

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04110

研究課題名(和文)細胞性粘菌由来低分子物質をリード化合物とするNASH治療薬開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic study for developing NASH therapeutic drugs by using a small molecule derived from the cellular slime mold serving as a lead compound

研究代表者

石川 智久 (ISHIKAWA, Tomohisa)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10201914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：活性型肝星細胞(aHSC)は肝線維化の責任細胞と考えられており、aHSCの脱活性化は肝線維化の治療標的になり得る。我々は、細胞性粘菌由来低分子化合物DIF-1がaHSCを脱活性化させることを見出した。そこで本研究では、DIF-1を用いてaHSCの脱活性化作用を解析することで、肝線維化治療の標的分子の同定を目指すとともに、DIF-1をリード化合物とした構造活性相関解析を行なった。その結果、DIF-1によるaHSCの脱活性化にはHedgehog経路の抑制が関与することを示唆した。また、合成したDIF-1構造類似体を用いた構造活性相関解析により、脱活性化作用に必要な構造的特徴を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満人口の増加に伴い、肝線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の患者数は年々増加している。しかし、その有効な予防・治療法は、未だに見出されていない。肝星細胞(HSC)は活性化されると、コラーゲンを産生する筋線維芽様細胞へと形質転換することから、活性型HSC(aHSC)は肝線維化の責任細胞と考えられている。本研究では、細胞性粘菌由来物質DIF-1がaHSCを脱活性化させるという我々の知見を基にして、aHSCの脱活性化にHedgehog経路の抑制が関与することを初めて示唆した。また、DIF-1の脱活性化作用に必要な構造的特徴を同定し、NASH治療薬創出に向けた基盤的知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Activation of hepatic stellate cells (HSCs) has been proposed to be responsible for the development of liver fibrosis. Accordingly, the deactivation of activated HSCs (aHSCs) is expected to be a therapeutic target for liver fibrosis. We previously showed that differentiation-inducing factor-1 (DIF-1), a small molecule derived from the cellular slime mold, induces the deactivation of aHSCs. In the present study, we investigated the mechanism involved in the DIF-1-induced deactivation of aHSCs, thereby trying to identify target molecules for the treatment of liver fibrosis. We also performed the analysis of the structure-activity correlation by using DIF-1 as the lead compound. The results obtained in the present study suggest that DIF-1 induces deactivation of aHSCs through inhibiting the Hedgehog signaling. In addition, the structure-activity correlation analysis of DIF-1 derivatives suggests possible structural characteristics required for their deactivation effect on aHSCs.

研究分野：薬理学

キーワード：NASH 肝星細胞 肝線維化 DIF-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肥満人口の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の患者数は年々増加しており、健康診断受診者の約3割が NAFLD と診断されている。さらに、NAFLD の中でも炎症・線維化を伴う NASH は進行が不可逆的であり、その予後不良を決定づける重要な因子として肝線維化が挙げられる。しかし、肝線維化の有効な予防・治療法は、未だに見出されていない。

肝非実質細胞の一つである肝星細胞 (hepatic stellate cell: HSC) は、肝障害時に活性化され、コラーゲンを産生・分泌する筋線維芽様細胞へと形質転換する。そのため、活性型 HSC は肝線維化の責任細胞と考えられている。現状、進行した肝線維化の治療は不可能だが、静止型 HSC がコラーゲンなどの細胞外基質を分解する matrix metalloproteinase (MMP) を分泌することから、活性型 HSC を静止型へと脱活性化できれば、肝線維化も治療可能であると期待される。

我々は最近、マウス初代培養 HSC を用いて、細胞性粘菌由来低分子化合物 DIF-1 (1-((3,5-ジクロロ)-2,6-ジヒドロキシ-4-メトキシフェニル)-1-ヘキサノン) が HSC の活性化を抑制することを見出し、その作用に GSK-3 の活性化を介した Wnt/  $\beta$ -catenin (canonical Wnt) 経路の阻害が関与していることを示唆した。

我々はさらに、DIF-1 が活性型 HSC を静止型 HSC 様に脱活性化させるという大変興味深い結果も得た。ただし、脱活性化作用には canonical Wnt 経路の関与は認められなかった。このことから、HSC の活性化シグナルと活性化維持シグナルは異なっており、DIF-1 はそのどちらに対しても異なる作用機序を介して作用することが示された。すなわち、DIF-1 をツールとして用いれば、活性型 HSC の脱活性化機構の解析が可能となるだけでなく、NASH 治療薬の開発に繋がる可能性も期待できる。そこで本研究では、DIF-1 を利用して活性型 HSC の脱活性化機構を解明するとともに、DIF-1 をリード化合物として肝線維化を解消する NASH 治療薬の創出に向けた基盤的研究を展開した。

