

令和元年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06749

研究課題名(和文) 肝硬変における細胞外基質の変化が肝細胞機能へ与える影響の解析と治療法の探索

研究課題名(英文) Effect of extracellular matrix on hepatocyte function in liver cirrhosis

研究代表者

小木曾 聡(Ogiso, Satoshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10804734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：線維化肝由来細胞外器質で培養された肝細胞は、肝細胞特異的蛋白の発現が低下しており、Snail1やVimentinの遺伝子発現が増強するとともに、インテグリン 1の発現亢進とリン酸化FAKの増加が確認された。この細胞にFAK阻害剤を投与すると、Snail1の発現が濃度依存的に抑制されるとともにHNF4aの発現が増加した。肝線維化の進行とともに細胞外基質からのインテグリン FAKシグナルが活性化し肝細胞機能を低下させること、その機序に上皮間葉転換の誘導の関与が示唆され、インテグリン FAKシグナルの抑制が肝線維化による肝細胞の肝機能を改善するための治療選択肢となりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肝疾患の進行に伴って肝に線維化が起こり肝硬変に至ると、その根本的治療は困難です。本研究では、この肝の線維化に伴う細胞外基質の変化が、そこに生着する肝細胞機能へシグナルを送り上皮間葉転換という変化を通して肝細胞機能を低下させていることを明らかにしました。また、そのインテグリン FAKシグナル・シグナルを薬剤でブロックすることにより肝細胞機能の回復することが確認され、治療手段の限られる肝硬変の新たな治療選択肢となりうる可能性が示されました。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte decreased hepatocytic protein synthesis and gene expression, when cultivated within the extracellular matrix derived from fibrotic liver. Hepatocyte also increased EMT-associated gene expressions of Snail1 and Vimentin, gene expression of integrin 1, and phosphorylated FAK protein. After treated with the FAK inhibitor, hepatocyte decreased gene expression of Snail1 and increased gene expression of HNF4a. The outcomes demonstrate that liver fibrosis activates integrin-FAK signal between extracellular matrix and hepatocytes to impair hepatocytic function, possibly through inducing EMT. Furthermore, FAK inhibitor is a candidate of drugs to recover liver function impaired by liver fibrosis.

研究分野：肝臓外科

キーワード：脱細胞化 線維化 肝硬変 肝細胞 細胞外基質 上皮間葉転換 インテグリン FAK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎、脂肪性肝炎、原発性硬化性胆管炎、といった様々な肝臓病は、その経過の中で肝に線維化を起こし、進行した場合には肝臓が硬くなり肝機能が廃絶した『肝硬変』と呼ばれる治療困難な状態に至る。近年、肝硬変における細胞外基質の影響が注目されており、機能障害に至った肝細胞そのものだけでなく、線維化により変性した細胞外基質や、細胞外基質と細胞とのシグナル伝達をターゲットとした治療戦略が考えられている。肝硬変における細胞外器質と肝細胞機能との関係を検証した研究としては、肝細胞培養の足場の硬さが肝細胞機能にネガティブに作用する (Desai SS, Tung JC, Zhou VX, et al. 'Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha'. *Hepatology*. 2016;64:261-75) ことが報告されている。しかしながら、実際の肝硬変においては、構造タンパク質の組成の変化や蓄えられる種々のシグナル分子の構成と量の変化など、細胞外器質における複合的な変化が起きている。このような生体内の複雑な病態を模倣することのできる実験モデルはこれまで確立されておらず、生体における肝硬変に伴う細胞外器質の変化が肝細胞に及ぼす影響を評価することは困難であった。

2. 研究の目的

肝硬変において、変性した細胞外器質が肝細胞へ与える影響を調べることにより、肝硬変における肝不全の病態の一端を明らかにし、その機序解明を通して非代償性肝硬変の肝機能改善のための治療法を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

ラットに CCL4 を投与して肝臓に線維化を誘導した後に、採取した肝臓の血管より薬剤を還流させて細胞成分を除去し、細胞が生着・生存するための足場となる細胞外器質のみを得る (脱細胞化)。得られた脱細胞化肝臓組織に、ラット初代肝細胞を経胆管的に注入・生着させ、細断した上で、培養皿上で三次元培養を行う (Miyachi Y, Yasuchika K, Ogiso S, et al. A novel three-dimensional culture system maintaining the physiological extracellular matrix of cirrhotic livers accelerates the progression of hepatocellular carcinoma. in submission)。正常肝由来の脱細胞化肝臓組織で培養した肝細胞と、蛋白分泌や遺伝子発現を比較し、線維化肝由来の細胞外器質が肝細胞にどのような影響を及ぼすのかを検討する。

