

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07000

研究課題名(和文)肝星細胞の形質転換復帰を標的とするNASH治療を指向した細胞内シグナル伝達研究

研究課題名(英文)Pharmacological study of intracellular signaling pathways involved in hepatic stellate cell reversion for treatment of NASH

研究代表者

山口 桃生(Yamaguchi, Momoka)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：30804819

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)：肝線維化の有効な治療法は、いまだに見出されていない。肝星細胞(HSC)は、肝障害時に活性化し、コラーゲンを産生・分泌するようになる(活性型HSC)ため、肝線維化の責任細胞と考えられている。対照的に、静止型HSCはMMPを産生・分泌し、コラーゲンを分解することから、活性型HSCを静止型に脱活性化させることができれば、肝線維化も治療可能であると考えられる。本研究において、カフェインが、一度活性化した活性型HSCを静止型に脱活性化させること、その作用の一部にアデノシン受容体阻害作用が関与することを明らかにした。本研究成果により、有効な肝線維化治療法の開発に繋がることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化の責任細胞ということから肝星細胞に関する報告は数多くあるものの、本研究で示したような一度活性化した活性型HSCを静止型HSCに脱活性化させるという報告は少なく、その機構は殆ど分かっていない。すなわち、本研究で示したHSC脱活性化機構の解明は、学術的新規性が高い。さらに、そのシグナル伝達の解明は未だ有効な治療方法が存在しないNASH治療薬の開発に繋がることが期待でき、臨床的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：During liver injury, quiescent hepatic stellate cells (qHSCs) are transdifferentiated into myofibroblast-like activated HSCs (aHSCs), which produce collagen, a major source of liver fibrosis. Therefore, the reversion of aHSC is regarded as a therapeutic target for liver fibrosis. In this study, caffeine (0.1-10 mM) significantly decreased the expression of  $\alpha$ -SMA and COL1a1, are markers of aHSC, in a concentration-dependent manner. Further, caffeine significantly increased of the expression of MMP-9 which is a marker of qHSC. CGS-15943, a subtype-nonspecific adenosine receptor inhibitor, significantly decreased the expression  $\alpha$ -SMA, but had no significant effect on the expression of COL1a1 and MMP-9. These results suggest that caffeine causes the reversion of aHSC and a part of the mechanism of the aHSC reversion is mediated by inhibiting adenosine receptors. We propose that these results lead to effective therapeutic strategies for preventing liver fibrosis.

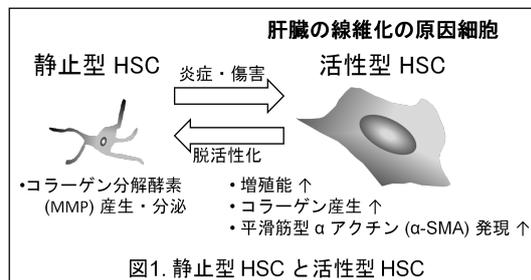
研究分野：肝臓の線維化

キーワード：肝星細胞 肝線維化 脱活性化 形質転換

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-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、いまだに見出されていない。肝線維化には、肝非実質細胞の一つである肝星細胞 (Hepatic stellate cell: HSC) の活性化が重要な役割を担っている。HSC は肝障害時に活性化されて筋線維芽細胞様の活性型 HSC に形質転換し、コラーゲンを産生・分泌するようになる。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。対照的に、静止型 HSC は matrix metalloproteinase (MMP) を産生・分泌し、コラーゲンなどの細胞外基質を分解する活性を有する (図1)。



炎症時には、HSC が活性化され線維化が進む。静止型 HSC は MMP を産生・分泌することから、活性型 HSC を静止型に復帰させることができれば、肝線維化の回復に繋がることが期待できる。実際、マウス *in vivo* での細胞追跡実験では、肝炎の自然治癒に伴い活性型 HSC から静止型への復帰が認められており<sup>(1)</sup>、生体内で HSC の脱活性化が起こりうることを示された。また、初代培養 HSC を類洞内皮細胞と共培養すると脱活性化すること<sup>(2)</sup>や活性型 HSC をマトリゲル中で三次元培養すると脱活性化すること<sup>(3)</sup>などが報告されている。しかし、*in vivo* や初代培養系で活性型 HSC の脱活性化を検証した報告は僅かであり、詳細な分子メカニズムは未解明である。申請者らは最近、高濃度 caffeine が活性型 HSC を静止型 HSC 様の形態に変化させるという大変興味深い結果を得た。そこで、caffeine 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なのではと考えた。