## 2. 研究の目的

本研究では、DIF-1 を用いて活性型 HSC の脱活性化機構を解明することで NASH 治療薬の標的分子の同定を目指すとともに、DIF-1 をリード化合物として構造活性相関解析を行うことで、より効果的で臨床に応用可能な NASH 治療薬の創出に繋がる基盤的知見を得ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

我々は、前述の通り、DIF-1 による HSC 活性化抑制作用を詳細に検討してきた。その際に得られた知見を基に、以下の検討を行った。

### A) 肝線維化モデルマウスを用いた肝線維化回復の検証

Thioacetamide (TAA) 腹腔内投与により肝線維化マウスモデルを作製した。モデル確立後に DIF-1 を後処置し、肝線維化治療効果を検証した。肝臓の薄切切片を作製し、活性型 HSC のマーカーである平滑筋型  $\alpha$ -アクチン ( $\alpha$ -SMA) の発現を免疫染色により観察することで、HSC の脱活性化を評価した。また、sirius red を用いて薄切切片のコラーゲン線維を染色し、肝線維化の回復を評価した。

## **B) 構造活性相関**

DIF-1 をリード化合物として構造活性相関解析を行った。DIF-1 の炭素鎖の伸長、ベンゼン環の八口ゲン化、ケトンのアミド化、エステル化など、DIF-1 に構造修飾を施した化合物を合成し、生物活性を評価した。生物活性は、ヒト HSC 細胞株である LX-2 細胞を用いて、脱活性化作用を評価した。

## **C) マウス及びヒト初代培養 HSC における脱活性化シグナル経路の解明**

DIF-1 による HSC 脱活性化のシグナル経路を解析し、HSC の活性化と脱活性化の過程において鍵となる分子を探索した。

### **C-1) DIF-1 の標的分子の探索**

B)の結果を基に、合成した化合物を脱活性化作用を示した群 ( active 群 ) と示さなかった群 ( inactive 群 ) に分け、化合物データベース ChEMBL に収載されている約 190 万種の低分子化合物と DIF-1 構造類似体の類似度を分子フィンガープリント法により計算することで、DIF-1 および active 群に類似し、かつ inactive 群に類似しない低分子化合物を同定した。そして、これらの標的タンパク質情報より、DIF-1 の脱活性化作用に關与する標的分子を推定した。さらに、RNA 次世代シーケシング ( RNA-seq ) 解析を用いて、マウス初代培養静止型 HSC、活性型 HSC 、DIF-1 を処置した脱活性化型 HSC の mRNA 網羅的発現解析を行い、DIF-1 による HSC 脱活性化に伴って発現が変化する分子を解析し、DIF-1 の標的分子の候補を推定した。

### **C-2) DIF-1 による HSC 脱活性化機序の解明**

C-1)で推定された DIF-1 の標的分子の候補、及び DIF-1 による HSC 脱活性化に伴って発現が変化する分子の活性化薬及び阻害薬を用いて、DIF-1 による HSC 脱活性化機序 ( シグナル経路 ) を解析した。

## **4 . 研究成果**

### **A) 肝線維化モデルマウスを用いた肝線維化回復の検証**

肝臓薄切切片の sirius red 染色の結果より、TAA 腹腔内投与により増加した肝臓内コラーゲンの蓄積は、DIF-1 の経口投与 ( 後処置 ) により有意に減少することが示された。また、TAA 投与により増加した活性型 HSC マーカーである  $\alpha$ -SMA、I 型コラーゲン 1、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 の mRNA の発現も、DIF-1 の後処置により有意に減少した。以上の結果から、DIF-1 は、in vivo においても、HSC の脱活性化を介して肝線維化を回復させることが示唆された。

## **B) 構造活性相関**

DIF-1 をリード化合物として合成した 14 種の DIF-1 構造類似体を用いた構造活性相関解析を行った。各化合物の HSC 脱活性化能を評価し、DIF-1 と同程度の HSC 脱活性化能を有する 8 種の DIF-1 構造類似体 ( active 群 ) および脱活性化能がない、あるいは弱い 6 種の DIF-1 構造類似体 ( inactive 群 ) を同定した。この結果より DIF-1 の HSC 脱活性化作用に必要な構造を同定できた。ただし、残念ながら、今回合成した DIF-1 構造類似体の中には、DIF-1 より HSC 脱活性化作用の強い化合物を見出すことはできなかった。

