

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18012

研究課題名（和文）肝硬変・肝発がんにおける肝星細胞FXRの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of hepatic stellate cell-expressed FXR in liver cirrhosis and carcinogenesis

研究代表者

松原 勤 (Tsutomu, Matsubara)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20628698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：胆汁酸受容体（Farnesoid X receptor: FXR）は胆汁酸の恒常性維持に重要な因子で肝硬変・肝発がんに対して抑制的に働くことが知られている。しかしながら、肝星細胞に高発現するFXRは、培養細胞で抑制作用を示すことが示唆されているが、生体内での評価が乏しかった。本研究で、肝星細胞のFXR遺伝子をノックアウトさせたマウスは、FXR遺伝子の全身欠損マウスと同様に、加齢に伴う肝線維化の亢進が観察された。また、FXRは、初代培養ヒト肝星細胞株HHSteCにおいて老化関連遺伝子を制御することから、老化、肝線維化ならびにFXRに分子連関が存在する可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変や肝がんは、背景肝疾患に関係なく、慢性肝炎の終末像であり、効果的な治療薬は存在しない。また、高齢者ほど肝硬変や肝がんが発症するリスクが高くなることが知られている。今後、加齢に伴う肝線維化亢進の分子メカニズム、細胞が老化していく過程におけるFXRの役割など、詳細な研究が必要とされるが、本研究成果は、肝星細胞のFXRを標的とする治療戦略が可能であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：Bile acid receptor (Farnesoid X receptor: FXR) is an important factor for maintaining the homeostasis of bile acid, and is known to suppressively act on liver cirrhosis and liver cancer. However, FXR, which is highly expressed in hepatic stellate cells, has been suggested to have an inhibitory effect on the cultured cells, but its evaluation in vivo was poor. In the present study, mice with knockout of the FXR gene in hepatic stellate cells were observed to have increased aging-induced liver fibrosis, as in mice with a systemically deficient FXR gene. Moreover, since FXR regulates senescence-related genes in the primary human hepatic stellate cell line HHSteC, this study indicated a possibility that molecular association exists in senescence, liver fibrosis and FXR.

研究分野：肝臓病学

キーワード：FXR 肝星細胞 加齢 肝硬変 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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 (HSC) や筋線維芽細胞 (MFB) などの非実質細胞に置換されて 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した慢性的肝線維化で、年率 8% で発がんする。肝硬変・肝がんは、現在治療効果が得られにくい疾患であり、その新規治療法の開発が求められている。肝硬変・肝がんの背景肝疾患として現在 C 型肝炎が最も多いが、C 型肝炎ウイルス治療法の目覚ましい発展により C 型肝炎を背景とする肝硬変・肝がんは減少すると予想されている。その一方で、まだ分子病態が明確にされていない非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を背景肝疾患とする肝硬変・肝がんが増加している。また、本邦で糖尿病が増加しており、糖尿病併発肝がんの背景疾患の約 40% が NASH である。このようなことから、今後 NASH が主たる肝硬変・肝がんの背景肝疾患となると考えられている。NASH の分子病態は動物モデルや臨床検体を用いて盛んに解析されているものの、NASH から肝硬変・肝がんへの進展メカニズムは不明な点が多い。

申請者は NASH 病態モデルマウスで血清胆汁酸の増加が (NASH も含めた) 肝炎に共通する血清代謝産物変化であると気づいた。この事象は NASH 患者にも認められることが報告されている。胆汁酸は必須の内因性化合物であるものの、その過剰な肝蓄積は肝機能障害を引き起こす。胆汁酸受容体 Farnesoid X receptor (FXR) は、胆汁酸関連遺伝子発現を調節して細胞内胆汁酸レベルを調節する主要因子である。申請者らは肝線維化を伴って肝がんを自然発症する FXR 全身欠損マウスと違って、肝実質細胞特異的 FXR 欠損マウスでは肝がんが自然発症しないことを発見した。加えて、FXR 発現は実質細胞のみならず肝星細胞 (コラーゲン産生細胞) でも高発現していると示唆されたしかし、その分子機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

近年、慢性肝炎に伴う肝星細胞などのコラーゲン産生細胞の持続的活性化が、肝細胞機能を低下させる要因であり、肝発がんに寄与することが示された。さらに、持続的な活性化により細胞老化に陥った肝星細胞は分泌因子の変化により発がんを誘発すると考えられている。

本研究は、肝硬変・肝がんの新規治療法の開発を最終目標とし、活性化星細胞ならびに老化星細胞における FXR 機能解析を介して肝硬変と肝がんの分子病態に関わる新規因子の発掘を目指す。

3. 研究の方法

- (1) 肝細胞、肝星細胞の細胞培養系に、薬物を添加して、遺伝子発現変化、タンパク相互作用などを観察する。
- (2) 遺伝子改変マウス、脂肪肝炎モデルマウスを解剖して、組織・形態解析や分子解析などを行い、病態変化を観察する。

