

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15561

研究課題名(和文)メカノトランスダクションを介した肝星細胞活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of activation mechanism of hepatic stellate cells through mechano-transduction

研究代表者

宇留島 隼人(Urushima, Hayato)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90755745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は正常肝において、間葉系細胞の一つである肝星細胞が主に上皮系細胞に発現するEカドヘリンを発現し、このEカドヘリンを介して肝細胞と接着結合することでメカノトランスダクションが生じ肝星細胞の活性化が抑制されていることを発見した。また肝障害時にはこの接着結合を喪失することで周囲に産生されたTGF- β への感受性が上がり肝星細胞活性化の一翼を担うことを明らかにした。

また肝硬変時には低ナトリウム血症が生じ類洞は低浸透圧環境となる。この低浸透圧が浸透圧受容体を介してメカノトランスダクションを生じさせ肝星細胞や肝がん細胞のアポトーシスを抑制し肝がん細胞増殖に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝星細胞は肝障害時に産生されたTGF- β などの刺激因子によって活性化しコラーゲンを産生し創傷治癒に働くが、慢性肝疾患時の持続的活性化は肝線維化、さらには肝硬変を引き起こす。そのため肝星細胞の活性抑制を目的とした研究が数多く行われてきたが未だ有効な薬剤は開発されていない。今回の我々の研究は刺激因子に依らない新規の肝星細胞メカニズムを明らかにした。今回の発見は有効な肝星細胞活性化抑制剤研究の礎となる可能性がある。

また肝硬変時の低ナトリウム血症を積極的に改善することで肝発がんの重要なリスクファクターである肝硬変患者の肝がん発生リスクを減少させる可能性があると考えられる

研究成果の概要(英文)：In normal liver, hepatic stellate cells, one of the mesenchymal cells, express E-cadherin, which is mainly expressed in epithelial cells, and mechanotransduction occurs by adherens to hepatocytes via this E-cadherin, leading to the suppression of hepatic stellate cells activation. In liver injury, the loss of this adherens junction increases the sensitivity to TGF- β produced in the surroundings, which play a role of hepatic stellate cells activation.

In cirrhotic stage, hyponatremia-induced hypo-osmotic condition induce apoptosis resistance of hepatic stellate cells and hepatocellular carcinoma cells through mechano-receptor.

Therefore, our study revealed that mechanotransduction regulate both the physiology and pathology of hepatic stellate cells and hepatocellular carcinoma cells.

研究分野：解剖・病態生理学

キーワード：メカノトランスダクション 肝星細胞 接着結合 肝がん細胞 浸透圧

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は肝臓における細胞数で5～8%を占める細胞で、正常肝においては静止型として存在し、貯蔵しているビタミンAを血中濃度に応じて循環血液中に運搬するという機能を持つ。しかし、肝障害時においては、肝星細胞周囲に存在する Kupffer 細胞などから分泌された Transforming growth factor- β (TGF- β) や macrophage chemotactic protein-1(MCP-1)といったサイトカイン・ケモカインなどの**化学的刺激**によって活性化され形態を劇的に変化させて、性質の異なる筋線維芽様細胞(活性化肝星細胞)へと形質転換する。**活性化肝星細胞はコラーゲンなどの細胞外基質を産生し肝線維化の進展に關与する。**

これまでは肝星細胞の活性化に關与する化学的メディエーターおよびそのシグナル関連タンパクなどを対象とした様々な肝線維化改善薬の開発研究が行われてきた。しかし残念なことに未だ、肝線維化および、その終末像である肝硬変に対する優れた治療薬は存在しない。

近年、細胞に対する細胞外基質との接着による細胞伸展、浸透圧、ずり応力、重力、圧縮などの**機械的刺激を機械刺激受容体(メカノセンサー)がイオンチャネルの開閉などの生化学的出力へと変換させ、細胞内にシグナルとして伝達するメカノトランスダクションという機構**の存在が明らかとなり、肝星細胞活性化においても新たなシグナル伝達機構として注目されている。

2. 研究の目的

肝星細胞の活性化は可逆的な反応であり、活性化された肝星細胞を**静止期に「戻す」(脱活性化)**ことが肝線維化進展抑制に重要である。メカノトランスダクションを介した新規肝星細胞活性化経路の同定が、肝線維化治療薬開発に繋がることが期待できる。そこで本研究では**「肝星細胞の機械的刺激による活性化メカニズムを詳細に解析し、活性化肝星細胞を静止期へと形質転換させる新規創薬ターゲットを探索すること」**を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝病態時に生じる肝星細胞に対する機械的刺激の探索