### 2. 研究の目的

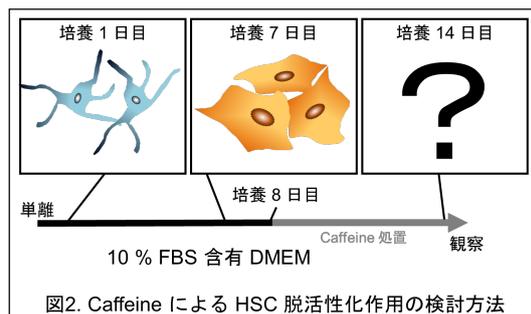
本研究では、caffeine をツールとして用いることにより、活性型 HSC の脱活性化機構を解明し、NASH 治療薬の創出に繋がる標的分子の同定を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

HSC 脱活性化のシグナル伝達を解明することで、肝線維化回復の鍵となる標的分子を見出し、NASH 治療薬の創出に向けた科学的根拠を提供することを目指して、以下の検討を行った。

#### A) Caffeine による HSC 脱活性化作用の検討：

高濃度 (10 mM) caffeine が活性型 HSC を静止型 HSC 様の形態に変化させることは確認できているが、どの程度、静止型へ脱活性化できているのか不明であった。そこで、ddY 雄性マウスより単離した HSC を用いて、caffeine による HSC 脱活性化作用を種々の指標を用いて検討した。静止型として単離された HSC は、プラスチックプレートにて、ウシ胎児血清 (FBS) 含有培地で 7 日間培養すると活性化 (自然活性化) する。培養 8 日目より caffeine を処置し、一度活性化した活性型 HSC に対する caffeine の作用を検討した (図2)。



**B) HSC 脱活性化のシグナル伝達の解明：** Caffeine が活性型 HSC を脱活性化させるという申請者らの得た知見を基に、その作用機序を調べることにより、HSC 脱活性化を導くシグナル伝達を解明した。既に caffeine の HSC 活性化抑制作用への関与が示唆された、アデノシン受容体、Akt1 を中心として、シグナル分子の解析を行った。

### 4. 研究成果

**A) Caffeine による HSC 脱活性化作用の検討：** 高濃度 caffeine による形態変化でしか確認できていなかった脱活性化作用を種々の指標を用いて検討した。

- (1) 活性型の指標である平滑筋型  $\alpha$  アクチン ( $\alpha$ -SMA) の免疫染色による形態を観察したところ、caffeine (0.1–10 mM) は、濃度依存的に活性型 HSC を静止型 HSC 様に形態変化させた (図 3-A)。さらに、western blotting 法にて  $\alpha$ -SMA のタンパク質発現を確認したところ、caffeine (10 mM) により有意に減少することが示された (図 3-B)。また caffeine (0.1–10 mM) は、濃度依存的に活性型の指標である I 型コラーゲン (COL1a1) のタンパク質の発現量を有意に減少させ、静止型の指標である MMP-9 のタンパク質の発現量を有意に増加させた (図 3-C)。

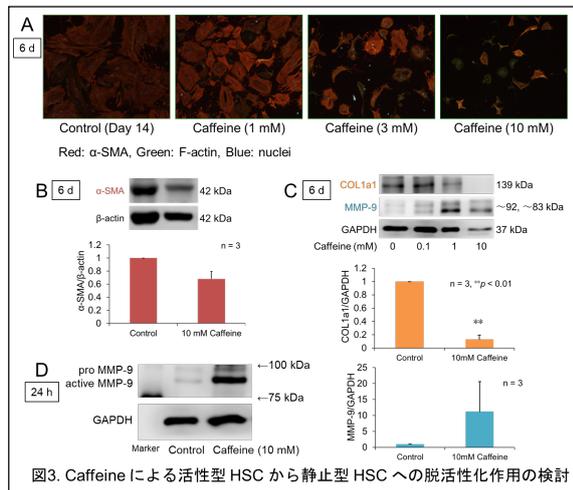


図3. Caffeine による活性型 HSC から静止型 HSC への脱活性化作用の検討

興味深いことに、活性型 HSC に caffeine (10 mM) を 24 時間処置することで MMP-9 の発現と活性が増大することが示された (図 3-D)。さらに、caffeine (10 mM) は、静止型に特徴的な vitaminA を貯蔵する油滴の発現を回復させることを Oil Red O 染色にて確認した。以上のことから、caffeine は活性型 HSC を静止型 HSC へ脱活性化させることが示され、さらに MMP-9 の活性にも影響を与えることが示唆された。