## **C) マウス及びヒト初代培養 HSC における脱活性化シグナル経路の解明**

### **C-1) DIF-1 の標的分子の探索**

DIF-1 が結合する標的分子を探索するため、ビオチン標識化 DIF-1 を作製した。B)で得られた結果を基に、DIF-1 の脱活性化作用への影響が生じない部位をビオチン標識部位として決定した。また、B)で得られた結果を基に、化合物データベース ChEMBL に収載されている約 190 万種の低分子化合物と DIF-1 構造類似体の類似度を分子フィンガープリント法により計算することで DIF-1 および active 群に類似し、かつ inactive 群に類似しない低分子化合物を 24 種同定した。これらの低分子化合物の標的タンパク質情報から、DIF-1 の標的タンパク質候補を複数推定した。

また、RNA-seq 解析を用いて、マウス初代培養静止型 HSC、活性型 HSC、DIF-1 を処置した脱活性化型(静止型様)HSC の mRNA 網羅的発現解析を行い、DIF-1 による HSC 脱活性化に伴って発現が変化する分子の解析を実施した。HSC の“活性化シグナル”と“活性化維持シグナル”は異なっており、DIF-1 の脱活性化の作用標的と考えられる“活性化型 HSC における活性化維持シグナル”の候補を複数見出した。

### **C-2) DIF-1 による HSC 脱活性化機序の解明**

C-1)で見出した候補分子のうち、HSC 活性化時における活性化が報告されている Hedgehog 経路制御因子である *smoothed (SMO)* に着目した。LX-2 細胞における DIF-1 の HSC 脱活性化作用に対する SMO 活性化薬 SMO agonist (SAG) の効果を検討した結果、300 nM SAG が DIF-1 の脱活性化作用を解除する傾向が認められた。以上の結果から、DIF-1 の HSC 脱活性化作用に Hedgehog 経路の抑制が関与する可能性が示された。

以上より、DIF-1 は肝線維化を回復させる作用を有すること、また、その作用の一部は Hedgehog 経路の抑制を介した HSC 脱活性化作用によることが示唆された。今後、DIF-1 をリード化合物として、より効果的で臨床に应用可能な NASH 治療薬の創出に繋がることが期待される。