マウスあるいはラットに四塩化炭素を投与し肝線維化を誘導する。組織形態学的から肝星細胞に加えられていることが推測される機械的刺激を探索する。

(2) 機械的刺激を介した肝星細胞活性化メカニズムの分子生物学的解析

方法(1)にて推定された機械的刺激を in vitro で再現し、肝星細胞活性化におけるメカノトランスダクションの寄与を分子生物学的に解明する。同定されたメカノトランスダクション関連分子のヒト硬変肝臨床検体における発現動態も解析する。

(3) メカノトランスダクション阻害を介した肝星細胞活性化抑制分子の探索

解明された肝星細胞活性化メカノトランスダクション経路を阻害する化合物を探索する。同定された候補分子を線維化モデルマウスに投与し、その効果を確認する。

4. 研究成果

本申請期間中に2つの肝病態関連メカノトランスダクションを同定した。以下にそれぞれを分けて記載する。

(1) 肝星細胞 肝細胞間接着とメカノトランスダクション

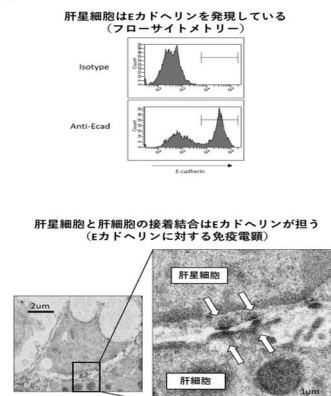
我々は電子顕微鏡による観察によって、正常肝においては肝星細胞が肝細胞と接着してい

るが、四塩化炭素投与による肝障害時の極めて早い段階でその接着が消失し、その後コラーゲン産生などの活性型肝星細胞となることを発見した。細胞接着は重要な機械的刺激であるため、この接着の有無が肝星細胞の活性化を制御しているのではないかと考えその検証を行った。

接着結合を担う分子の同定

一般的に接着結合の接着分子はカドヘリンが担う。カドヘリンは数種類存在し主に上皮細胞に発現している E カドヘリンや間葉系細胞に発現する N カドヘリンが知られているが同種同士のカドヘリンのみが結合する (E カドヘリンは E カドヘリンとのみ結合する)。肝星細胞は活性化すると筋線維芽細胞に形質転換することから間葉系細胞の 1 種であると考えられている。これまでに非活性化肝星細胞には E カドヘリンが発現し、活性化と共に N カドヘリンへと発現が変化することが示唆されていたが電子顕微鏡レベルでの詳細な解析は行われていなかった。我々は E カドヘリンの免疫染色を行った肝臓試料を電子顕微鏡で詳細に観察した結果、肝星細胞と肝細胞間の接着結合部位の両細胞に E カドヘリン陽性反応を認め、初めてこの接着結合を E カドヘリンが担っていることを明らかにした (図 1)。