4. 研究成果

(1) ヒト肝星細胞 HHStec に構造の異なる 2 種の FXR 活性化物質 GW4064 とオベチコール酸を添加すると遺伝子発現パターンが異なっていたため、まず、これらの分子機構の差異を調べることにした。Flag-FXR を HHStec に過剰発現させ、抗 Flag 抗体-マグネットビーズで共沈降させると、GW4064 添加時に FXR との結合が消失するタンパク質 X を発見した (図 1A)。また、GW4064 添加時に結合し、オベチコール酸添加時には結合しないタンパク質 Y も発見した (図 1B)。

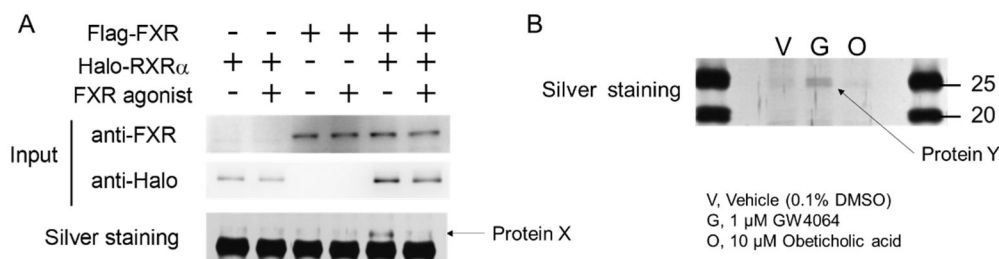


図 1. FXR 関連タンパク質の探索

(2) ヒト肝星細胞 HHStcC に GW4064 を添加すると老化関連遺伝子の発現が上昇したので、老化肝星細胞について研究を行った。老化肝星細胞は、正常肝星細胞で観察される TGF の添加による SMA および COL1A1 遺伝子発現の上昇と CYGB 遺伝子発現の減弱が、著しい減弱が認められた (図 2)。

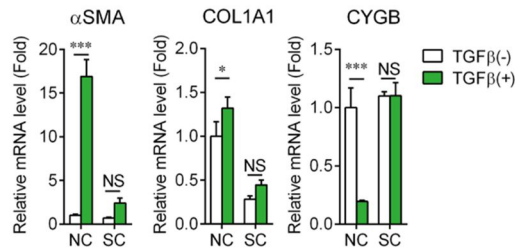


図2. 老化肝星細胞におけるTGFβ応答の変化

(3) FXR 全身欠損マウスは、肝線維化を伴う肝がんが自然発症するが、肝細胞特異的 FXR 欠損マウス (Alb-Cre FXR flox) は、肝線維化・肝がん共に認められなかったことから、非実質細胞の FXR が重要と考えられた。そこで、マクロファージ系細胞特異的 FXR 欠損マウス (Lys-Cre FXR flox) について観察したが、肝線維化・肝がん共に認められなかった。興味深いことに、コラーゲン産生細胞特異的 FXR 欠損マウス (COL1A1-Cre FXR flox) は、肝線維化の増強が観察された (図 3)。

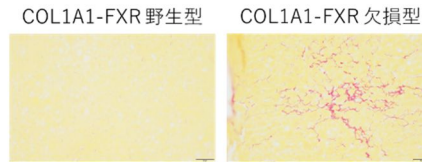
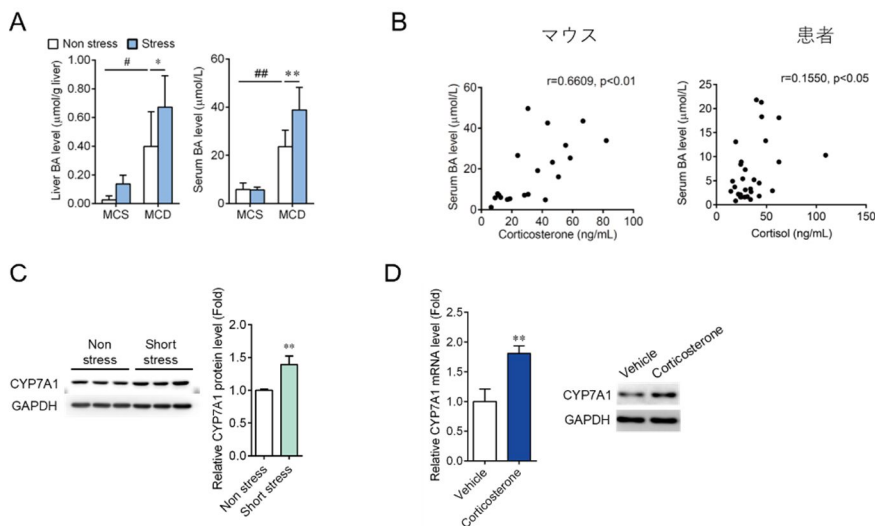