## 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 3件）

1. 著者名 Yamaguchi Momoka, Kanazawa Takanori, Morino Sumire, Iioka Shingo, Watanabe Yuta, Dohi Naoki, Higashi Kenjiro, Kondo Hiromu, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Increased Tropism of Extracellular Vesicles Derived from Palmitic Acid-Treated Hepatocytes to Activated Hepatic Stellate Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12101023	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 Dohi Naoki, Yamaguchi Momoka, Hase Reina, Suzuki Ryosuke, Wakabayashi Yumeto, Nishiyama Ryota, Saito Shin-ya, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Quantitative real-time measurement of endothelin-1-induced contraction in single non-activated hepatic stellate cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0255656	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 Yamaguchi Momoka, Dohi Naoki, Ooka Akira, Saito Shin-ya, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 142
2. 論文標題 Caffeine-induced inversion of prostaglandin E2 effects on hepatic stellate cell activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.111989	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 Yamaguchi Momoka, Ohbayashi Saya, Ooka Akira, Yamashita Hinako, Motohashi Nanami, Kaneko Yukiko K., Kimura Toshihide, Saito Shin-ya, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 600
2. 論文標題 Harmine suppresses collagen production in hepatic stellate cells by inhibiting DYRK1B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 136 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.054	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23件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下日菜子、山口桃生、刀坂泰史、大岡央、森本達也、石川智久
2. 発表標題 アルギニンメチル基転移酵素PRMT5は肝線維化を促進性に制御する
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋亮汰、山口桃生、森野純鈴、岡部磨幸、大岡央、石川智久
2. 発表標題 肝障害ex vivoモデルを用いた創薬スクリーニング系の構築
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下日菜子、山口桃生、刀坂泰史、大岡央、森本達也、石川智久
2. 発表標題 アルギニンメチル基転移酵素PRMT5は肝線維化を促進性に制御する
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋亮汰、山口桃生、森野純鈴、岡部磨幸、大岡央、石川智久
2. 発表標題 肝障害ex vivoモデルを用いた創薬スクリーニング系の構築
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大岡央、山口桃生、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 肝線維化治療薬開発に向けた肝星細胞形質転換シグナル制御の新展開
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森野純鈴、山口桃生、金沢貴憲、飯岡真吾、東頭二郎、渡辺雄太、土肥直貴、近藤啓、石川智久
2. 発表標題 脂肪酸曝露が肝実質細胞由来細胞外小胞の活性型肝星細胞への取り込みに及ぼす影響
3. 学会等名 第43回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下日菜子、山口桃生、刀坂泰史、大岡央、森本達也、石川智久
2. 発表標題 PRMT5欠損マウスにおける肝線維化発症抑制機構の解明
3. 学会等名 静岡実験動物研究会令和4年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下日菜子、山口桃生、刀坂泰史、大岡央、森本達也、石川智久
2. 発表標題 肝星細胞活性化へのPRMT5の関与
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋亮汰、山口桃生、森野純鈴、岡部磨幸、大岡央、石川智久
2. 発表標題 肝線維化ex vivoモデルを用いた抗線維化活性評価系の確立
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大岡央、山口桃生、長澤柚希、山下賢二、本橋南奈実、齊藤真也、濱島義隆、石川智久
2. 発表標題 抗肝線維化作用を有する低分子化合物の標的分子の探索
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大岡央、山口桃生、長澤柚希、本橋南奈実、山下賢二、濱島義隆、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 肝星細胞の分化転換調節薬の構造に基づいた肝線維化治療標的の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡部磨幸、山口桃生、大岡央、森野純鈴、柴田涼吾、金沢貴憲、金子雪子、石川智久
2. 発表標題 肝星細胞の活性化に対する植物由来エキソソーム様ナノ粒子の作用機序
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 山口桃生、大岡央、石川智久
2. 発表標題 構造活性相関をベースとした肝線維化治療標的分子の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大岡 央、山口 桃生、大林 彩、山下 日菜子、本橋 南菜実、金子 雪子、木村 俊秀、齊藤 真也、石川 智久
2. 発表標題 肝線維化責任細胞HSCのコラーゲン産生に対するharmineの作用およびその機序の解析
3. 学会等名 第144回薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本橋 南菜実、大岡 央、山口 桃生、齊藤 真也、石川 智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来化合物DIF-1の肝線維化責任細胞HSCに対する脱活性化作用の解析および肝線維化モデルマウスに対する抗線維化作用の検証
3. 学会等名 第144回薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本橋南菜実、大岡央、山口桃生、齊藤真也、濱島義隆、石川智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来低分子化合物 DIF-1 は肝線維化責任細胞 HSC の活性化を制御し抗線維化作用を示す
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋亮汰、山口桃生、森野純鈴、本橋南菜実、大岡央、石川智久
2. 発表標題 肝障害ex vivoモデルを用いた肝疾患治療薬スクリーニング
3. 学会等名 静岡実験動物研究会 令和2-3年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Ooka, Nanami Motohashi, Momoka Yamaguchi, Sin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 DIF-1, a differentiation-inducing factor from cellular slime mold, regulates transdifferentiation of hepatic stellate cells and ameliorates liver fibrosis
3. 学会等名 The 26th Shizuoka Forum on Health and Longevity
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岡 央、本橋 南奈実、山口 桃生、齊藤 真也、石川 智久
2. 発表標題 肝星細胞の形質転換を制御する低分子化合物DIF-1の肝線維化治療薬としての可能性
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森野 純鈴、山口 桃生、金沢 貴憲、飯岡 真吾、土肥 直貴、近藤 啓、石川 智久
2. 発表標題 肝実質細胞由来エクソソームの物性ならびに肝星細胞への取り込みの評価
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土肥直貴、山口桃生、長谷怜奈、鈴木良輔、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 自律神経による肝臓の血流調節において肝星細胞が責任細胞となる可能性
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土肥直貴、山口桃生、長谷怜奈、鈴木良輔、若林夢人、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 ET-1による静止型肝星細胞の収縮に関わる分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土肥直貴、山口桃生、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 アデノシン関連遺伝子の変化が炎症時において肝星細胞の活性化を促進する可能性
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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	河田 則文  (Kawada Norifumi)  (30271191)	大阪公立大学・大学院医学研究科・教授    (24405)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山口 桃生 (Yamaguchi Momoka)  (30804819)	静岡県立大学・薬学部・助教  (23803)	
研究分担者	濱島 義隆 (Hamashima Yoshitaka)  (40333900)	静岡県立大学・薬学部・教授  (23803)	

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