膵臓由来 Hic-5 欠損/抑制 PSC を用いた活性化形質変化の検討

これまでの実験の結果から、膵疾患における Hic-5 発現細胞は活性化した PSC であると考えられる。比重により遠心分離法にてマウス PSC を単離した。活性化された PSC が持つ形質として、型コラーゲンなどの ECM 産生能、炎症性サイトカイン産生能、遊走および増殖能の亢進が知られている。マウスより分離培養した PSC においても、Hic-5 欠損により PSC の活性化を著明に抑制できた(図3)。PSC は、ヒト膵線維化においても主要なエフェクター細胞であることが明らかとなっている。そこでヒト由来 PSC (ScienceCellITM より購入 Catalog #3830) および siRNA 用いて、マウス由来 PSC で Hic-5 欠損により変化が見られる活性化型 PSC 形質について、ヒト PSC でも Hic-5 発現抑制系でも同様に効果が見られた。

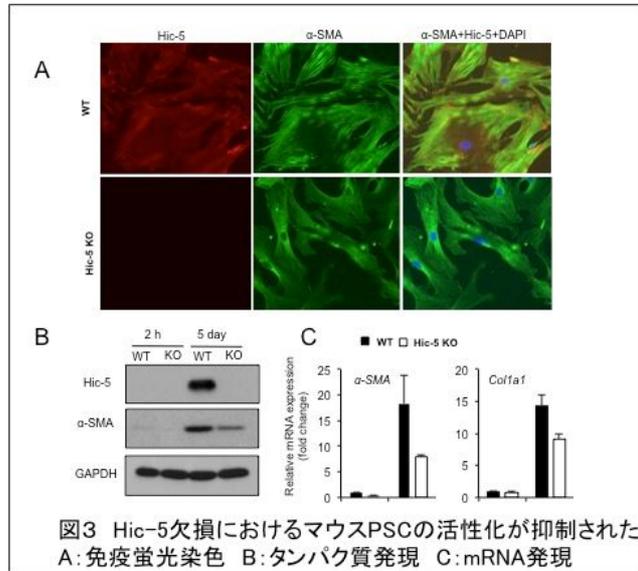


図3 Hic-5欠損におけるマウスPSCの活性化が抑制された
A:免疫蛍光染色 B:タンパク質発現 C:mRNA発現

3) Hic-5 による PSC 活性化制御メカニズムの解析

Hic-5 が TGF- β シグナル下流の一分子として TGF- β シグナル抑制分子 Smad7 の発現を抑制することが証明されている。そこで TGF- β シグナル活性化経路 Smad2 の制御を検討したところ、Hic-5 欠損マウス PSC 及びヒト PSC siRNA では Hic-5 が TGF- β /Smad2 経路を活性化することにより PSC の活性化と膵臓線維化を誘導していることを明らかにした。

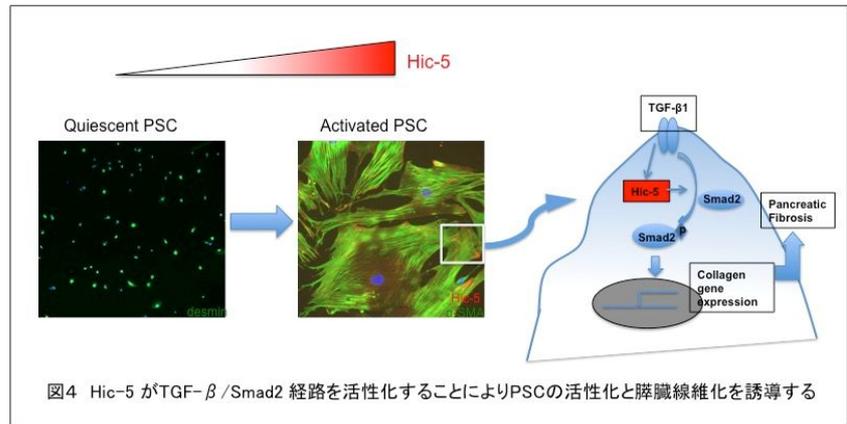


図4 Hic-5 がTGF- β /Smad2 経路を活性化することによりPSCの活性化と膵臓線維化を誘導する

以上の結果より、Hic-5 は新たな PSC 活性化マーカーであり、慢性膵炎の新規治療ターゲットとなり得る分子と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukuda D, Nishimoto S, Aini K, Tanaka A, Nishiguchi T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Masuda K, Naruto T, Tanaka K, Higashikuni Y, Hirata Y, Yagi, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Imoto I, Akasaka T, Shimabukuro M, Sata M	4. 巻 8
2. 論文標題 Toll Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II Induced Atherosclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e010860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.118.010860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Omoto T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Orimo A, Ohnishi K, Yoshihara K, Miyauchi A, Li S, Gao L, Umemoto T, Tanaka J, Nakahara K, Takeya M, Ishida F, Kudo SE, Haraguchi S, Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 37(9)
2. 論文標題 The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1205-1219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41388-017-0033-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nozaki M, Haraguchi S, Miyazaki T, Shigeta D, Kano N, Lei XF, Kim-Kaneyama JR, Minakata H, Miyazaki A, Tsutsui K.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Expression of steroidogenic enzymes and metabolism of steroids in COS-7 cells known as non-steroidogenic cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-20226-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyauchi A, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Chang SH, Saito T, Haraguchi S, Miyazaki T, Miyazaki A.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Alleviation of Murine Osteoarthritis by Deletion of the Focal Adhesion Mechanosensitive Adapter, Hic-5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 15770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.1038/s41598-019-52301-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 雷小峰、金山朱里、宮崎拓郎、原口省吾、宮崎章
2. 発表標題 Hydrogen peroxideinducible clone 5 deficiency enhanced the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrom 3
3. 学会等名 第25回日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	金山 朱里 (Kaneyama Shuri) (10338535)	昭和大学・医学部・准教授 (32622)	