図 3. COL1A1-Cre FXR-floxマウスの肝線維化

(4) コラーゲン産生細胞特異的 FXR 欠損マウスの病態解析をしている過程で、ストレスのマーカーである血中グルココルチコイド量が変化していることが明らかになったので、拘束ストレスと胆汁酸動態の関連性を解析した。拘束ストレスは、メチオニン・コリン欠損高脂肪食によって誘発された脂肪肝病態において、血液中および肝臓中の胆汁酸レベルを上昇させた (図 4A)。そのマウスモデルにおいて、血清グルココルチコイドレベルと血清胆汁酸レベルに相関が認められた (図 4B)。さらに、非アルコール性脂肪肝患者において、血清グルココルチコイドレベルと血清胆汁酸レベルにも相関が認められた (図 4B)。以上より、ストレス、グルココルチコイドならびに胆汁酸に分子連関があると推定された。ストレスは CYP7A1 発現レベルを上昇させる事が観察されたので (図 4C)、グルココルチコイドを初代培養マウス肝細胞に添加すると、CYP7A1 発現レベルの上昇が認められ (図 4D)、ストレスは、グルココルチコイドを介して CYP7A1 発現を上昇させていると考えられた。



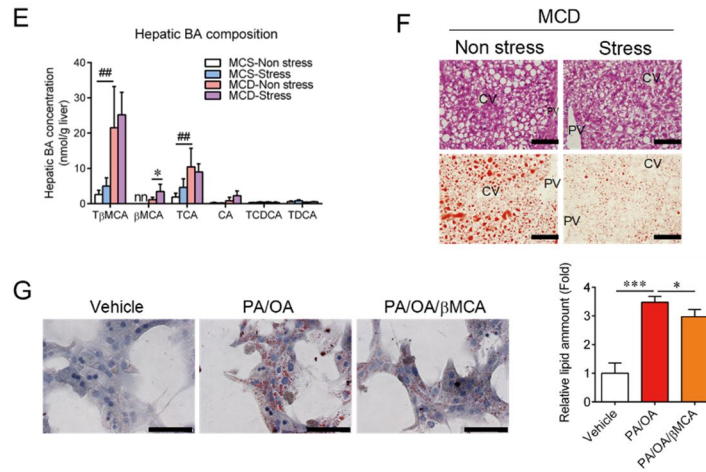


図4. 脂肪肝マウスにおける拘束ストレスの影響

液体クロマトグラフィー マススペクトロメトリーで肝臓内胆汁酸組成を解析すると、拘束ストレスで抱合型胆汁酸に変化が認められなかったが、非抱合型胆汁酸、特に、 β -ムリコール酸の上昇が顕著であった(図4E)。ストレスはNASHマウスモデルで肝脂肪蓄積を低下させ(図4F) β -ムリコール酸を初代培養マウス肝細胞に添加すると、パルミチン酸・オレイン酸添加で惹起される脂肪蓄積が減弱された(図4G)。以上のことから、ストレスは、グルココルチコイドで誘導されたCYP7A1を介して β -ムリコール酸レベルを上昇し、その結果、肝脂肪蓄積を低下させると推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Odagiri Naoshi, Matsubara Tsutomu, Higuchi Moe, Takada Sayuri, Urushima Hayato, Sato-Matsubara Misako, Teranishi Yuga, Yoshizato Katsutoshi, Kawada Norifumi, Ikeda Kazuo.	4. 巻 455(1-2)
2. 論文標題 Involvement of ERK1/2 activation in the gene expression of senescence-associated secretory factors in human hepatic stellate cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 7-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-018-3466-x.	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26件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤井 英樹, 松原 勤, 河田 則文
2. 発表標題 NAFLD/NASHの病態進展における血清胆汁酸組成の影響
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松原勤、高田さゆり、小田桐直志、松原三佐子、大黒敦子、宇留島隼人、吉里勝利、河田則文、池田一雄
2. 発表標題 老化肝星細胞におけるTGF- β シグナル変化の分子機序解析
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 高田 さゆり, 松原 勤, 樋口 萌, 小田桐 直志, 松原 三佐子, 河田 則文, 池田 一雄
2. 発表標題 老化肝星細胞におけるTGF β シグナル変化についての解析
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松原 勤
2. 発表標題 肝がん・肝硬変における肝星細胞の多面的理解
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松原 勤、高田 さゆり、小田桐 直志、宇留島 隼人、河田 則文、池田 一雄
2. 発表標題 肝線維老化肝星細胞におけるTGF シグナルの変化
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松原勤 小田桐直志 樋口萌 河田則文 池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の細胞老化に伴う遺伝子発現変化
3. 学会等名 第24回肝細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小田桐直志 松原勤 河田則文 池田一雄
2. 発表標題 ヒト肝星細胞の老化関連分泌表現型解析
3. 学会等名 第31回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松原勤 小田桐直志 河田則文 池田一雄
2. 発表標題 ヒト肝星細胞における老化関連分泌因子の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会
4. 発表年 2018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