図 1

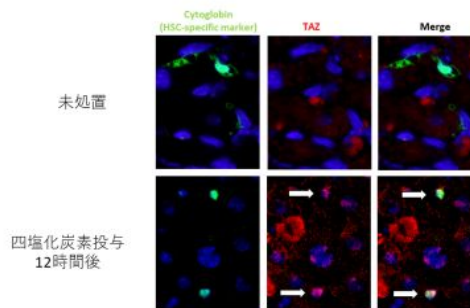


E カドヘリンを介した接着結合と肝星細胞活性化制御

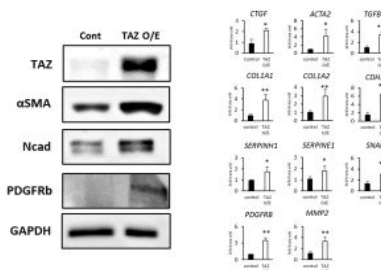
次に E カドヘリンを介した肝細胞との接着結合消失がどのようなメカニズムで肝星細胞活性化に働くのかを検証した。上皮系細胞において細胞接着によって細胞の増殖・分化が制御されるメカニズムとして contact inhibition という現象がよく知られている。E カドヘリン同士が接着すると核内で転写因子として働いていた YAP/TAZ がリン酸化され細胞質内に移行し分解されることが contact inhibition メカニズムの一つである。四塩化炭素投与 12 時間後あるいは未処置のマウスから肝星細胞を単離しウエスタンブロットによって YAP/TAZ の発現を解析したところ、四塩化炭素投与マウス由来肝星細胞で YAP/TAZ、特に TAZ の発現が未処置マウス由来肝星細胞に比べ亢進し、活性化星細胞関連分子の発現も上昇していた。また蛍光免疫染色による観察では、未処置マウス肝においては肝星細胞に TAZ が発現していないが、四塩化炭素投与によって TAZ が核内に発現し転写因子として働いていることを示唆する像が得られた。また、ヒト肝星細胞株 HStEC 細胞にプラスミドを用いて TAZ を強制発現したところ活性化星細胞関連分子の発現が増強し、TAZ が肝星細胞活性化を直接制御していることが明らかとなった (図 2)。

図 2

四塩化炭素投与によって傷害を受けた肝臓では肝星細胞 (Cytoglobin 陽性細胞) の核内に TAZ が発現してくる



TAZ の強制発現によって肝星細胞の活性化マーカー発現が増加した



我々の仮説通り E カドヘリンを介した接着結合消失が肝星細胞活性化に寄与するならば、逆に接着結合を再現することで肝星細胞の活性化を制御できるはずである。そこでマウスから単離した肝星細胞 (単離後数日間は E カドヘリンを発現している) を E カドヘリンコート dish に播種し、E カドヘリン同士の結合を再現した。すると E カドヘリン未コート dish での培養に比べ、E カドヘリンコート dish で培養された肝星細胞の方が TAZ 発現および活性化マーカーの発現が抑制された。また別の実験系としてマウス由来肝星細胞をスフェロイド培養することで E カドヘリン接着を再現し、その培養液中に抗 E カドヘリン中和抗体を添加して接着結合を阻害すると、YAP/TAZ が転写制御している CTGF や ACTA2 の発現が亢進した。ヒト肝星細胞株でも同

様の実験を行った。HHStEC 細胞は胎児から単離した初代培養肝星細胞であるが、数度の継代を経ているため、実験に使用するときには既に E カドヘリン発現を失っている。この HHStEC 細胞に E カドヘリンを強制発現させてスフェロイド培養し接着結合を再現するとやはり肝星細胞の活性化を抑制した。さらに E カドヘリンを介した接着結合の有無による TGF- β シグナルへの影響を解析したところ、接着結合存在下では TGF- β 刺激による Smad2/3 のリン酸化が減弱した。また TGF- β 刺激によって誘導される α SMA も接着結合存在下ではほとんど誘導されていなかった (図 3)。

以上のことから、肝星細胞は正常時には E カドヘリンを介した接着結合が TAZ の発現を抑制することで静止期の状態を維持していると考えられる。一方、肝障害時における接着結合消失が TAZ の発現増強を介して活性化に寄与することが明らかとなった。すなわち、肝星細胞は接着結合の消失によって contact inhibition から解放されることが示唆される。

YAP/TAZ 経路を阻害する化合物の探索

肝細胞との接着結合を喪失した肝星細胞はコラーゲンなどの細胞外基質と焦点接着斑によって結合し、細胞が進展することでさらに YAP/TAZ 経路が活性化される。我々はポリフェノールの 1 種である Epigallocatechin-3-gallate(EGCG) が焦点斑形成に重要な Focal adhesion kinase の活性を抑制することで YAP/TAZ 経路を抑制し肝星細胞活性を抑制することを明らかにした。また EGCG を多く含む機能性食品を肝線維化モデルマウスに投与したところ肝線維化が抑制され、未病段階からこの機能性食品を摂取することで肝線維化進展を予防できる可能性が示唆された (図 4)。

図 3

Eカドヘリンを介した接着結合を再現することで肝星細胞活性化に重要なTGF β シグナルが減弱した

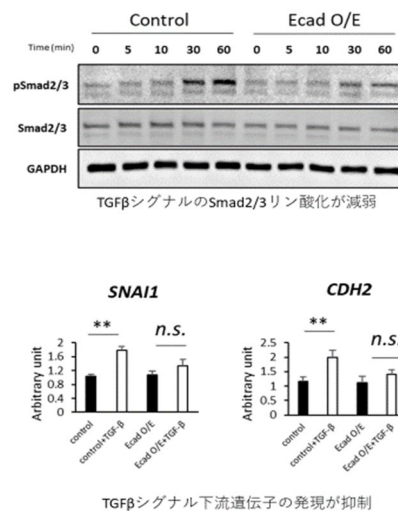
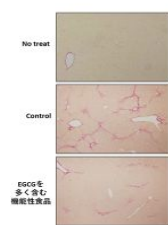
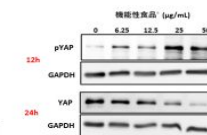


