

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16479

研究課題名(和文)肝星細胞の新しい活性化抑制機構の解明 肝星細胞の接着の意義と肝線維化治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of a novel inhibition mechanism of hepatic stellate cells activation - significance of hepatic stellate cell adhesion and its application to the treatment of liver fibrosis

研究代表者

湯浅 秀人 (Yuasa, Hideto)

大阪公立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：50825297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝星細胞の慢性的な活性化は肝線維化の主因となる。肝星細胞は組織内で微小突起を介して肝細胞と物理的に接着しており、その接着を介して活性化を抑制している。そのため肝星細胞の微小突起は肝星細胞の活性化制御において重要な構造であると考えられる。本研究では肝星細胞の微小突起を構成するタンパク質およびその形成メカニズムについて解明することを目的に研究を行った。結果として肝星細胞の微小突起はフィロポディア様構造であり、small GTPaseの一つであるCdc42の活性化によってその形成が制御されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化は肝臓の様々な障害・疾患に伴って生じ、その進展は終末像である肝硬変の発症につながる。そのため肝線維化に対する医学研究は数多くなされてきたが、未だ優れた治療法は存在しておらず、アンメット・メディカル・ニーズの一つとされている。肝線維化は肝臓に存在する肝星細胞の活性化によって誘発される。そのため肝星細胞の活性化は肝線維化治療のための治療ターゲットとしてみなされているが、未だ不明な点が多く残されている。本研究では肝星細胞の活性化制御に関わる新規メカニズムの一端を明らかにした。そのため、この新規メカニズムを標的とした肝線維化に対する新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic activation of hepatic stellate cell is the main cause of hepatic fibrosis. Hepatic stellate cells directly adhere to hepatocytes via microprocesses in the liver and suppress activation through their adhesion. Therefore, the microprocesses of hepatic stellate cells are considered to be an important structure in the regulation of hepatic stellate cells activation. In this study, we aimed to elucidate the proteins constituting the microprocessor of hepatic stellate cells and the mechanism of their formation. We found that the microprocesses of hepatic stellate cells are a filopodia-like structure and its formation is regulated by the activation of Cdc42, one of the small GTPases.

研究分野：組織学、肝臓学

キーワード：肝臓 電子顕微鏡 肝星細胞 超微形態 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

肝線維化は肝臓の様々な障害・疾患に伴って生じ、その進展は終末像である肝硬変を誘発する。肝硬変は非代償期にまで至ると非常に予後が悪く、年間に1万人以上が死亡している。また病因の如何によらず肝がんの母地は肝硬変であることがほとんどである。これらのことから肝硬変は有効な治療法が早急に求められる病態であるが、一方で肝硬変は不可逆性であるとされているため、その治療のためには前病態である肝線維化を如何に早期に認知し、改善するかが重要である。そのため肝線維化に対する医学研究は数多くなされてきたが、未だ優れた治療法は存在しておらず、アンメット・メディカル・ニーズの一つとされている。

肝線維化の原因細胞は肝臓に存在する肝星細胞である。肝星細胞は肝臓のディッセ腔に存在する間葉系細胞であり、正常な肝臓では静止型としてビタミンAの蓄積に貢献する細胞である。一方で肝障害時には活性化を経て筋線維芽細胞様細胞へと形質転換し、コラーゲンを含む細胞外基質を分泌し、創傷治癒を行う。慢性的な肝炎や肝障害により肝星細胞の継続的な活性化が起こると過剰な細胞外基質が産生されることによって、肝線維化へと至る。従って肝線維化の治療のためには肝星細胞の活性化を抑制することが重要である。肝星細胞の活性化は従来、TGF- β を始めとする液性因子によって誘導されることが知られている。従って肝線維化治療薬の開発研究はこの液性因子による作用に注目して行われているが、未だ有効な治療薬開発には至っていない。