### B) HSC 脱活性化のシグナル伝達の解明

- (2) 既に caffeine の HSC 活性化抑制作用への関与が示唆されているアデノシン受容体拮抗作用を考慮し、caffeine と同様にアデノシン受容体を阻害する CGS-15943 (1  $\mu$ M) を活性型 HSC に処置したところ、 $\alpha$ -SMA 陽性面積は減少傾向を示し (図 4-A)、 $\alpha$ -SMA のタンパク質発現量を有意に減少させた (図 4-B)。しかしながら、COL1a1 と MMP-9 のタンパク質発現量に変化はなかった (図 4-C)。以上のことから、HSC の脱活性化に伴う  $\alpha$ -SMA のタンパク質発現減少作用に関しては、アデノシン受容体阻害作用を介する可能性が示された。しかしながら、COL1a1 と MMP-9 のタンパク質発現に関しては、アデノシン受容体阻害作用を介さないことが示された。

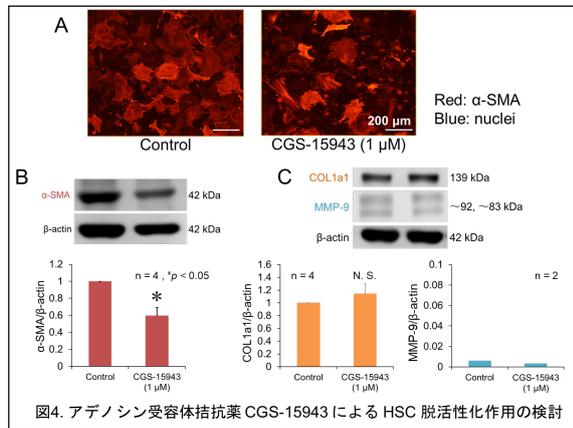


図4. アデノシン受容体拮抗薬 CGS-15943 による HSC 脱活性化作用の検討

- (3) Caffeine のアデノシン受容体拮抗による HSC 脱活性化作用の機序として、Akt の活性化を検討した。いくつかの G タンパク質共役型受容体には、Akt を活性化させる経路が存在し、細胞増殖や生存に関わることが知られている<sup>(4)</sup>。近年、アデノシンによる Akt 経路の活性化に関する報告も以下に記すようにいくつかある。膠芽腫幹細胞において、アデノシン A<sub>2B</sub> 受容体を介して Akt が活性化されること<sup>(5)</sup>、また黒色腫細胞において、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体を介して Akt が活性化されることが報告されている<sup>(6)</sup>。申請者らが以前行った研究において、caffeine の HSC 活性化抑制作用へ Akt1 の関与が示唆されたことから、培養 8 日目の aHSC に対して caffeine を 24 時間処置し、タンパク質を回収して western blotting にて Akt1 のリン酸化を検討した。その結果、10 mM caffeine 処置により、Akt1 のリン酸化は有意な減少が認められた (図 5-A)。同様にアデノシン受容体拮抗薬である CGS-15943 の作用を調べた。その結果、caffeine 処置時とは異なり、CGS-15943 処置により、Akt1 のリン酸化には有意な変化は認められなかった (図 5-B)。

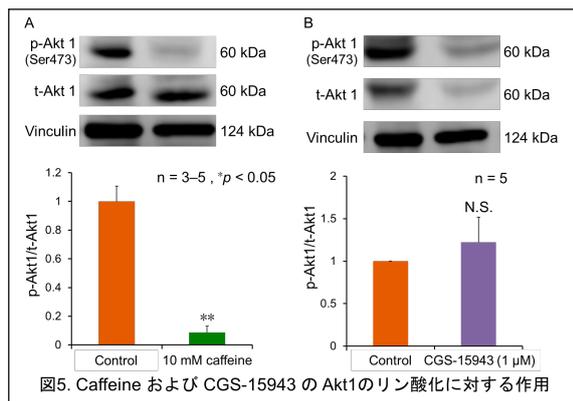


図5. Caffeine および CGS-15943 の Akt1 のリン酸化に対する作用

以上ことから、caffeine は活性型 HSC を静止型 HSC へ脱活性化させることが示され、その作用の一部は、アデノシン受容体阻害作用を介することが示唆された。

