

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08343

研究課題名（和文）肝線維化進展機序解明を目的としたインテグリン 1 と細胞接着に関する研究

研究課題名（英文）The Role of Integrin-beta1 in Liver Fibrosis Progression

研究代表者

増崎 亮太（MASUZAKI, Ryota）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20866149

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）：インテグリン欠失初代肝細胞とマウス星細胞培養株を用いることで、肝細胞でのインテグリン 1 欠失が星細胞を活性化し、向線維化シグナルの亢進させることを確認した。部分肝切除後、24時間後と72時間後の血清を解析し、欠失による肝障害の発現なく、タンパク合成能にも有意差がないことを確認した。結果をまとめ英文誌に受理された（Am J Pathol 2021, 191:309-319）。Thioacetamide投与による肝線維化マウスでは、インテグリン 1 欠失群で有意に生存率の低下を認めた（ $P=0.043$  by Logrank test）。機序について、RNA解析等を行い解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変の治療については、原因疾患の治療が標準的に行われているが、肝線維化改善薬は未だ認可されていない。肝硬変にいたった肝臓のタンパク合成能を改善させる目的、また門脈圧亢進症を改善させるためにも重要な薬剤である。今回、我々は肝細胞と細胞外マトリックスを接着するインテグリン 1に着目し、肝細胞特異的欠失マウスを作成し、インテグリン欠失が、TGF- $\beta$  の上昇と星細胞の活性化を招くことを証明した。一方、肝硬変患者では、肝内のインテグリン 1発現が亢進することも報告されており、細胞外マトリックスとインテグリン 1のバランスが重要であると示唆された。創薬に向けて、機序を解析中である。

研究成果の概要（英文）：Hepatocyte specific deletion of integrin beta1 induced profibrotic signal in mouse stellate cell culture. Integrin beta 1 is crucial in canalicular formation and is needed to prevent stellate cell activation by modulating TGF- $\beta$ . Taken together, these findings identify integrin b1 as a key molecule of liver architecture with a critical role as a regulator of TGF- $\beta$  activation. These results suggest that disrupting the hepatocyte and extracellular matrix interaction is sufficient to initiate liver fibrosis.

研究分野：肝線維化

キーワード：インテグリン 1 肝線維化 TGF- $\beta$  1

## 1. 研究開始当初の背景

肝硬変は肝発癌の高危険因子であり、本邦では年間 30,175 人が肝癌で、約 17,000 人が肝癌を合併しない肝硬変で亡くなっている(平成 27 年肝がん白書)。本研究では、肝障害後に再生し完全に治癒する病態と、線維化進展を来す病態の分子生物学差異に注目し線維化の機序解明と新規肝線維化治療薬の開発を目標とする。我々は、肝線維化に至るきっかけが肝細胞と細胞外マトリックス (Extracellular Matrix, ECM) の接着の障害にあるのではないかと考え、これまで研究を行ってきた。

肝細胞機能は肝小葉によって維持されている。中心静脈を中心にグリソン鞘が六角形の頂点に配置するような構造を呈している。肝細胞は、グリソン鞘周囲の限界板と呼ばれる区域から中心静脈に向かい 1, 2 細胞の厚さで 20 数個細胞が並んだ肝細胞索を形成している。索と索の間には類洞が存在し、門脈からの血液が中心静脈に向かって流れる。肝細胞は毛細胆管側の頂端面と基底膜側の側底面の細胞極性を有している。基底膜側にあたる類洞膜面はディッセ腔と呼ばれる空間に面しており、星細胞と近接している。その外側に位置する類洞内皮細胞は類洞を形成し、窓構造を持つことで肝細胞と血液の物質交換を可能にしている。肝細胞の頂端面の毛細胆管は、分泌された胆汁を胆管に向かって運搬する。肝硬変が進展すると、活性化星細胞がコラーゲン等の ECM を産生し、それが類洞に沈着し、物質交換を阻害し肝不全をきたし、門脈圧の上昇をきたす。この ECM が、肝障害時からの再生時あるいは発達の段階でどのように調節されているかは、完全には明らかになっていない。