肝星細胞は肝臓から単離し培養を行うと、液性因子による刺激無しに自然活性を行う事が知られている。従って肝星細胞には液性因子非依存的かつ組織依存的な活性化制御機構が備わっており、その喪失が活性化の誘導に関わっている可能性が想定された。我々はこの仮説を基に解析を進めており、これまでに肝星細胞と肝細胞との物理的な接着が肝星細胞の活性化を抑制しており、肝星細胞活性化の最初期にこの物理的な接着が消失することによって活性化へと移行することを報告してきた。

2. 研究の目的

肝星細胞は微小突起を伸ばすことによって肝細胞と接着を形成しており、このことから肝星細胞の微小突起は静止型を維持するための重要な構造物であることが想定される。しかしながらこの微小突起についての研究はこれまでにまったくなされていない。そこで本研究ではこの微小突起の性質を解析し、その形成メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 代表的な細胞の微小突起構造として **filopodia** が知られている。そこでマウス肝臓を用いて **filopodia** を構成するタンパク質が肝星細胞およびその微小突起に発現するかどうかを免疫組織化学および免疫電子顕微鏡を用いて解析を行った。

(2) マウスから単離した肝星細胞を培養し、細胞形態を制御するシグナルに対する様々な活性化促進剤ないし阻害剤を添加することによって肝星細胞の微小突起形成に作用するシグナルの同定を行った。その後、再びマウス肝臓を用いて同定した候補因子が生体内で微小突起形成に影響を与えるかどうかの評価を行った。

4. 研究成果

(1) 肝星細胞の微小突起の性質の解明

Filopodia は細胞骨格であるアクチンによって構成される微小突起構造である。そこで最初に **Pan-actin** に対する免疫組織化学的染色を行い、肝星細胞の微小突起もまたアクチンによって構成されているかどうかを解析したところ、肝星細胞の形態的特徴である脂肪滴を有する細胞が **Pan-actin** 陽性を示した。さらに **Pan-actin** に対する免疫電子顕微鏡法を用いたところ **Pan-actin** 陽

性は肝星細胞の微小突起上に局在した（図1）。

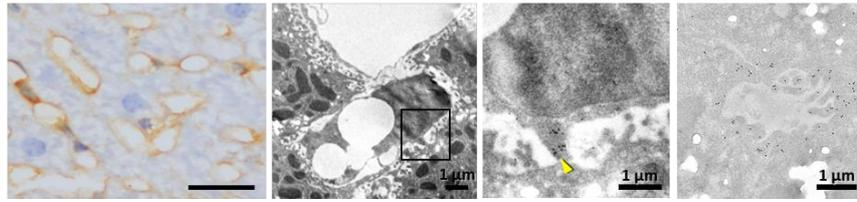


図1. Pan actin の免疫組織化学および免疫電子顕微鏡

次に Filopodia 構成タンパク質である fascin および VASP を免疫組織化学で検出したところ、肝星細胞が陽性を示した。これらのタンパク質に対する免疫電子顕微鏡法を用いたところ陽性は肝星細胞の細胞周囲上に点在し、一部突起上にも局在した次に。Filopodia の形成に関わるタンパク質として知られている Arp2 および mDia2 の検出を行ったところ肝星細胞は Arp2 陰性かつ mDia2 陽性であった。（図2）。