<引用文献>

- (1) Kisseleva T et al, Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 9448–53.
- (2) Deleve LD et al, Sinusoidal endothelial cells prevent rat stellate cell activation and promote reversion to quiescence. *Hepatology* 2008; 48: 920–30.
- (3) Sohara N et al, Reversal of activation of human myofibroblast-like cells by culture on a basement membrane-like substrate. *J Hepatol* 2002; 37: 214–21.
- (4) New DC, Wu K, Kwok AWS, Wong YH. G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J.*2007; 274: 6025–6036.
- (5) Liu T, Wang X, Bai Y, Liao H, Qiu S, Yang Y, Yan X-H, Chen J, Guo H, Zhang S. The HIF-2alpha dependent induction of PAP and adenosine synthesis regulates glioblastoma stem cell function through the A2B adenosine receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*2014; 49: 8–16.
- (6) Madi L, Rosenberg-Haggen B, Nyska A, Korenstein R. Enhancing pigmentation via activation of A3 adenosine receptors in B16 melanoma cells and in human skin explants. *Exp. Dermatol.*2013; 22: 74–77.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 10 件)

- ① **Momoka Yamaguchi**, Tomoya Morishita, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa. : Inhibition of HSC activation via antagonism of adenosine receptors stimulating Akt1 pathway with caffeine, The 9<sup>th</sup> Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (FAOPS2019) (Kobe), 1P-468, 2019年3月29日
- ② Tomoya Morishita, **Momoka Yamaguchi**, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa : Caffeine caused the reversion of activated hepatic stellate cells in a concentration-dependent manner.、第92回日本薬理学会年会 (大阪)、3-P-118、要旨集 p.337、2019年3月16日
- ③ Akira Ooka, Shohei Furukawa, **Momoka Yamaguchi**, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa : The possibility of DIF-1 as a therapeutic agent for liver fibrosis, International Exchange Seminar 2019 between Univ Shizuoka & UC Davis (Osaka)、2019年3月15日
- ④ Naoki Dohi, Kyosuke Iwami, **Momoka Yamaguchi**, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa : Hepatic stellate cells contract in response to noradrenaline, The 4<sup>th</sup> International Conference on Pharma and Food (ICPF2018) (Shizuoka)、Poster-46, Program and Abstracts p.142, 2018年11月15日
- ⑤ 森下智也、**山口桃生**、齊藤真也、石川智久：カフェインはAkt1のリン酸化を介して活性化型肝星細胞の復帰変異を引き起こす、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 2018 (静岡)、要旨集 p.143、2018年11月4日
- ⑥ **山口桃生**、森下智也、齊藤真也、石川智久：カフェインによる肝星細胞の活性化・脱活性化制御を介した肝線維化改善の可能性、生理学研究所研究会 2018 (岡崎)、要旨集 p.12、2018年11月1–2日
- ⑦ **山口桃生**、森下智也、齊藤真也、石川智久：Caffeine はアデノシン受容体を阻害し、cAMP や ERK1/2 非依存的にリン酸化 Akt1 の減少を介して肝星細胞の活性化を抑制する、第25回肝細胞研究会 (東京)、P5-4、要旨集 p.67、2018年7月13日
- ⑧ **Momoka Yamaguchi**, Tomoya Morishita, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa. : Caffeine suppresses the activation of hepatic stellate cells Akt1 is a key molecule for caffeine-induced inhibition of hepatic stellate cell activation, 18<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (Kyoto)、OR17-5, 2018年7月4日 (査読あり)
- ⑨ **Momoka Yamaguchi**, Tomoya Morishita, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa : Suppression of hepatic stellate cell activation through antagonism of adenosine receptors with caffeine, The Biophysical Society 62<sup>nd</sup> Annual Meeting (BPS18) (San Francisco)、L3474-Pos, 要旨集 p.5、2018年2月18日
- ⑩ 鈴木良輔、若林夢人、西山良太、**山口桃生**、齊藤真也、石川智久：静止型肝星細胞における ET-1 誘発性収縮の発生機序第27回日本循環薬理学会 (愛知)、要旨集 p.45、2017年12月1日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：森下 智也

ローマ字氏名：Tomoya Morishita

※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。