インテグリンは、細胞表面の原形質膜にある細胞接着分子であり、細胞外ドメインは ECM のレセプターとしての細胞-ECM の細胞接着の主役であり、細胞-細胞の接着にも関与する。細胞内ドメインは細胞骨格制御タンパク質や非レセプター型チロシンキナーゼを含むシグナル伝達分子と結合する。インテグリンは、細胞接着、遊走、増殖、分化、ECM の再構築に関わるだけでなく、各種サイトカインのシグナルを調節するなど多様な機能を持つことがわかっている。タンパク質分子としては、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の 2 つのサブユニットからなるヘテロダイマーであり、異なる $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖が多数存在し、多様な組み合わせが可能である。肝臓に存在する発現するすべてのインテグリンは $\beta 1$ 鎖をもっている。肝線維化進展に伴い、 $\beta 1$ インテグリンのタンパク、mRNA 発現が亢進するとの報告があるが、詳細な機序については未だ報告がない。

## 2. 研究の目的

我々はインテグリン $\beta 1$ を肝特異的にノックアウトし、肝再生における関わり、また線維化にどのように関わっているのかについて検討する。この肝臓を分析することで、肝内でのインテグリン $\beta 1$ ノックアウトが肝臓の構築にどのような変化を来すかについて検討する。肝線維化機序を明らかにし、治療方法を開発する。抗インテグリン $\alpha 4\beta 7$ 薬剤は現在炎症性腸疾患に対して保険適応となっているが、肝線維化に対する抗インテグリン薬の効果は明らかではない。我々は ECM と肝細胞の接着は正常肝機能を維持するために必要であり、肝臓の恒常性維持に重要であると考えている。マウスのインテグリン $\beta 1$ を肝特異的にノックアウトし、組織学的変化とシグナル伝達の変化を詳細に検討することで肝線維化に対する新しい治療方法の開発に結びつく可能性がある。

## 3. 研究の方法

インテグリン $\beta 1$ ノックアウトマウスは胎生致死をきたし、肝線維化の研究は困難なため、これまで発表してきたアデノ随伴ウイルスを用いる。これは肝臓で発現する MUP (Major Urinary Protein) をプロモーターとして設計した Cre リコンビナーゼ 8 型アデノ随伴ウイルスであり、尾静脈から約 100 $\mu$ l を静脈投与することで、肝細胞特異的ノックアウトモデルを作製することができる。予備実験の結果、マウスを用いたインテグリン $\beta 1$ 肝特異的欠失マウスでは、部分肝臓切除後あるいは生後 8 週で、肝臓に線維化を認めた。肝細胞索の乱れと、毛細胆管構造の過分枝化、胆管の増生を認め、門脈域、中心静脈域のゾーン形成の乱れも認めた。免疫染色による検討では、平滑筋アクチン (Smooth Muscle Actin, SMA) 染色による星細胞の活性化を認め、ウエスタンブロットによるタンパク質の解析では、形質転換増殖因子 (Transforming Growth Factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ ) の亢進と細胞外シグナル調節キナーゼ (Extracellular Signal-Regulated Kinase, ERK) のリン酸化が強くみられた。これらはすべて既報にある線維化に寄与するシグナルであり、インテグリンをノックアウトすることにより向線維化シグナルが強くなる可能性が示唆された。しかし、これらの予備実験では、Latent form から Active form へ TGF- $\beta 1$  の活性化が何故どのようにしておこったのか、ERK のリン酸化亢進のメカニズムが明らかになっていない。

マウスの星細胞細胞株 JS-1 を用いて、肝細胞でのインテグリン $\beta 1$ 欠失が星細胞に及ぼす影響について検討する。また、マウス部分肝切除後の血清を解析し、肝機能の推移について検討する。次に、肝線維化をきたす thioacetamide を使用し、インテグリン欠失が線維化にきたす影響につ

いて検討する。

#### 4. 研究成果

細胞培養液を用いてマウス星細胞培養株である JS1 細胞を培養したところ、図 1 に示すように collagen 1 $\alpha$ 1 と SMA の mRNA 発現上昇による向線維化シグナルの亢進を認めた。また図 2 に示すように肝機能については、肝切除後、24 時間、72 時間では、欠失型群、野生型群で有意差は認められなかった。これまでの結果をまとめ、投稿し英文誌に受理された (Am J Pathol 2021, 191:309-319)。

次にヴァンダービルト大学医療センターから、インテグリン  $\beta$ 1 の floxed マウスを入手し、飼育を開始した。また、肝細胞特異的欠失マウス作成のために、AAV8-MUP-iCre/eGFP ウイルスを入手し、欠失型と野生型を作成し、thioacetamide 投与による肝線維化マウスを作成した。長期での観察では、欠失群で有意に生存率の低下を認めた (P = 0.043 by Logrank test)。RNA シーケンシングを行い有意な遺伝子発現を解析中である。