4. 研究成果

線維化肝由来脱細胞化組織で培養を行ったものは、正常化肝由来脱細胞化組織で培養したものと比較して遜色ない高い生着率と生存率が得られた。いっぽう、肝特異的蛋白であるアルブミン、CYP3A1、HNF4a の遺伝子発現は線維化肝由来脱細胞化組織で培養されたもので有意に低く (Fig. 1)、アルブミンおよび尿素の合成量も有意に少なかった。また、線維化肝由来脱細胞化組織で培養されたものでは、Snai11 や Vimentin の遺伝子発現が増強しており (Fig. 2) 上皮間葉転換様の変化の存在が示唆された。さらに、線維化肝由来脱細胞化組織ではインテグリン 1 の蛋白および遺伝子発現が亢進するとともにリン酸化 FAK が増えており (Fig. 3) インテ

グリン-FAK シグナルの活性化が確認された。FKA 阻害剤によるインテグリン-FAK シグナルの抑制実験を行ったところ、正常化肝由来脱細胞化組織で培養されたものでは HNF4a の発現が低下するのに対し、脱細胞化肝由来脱細胞化組織で培養されたものでは Snai11 の発現が濃度依存的に抑制されるとともに HNF4a の発現が増加した (Fig. 4)。肝線維化の進行とともに細胞外基質からのインテグリン FAK シグナルが活性化し肝細胞機能を低下させること、その機序に上皮間葉転換の誘導の関与が示唆されること、インテグリン FAK シグナルの抑制が肝線維化による肝細胞の上皮間葉転換様変化を抑制し肝機能を改善するための治療選択肢の一つとなることが示された。

Fig. 1

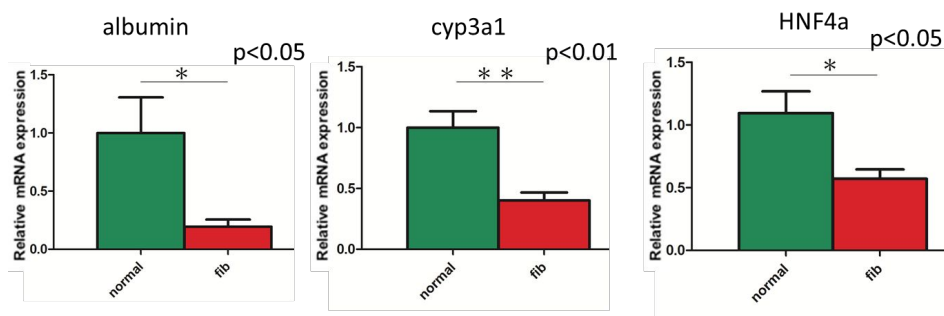


Fig. 2

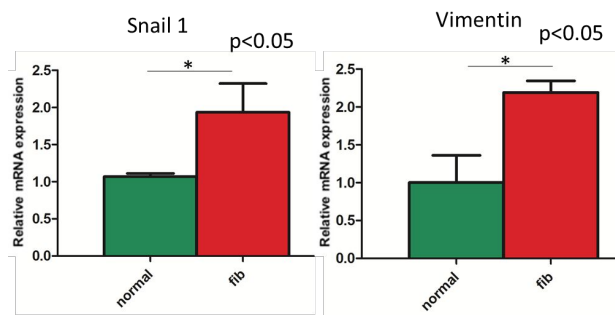


Fig. 3

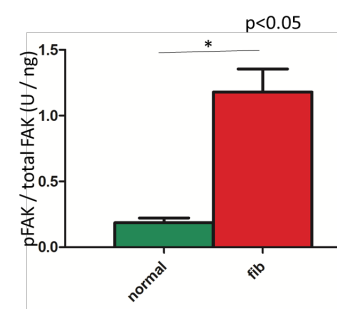
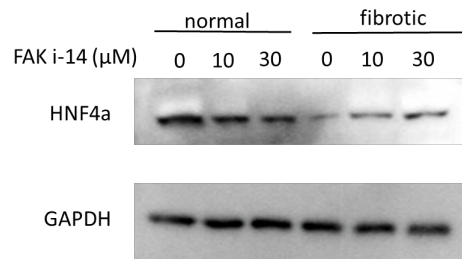


Fig. 4



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

宮内 雄也、他 . 細胞外基質による微小環境は肝細胞癌の不均一性に寄与する。第 54 回肝癌研究会 2018 年

Yuya Miyachi . A novel culture system preserving natural scaffolds of fibrotic livers accelerates progression of hepatocellular carcinoma cells. APASL Single Topic Conference 2018 on HCC, 2018

宮内 雄也、他 . 肝硬変細胞外基質は Integrin-FAK 経路を介してラット初代肝細胞の肝機能低下を誘導する。第 55 回 日本肝臓学会総会 2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。