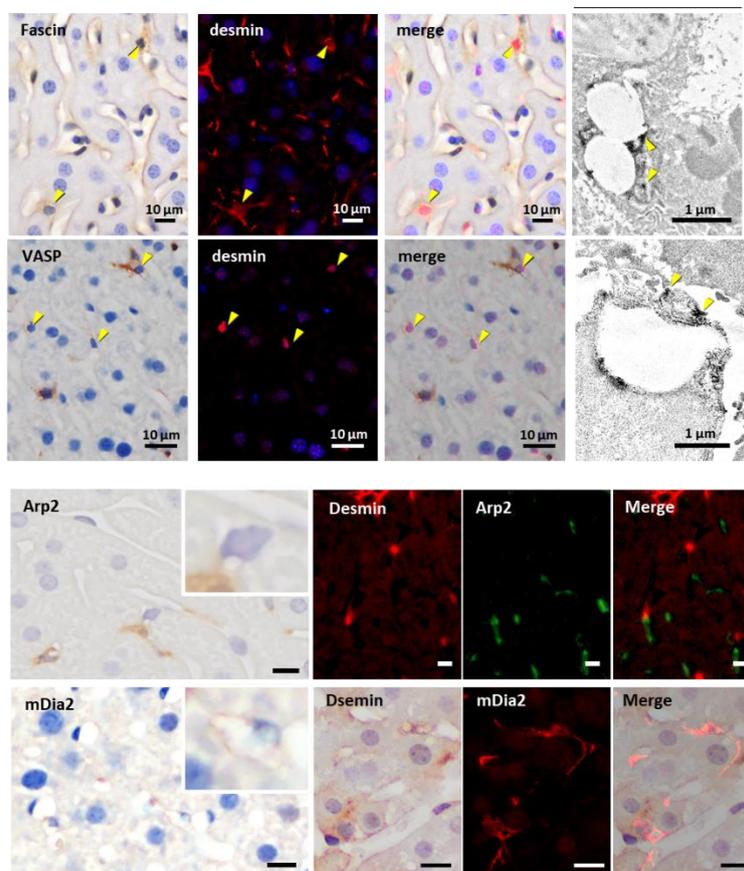


図2. Filopodia 関連タンパク質の免疫組織化学および免疫電子顕微

以上の結果から肝星細胞の微小突起は Filopodia に類似した構造物であることが示唆された。

(2) 肝星細胞の微小突起形成メカニズムの解明

Filopodia は small GTPase の一つである Cdc42 によって制御されることが報告されている。肝星細胞の微小突起もまた Filopodia 様構造であることから肝星細胞における微小突起の形成シグナルとして Cdc42 に着目して解析を行った。

肝星細胞は組織から単離し培養すると、活性型へと形質を変化させてしまうことが知られている。一方、我々は E-cadherin コーティングディッシュ上で初代培養肝星細胞を培養すると静止型形態を維持することを見出している。そこでこの培養条件下での静止型肝星細胞が微小突起

を有するかを phalloidin 染色で確認したところ、生体内の静止型肝星細胞と同様、細胞突起の側面から伸びる微小突起が観察された。また蛍光免疫染色で Filopodia 関連タンパク質の検出を行ったところ、生体内と同様、微小突起に Fascin、VASP および mDia2 の陽性がみとめられた。従って肝星細胞の微小突起は静止型を維持する培養条件下において出現することが示された。そこで通常のディッシュと E-cadherin コーティングディッシュで培養した肝星細胞で Cdc42 の活性化を解析したところ E-cadherin コーティングディッシュの肝星細胞の方が強い活性化を示した (図 3)。