図 1. インテグリン欠失初代肝細胞培養液添加星細胞培養における向線維化シグナル発現

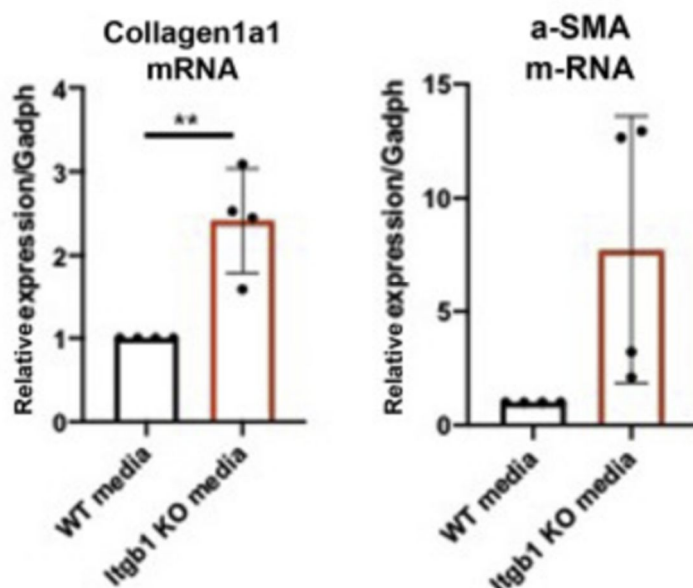
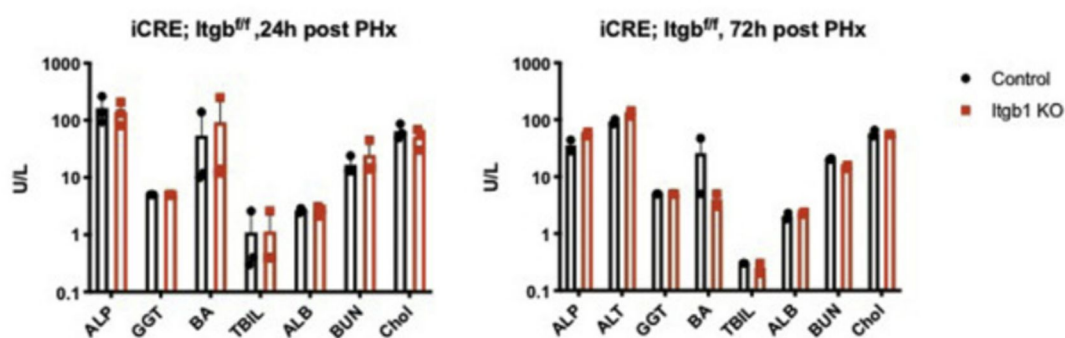


図 2. 肝細胞特異的インテグリン欠失マウスと野生型マウスにおける部分肝切除後の生化学検査の推移



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Masuzaki Ryota, Ray Kevin C., Roland Joseph, Zent Roy, Lee Youngmin A., Karp Seth J.  | 4. 巻<br>191             |
| 2. 論文標題<br>Integrin 1 Establishes Liver Microstructure and Modulates Transforming Growth Factor during Liver Development and Regeneration | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>The American Journal of Pathology   | 6. 最初と最後の頁<br>309 ~ 319 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ajpath.2020.10.011   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Masuzaki Ryota, Kanda Tatsuo, Sasaki Reina, Matsumoto Naoki, Ogawa Masahiro, Matsuoka Shunichi, Karp Seth J., Moriyama Mitsuhiko | 4. 巻<br>21                |
| 2. 論文標題<br>Noninvasive Assessment of Liver Fibrosis: Current and Future Clinical and Molecular Perspectives                                | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>4906 ~ 4906 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms21144906  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

〔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<br>増崎亮太、Seth J. Karp、森山光彦                     |
| 2. 発表標題<br>細胞外マトリックスと肝細胞の接着分子に注目したアルコール性肝線維症の機序解明について |
| 3. 学会等名<br>第56回 日本肝臓学会 ワークショップ                        |
| 4. 発表年<br>2020年                                       |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                     | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)               | 備考 |
|-------|---|-------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 神田 達郎<br><br>(KANDA Tatsuo)<br><br>(20345002) | 日本大学・医学部・准教授<br><br><br><br>(32665) |    |

6. 研究組織（つづき）

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 森山 光彦<br><br>(MORIYAMA Mitsuhiko)<br><br>(50191060) | 日本大学・医学部・教授<br><br><br><br><br>(32665) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |