

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07944

研究課題名(和文) 活性化肝星細胞におけるSOCS3のエピジェネティック抑制とSTAT3の活性化亢進

研究課題名(英文) Epigenetic suppression of SOCS3 and enhanced activation of STAT3 in activated hepatic stellate cells.

研究代表者

中尾 一彦 (Nakao, Kazuhiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00264218

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)：TGF- $\beta$  で活性化した肝星細胞株にIL-6を添加したところJAK2-STAT3シグナルの活性化を認め、SMA発現量、I型コラーゲン産生量も増加した。活性化肝星細胞においては、SOCS3の発現が低下しており、SOCS3によるネガティブフィードバック経路が作動していないことが示唆された。脱メチル化剤の5-aza処理を行うとSOCS3の発現が回復し、IL-6添加によるSOCS3の発現誘導も認めたことから、活性化肝星細胞ではSOCS3遺伝子がエピジェネティックな抑制を受けていることが解った。活性化肝星細胞ではSOCS3遺伝子プロモーター領域にメチル化部位が存在していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、IL-6/JAK2/STAT3に対して抑制的に作用するSOCS3の発現が、TGF- $\beta$  で誘導されるSOCS3遺伝子のメチル化によって持続的に抑制され、STAT3の恒常的活性化が起き、星細胞の持続的活性化が維持されるという仮説の妥当性が示された。よって、線維芽細胞の持続的活性化が生じている強皮症と同じ機序が肝星細胞の活性化でも生じており、SOCS3の発現を調整することで肝星細胞の活性化を制御できることが示唆された。本研究結果は、肝星細胞活性化抑制を介した肝線維化の抑制という、慢性肝疾患の進行防止と治療に向けた研究へ繋がっており、その意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：When IL-6 was added to a hepatic stellate cell line activated with TGF- $\beta$ , JAK2-STAT3 signal activation was observed, and SMA expression and type I collagen production were also increased. In activated hepatic stellate cells, SOCS3 expression was decreased, suggesting that the negative feedback pathway mediated by SOCS3 was not activated. Treatment with the demethylating agent 5-aza restored SOCS3 expression, and addition of IL-6 also induced SOCS3 expression, suggesting that the SOCS3 gene is epigenetically suppressed in activated hepatic stellate cells. It was suggested that methylation sites exist in the SOCS3 gene promoter region in activated hepatic stellate cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝星細胞 TGF- $\beta$  SOCS3 STAT3 DNA methyltransferase

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は生理的状态ではビタミン A 貯蔵細胞として働くが、肝障害時には活性化し myofibroblast 様細胞へ形質転換し細胞外マトリックスを産生し肝線維化を引き起こす。肝星細胞の活性化には TGF- $\beta$ /SMADs、IL-6/JAK2/STAT3 が中心的働きを行う。近年、「強皮症患者では TGF- $\beta$ により皮下線維芽細胞に DNA methyltransferase が誘導されメチル化により SOCS3 の発現が低下し STAT3 の活性化が起きることで、線維芽細胞が持続的に活性化し細胞外マトリックスが過剰に産生され皮膚が硬化する」という論文が発表された J Clin Invest. 2020 May 1;130(5):2347-2363。肝星細胞でも同様の活性化機序が起きているのではないかと推測し本研究を計画した。TGF- $\beta$ により肝星細胞に持続的活性化を誘導後、メチル化による SOCS3 の発現抑制と STAT3 の活性化が起きているか、それを阻止することで肝星細胞の持続的活性化を抑制することが出来るのかを検証する。

### 2. 研究の目的

近年、活性化肝星細胞において、様々な遺伝子にメチル化が起き、遺伝子発現がエピジェネティックに変化していることが明らかとなってきた。本研究では IL-6/JAK2/STAT3 に対して抑制的に作用する SOCS3 の発現が、TGF- $\beta$ /SMADs によって誘導される SOCS3 遺伝子のメチル化によって持続的に抑制されることで STAT3 の恒常的活性化が起き肝星細胞の活性化が維持されるのではないかとという仮説を検証することを目的としている。線維芽細胞の持続的活性化が生じている強皮症の研究成果を肝星細胞の活性化に応用する研究ではあるが、SOCS3 の発現を調整することで肝星細胞の活性化を制御できることが示されれば、肝星細胞活性化抑制を介した肝線維化の抑制という、全ての慢性肝疾患の進行防止並びに治療に向けた研究へに繋がり、その意義は大きい。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト肝星細胞株である LX2 細胞並びに HHSteCs 細胞を TGF- $\beta$  存在下で 2 継代以上培養することで活性化 (myofibroblast 様形質転換) を誘導・維持し、 $\alpha$ SMA の発現、I 型コラーゲン産生を確認する。さらに、JAK2-STAT3 シグナルも肝星細胞の活性化に関与していることから、リガンドである IL-6 が肝星細胞の活性化に TGF- $\beta$  と相加的ないし相乗的に作用しうるか  $\alpha$ SMA 発現量、I 型コラーゲン産生量を指標に検討する。