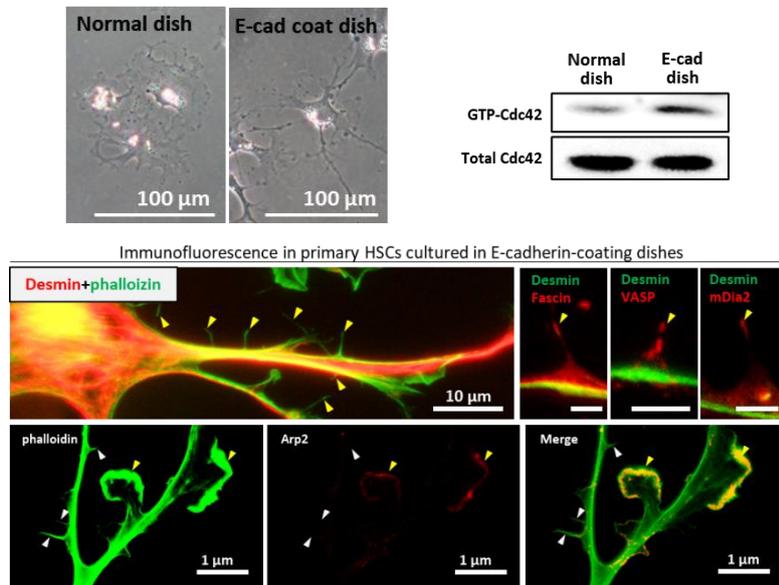


図 3. 培養条件下での初代培養肝星細胞の微小突起の性質と Cdc42 活性化

次に E-cadherin コーティングディッシュ上の初代培養肝星細胞に Cdc42 活性化阻害剤である ML141 および Zcl278 を添加したところ肝星細胞の微小突起が縮小した。また肝星細胞の活性化マーカーである α SMA の発現が上昇した (図 4)。また通常ディッシュ上の初代培養肝星細胞に Cdc42 の活性化を促進させる Rho activator を添加したところ、E-cadherin コーティングディッシュの肝星細胞と類似した細胞突起を有する形態を示し、微小突起の形成もまた促進された (図 5)。従って肝星細胞の微小突起形成を制御する因子としては Cdc42 が同定された。

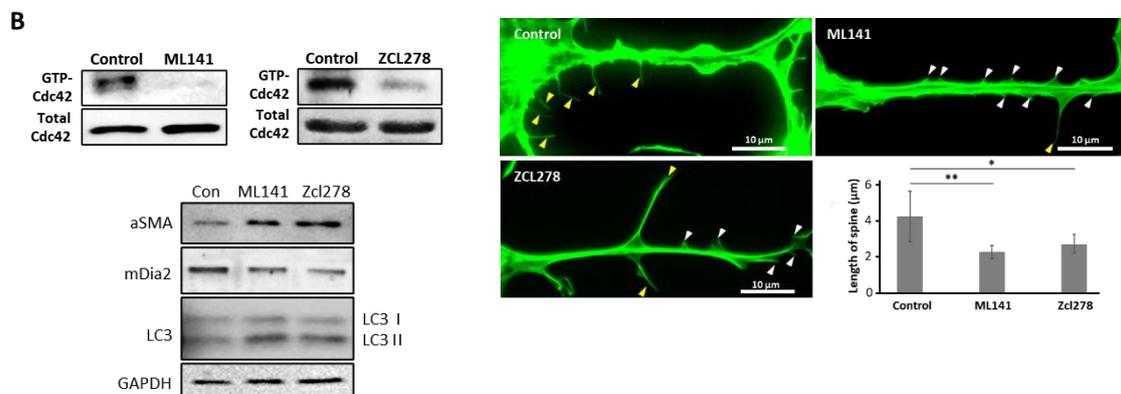


図 4. 培養条件下での初代培養肝星細胞の Cdc42 活性化阻害の影響

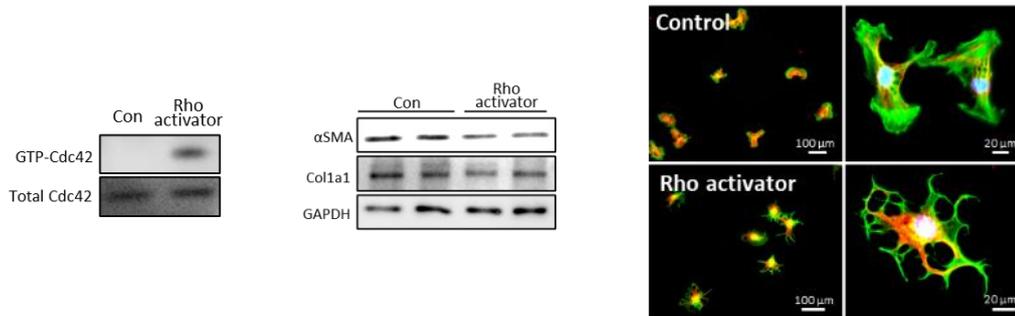


図 5. 培養条件下での初代培養肝星細胞の Cdc42 活性化促進の影響

更に *in vivo* における肝星細胞の Cdc42 活性化阻害の影響を解析するために、正常マウスに ML141 を腹腔投与した。結果、ML141 を投与した肝星細胞は観察された微小突起は少なく滑らかな細胞表面を有していた (図 6 A)。また我々はこれまでに四塩化炭素の単回投与によって肝障害を誘発すると、投与後から 12 から 24 時間ほどで肝星細胞の微小突起が消失し、その後一週間後には再び形成され、再び肝細胞と接着することで静止型に戻ることを示唆している。そこでこの肝障害からの回復期のマウスに ML141 を投与すると、障害後一週間でもコントロールと比べて多くの肝星細胞が活性型マーカーである α SMA の陽性を示したままであった (図 6 B)。

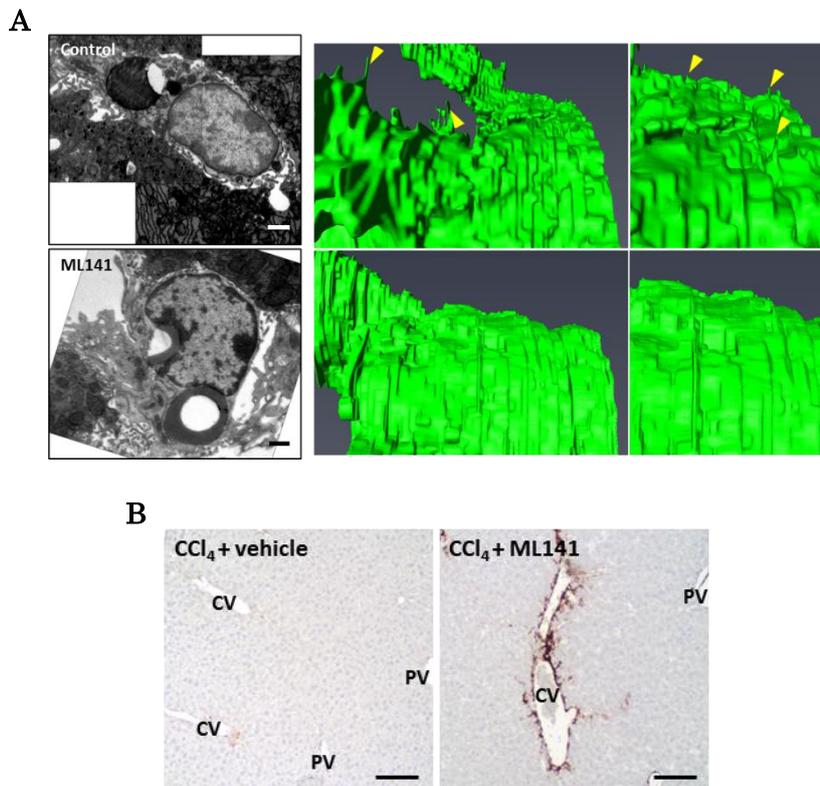


図 6. *In vivo* での Cdc42 活性化阻害による肝星細胞への影響

これらの結果から肝星細胞の微小突起は Cdc42 によって形成が制御されており、その制御によって肝星細胞の活性化状態もまた制御されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Urushima Hayato, Yuasa Hideto, Matsubara Tsutomu, Kuroda Noriyuki, Hara Yaiko, Inoue Kouji, Wake Kenjiro, Sato Tetsuji, Friedman Scott L., Ikeda Kazuo	4. 巻 191
2. 論文標題 Activation of Hepatic Stellate Cells Requires Dissociation of E-Cadherin?Containing Adherens Junctions with Hepatocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 438 ~ 453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2020.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、松原 勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の微小突起形成機構について
3. 学会等名 第35回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、松原 勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の微小突起形成におけるCdc42の役割について
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋口萌、松原勤、湯浅秀人、宇留島隼人、池田一雄
2. 発表標題 アセトアミノフェン誘発急性肝炎におけるC/EBP homologous proteinの役割
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇留島隼人、和氣健二郎、湯浅秀人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の活性化時における上皮-間葉転換と機能変化との相関
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、高山実紗子、松原 勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞の培養条件下における静止型形態の維持について
3. 学会等名 第34回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 正常肝ないし障害肝の肝星細胞におけるfilopodia関連タンパク質の発現解析
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅秀人、宇留島隼人、松原勤、池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞 - 肝細胞間の接着と肝星細胞活性化との関係について
3. 学会等名 第14回中四国電子顕微鏡研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅秀人, 宇留島隼人, 松原 勤, 池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞におけるfilopodia関連タンパク質の発現解析
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

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関