(2) TGF- $\beta$  によって 2 継代以上活性化が維持された肝星細胞における SOCS3 の発現量を RT-PCR, western blot により活性化前と比較する。活性化肝星細胞において SOCS3 の発現低下を認めた場合、メチル化によるエピジェネティックな抑制を明らかにするため、脱メチル化剤の 5-aza 処理を行うことで SOCS3 の発現が回復するかを検討する。5-aza 処理により SOCS3 の発現が回復した場合は、methylation-specific PCR、MeDIP assay を用いて活性化前後の SOCS3 遺伝子プロモーター領域のメチル化を解析する。メチル化が確認された場合は、活性化前後の DNA methyltransferase (DNMT1,3A,3B) の発現変化を RT-PCR 並びに western blot により確認する。

(3) 活性化肝星細胞において、JAK2-STAT3 シグナルを負に制御する SOCS3 の発現が抑制されることで、STAT3 の恒常的な活性化が惹起されると予想される。よって、JAK2、STAT3 のリン酸化の程度、STAT3 下流遺伝子発現量について western blot、RT-PCR により解析する。

IL-6 添加に対する JAK2-STAT3 シグナルの反応亢進の有無についても同様に検討する。TGF- $\beta$  ± IL-6 により活性化する肝星細胞に対して a) 5-aza 処理、b) DNA methyltransferase (DNMT1、DNMT3A, 3B) の siRNA 導入、c) プラスミド発現ベクターによる SOCS3 の強制発現により、肝星細胞の myofibroblast 様形態転換が抑制され非活性化状態に戻り、 $\alpha$ SMA の発現低下、I 型コラーゲン産生低下が惹起されるかを検討する。

#### 4 . 研究成果

ヒト肝星細胞株である LX2 細胞並びに HHSteCs 細胞を TGF- 存在下で 2 継代以上培養することで両細胞に活性化 (myofibroblast 様形質転換) が誘導され、それが維持された。加えて、SMA の発現、I 型コラーゲン産生が確認された。JAK2-STAT3 シグナルが肝星細胞の活性化に関与していることから、リガンドである IL-6 が肝星細胞の活性化に TGF- と相加もしくは相乗的に作用しうるかを検討するため、TGF- で活性化誘導した肝星細胞株に IL-6 を添加したところ、IL-6 濃度依存的に JAK2-STAT3 シグナルの活性化が確認され、SMA 発現量、I 型コラーゲン産生量も増加することが確認された。

一方、TGF- によって活性化が維持された肝星細胞における SOCS3 の発現量を活性化前と比較したところ、活性化肝星細胞において SOCS3 の発現低下が認められた。加えて、IL-6 添加による SOCS3 の発現量変化も検討したところ、SOCS3 の発現誘導は認めず、JAK2-STAT3 シグナルに対するネガティブフィードバック経路が作動していないことが示唆された。そこで、SOCS3 の発現低下ならびにフィードバック不応が、メチル化によるエピジェネティックな抑制であるかについて、以下の検討を行った。

メチル化によるエピジェネティックな抑制を明らかにするため、脱メチル化剤の 5-aza 処理を行うことで SOCS3 の発現が回復するか否かを検討したところ、発現の回復と IL-6 添加による発現誘導が認められた。同時に SMA 発現量、I 型コラーゲン産生量の低下が認められた。次に、活性化前後の SOCS3 遺伝子プロモーター領域のメチル化解析により、メチル化部位の存在が示唆された。加えて、JAK2-STAT3 シグナルの活性化により、DNA methyltransferase の発現上昇を認めた。

現在、DNA methyltransferase (DNMT1、DNMT3A, 3B) の siRNA 導入、並びにプラスミド発現ベクターによる SOCS3 の強制発現により、肝星細胞の myofibroblast 様形態転換が抑制され非活性化状態に戻り、 $\alpha$ SMA の発現低下、I 型コラーゲン産生低下が惹起されるかを検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	宮明 寿光  (Miyaaki Hisamitsu)  (20437891)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授   (17301)	
研究分担者	三馬 聡  (Miuma Satoshi)  (30437892)	長崎大学・病院(医学系)・講師   (17301)	

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