図 4

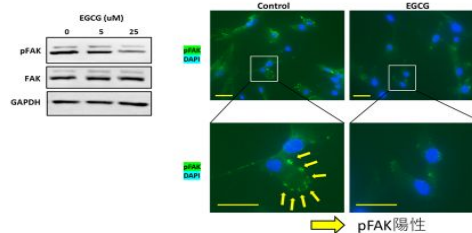
EGCGを多く含む機能性食品の投与によって四塩化炭素誘導肝線維化が軽減した



EGCGを多く含む機能性食品の添加によって肝星細胞におけるYAPがリン酸化・分解された



EGCGはYAP経路活性に重要なFAKリン酸化を減弱させた



(2) 肝硬変時の低浸透圧血症とメカノトランスダクション

肝硬変時には低アルブミン血症や低ナトリウム血症のため類洞環境が低浸透圧となる。低浸透圧環境では細胞外液が細胞内に流入するため細胞が膨張する。またこの細胞膨張によって細胞生理が変化することが古くから知られているが、この細胞膨張とメカノトランスダクションとの関連についての詳細な検討は多くない。肝硬変は肝がんの重要なリスクファクターである。また肝硬変を有する肝がん患者の血清ナトリウム値はがんの大きさ、悪性度と逆相関することが報告されている。したがって、この低浸透圧環境がメカノトランスダクションを介して肝星細胞や肝がん細胞に何らかの影響を与えているのではないかと考え検証を行った。

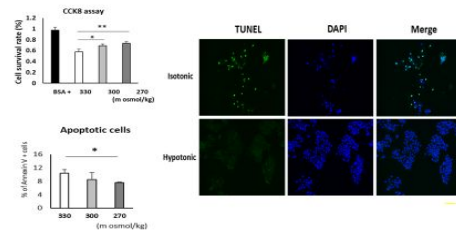
低浸透圧環境が肝星細胞や肝がん細胞に与える影響

まず培地中のナトリウム濃度を調整して浸透圧調整培地の作成を試みた。FBS やアルブミンの存在下ではほとんど浸透圧が変化しなかった為、ナトリウム濃度の異なる無血清培地を作成し血清飢餓誘導アポトーシスに対する低浸透圧環境の影響を調べることにした。

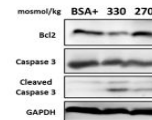
通常の培地と等張の無血清培地では、細胞数が減少したのに対し、低浸透圧培地では細胞数の減少が抑制された。次にアポトーシス関連分子を調べたところ、低浸透圧環境では抗アポトーシス分子である Bcl-2 の発現が増強されアポトーシスが抑制されることがわかった (図 5)。

図 5

低浸透圧環境は血清飢餓誘導アポトーシスを抑制した



低浸透圧環境は抗アポトーシスタンパク Bcl-2 の発現を増強した



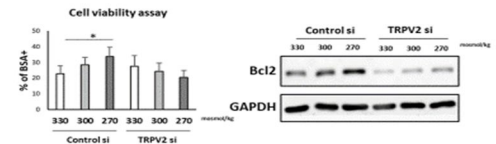
低浸透圧による機械的刺激に対する受容体および活性化される経路の同定

低浸透圧受容体である TRPV2 をノックダウンすると低浸透圧環境による抗アポトーシス効果が減弱した。また肝がん細胞株に TRPV2 を強制発現させると抗アポトーシス効果が増強された。

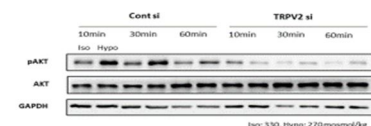
次に我々は低浸透圧培地では細胞生存に重要である AKT 経路が活性化されることを発見した。TRPV2 ノックダウン株では低浸透圧環境の活性化は減弱した。さらに AKT 恒常的活性細胞を作成したところ Bcl-2 の発現増強が観察された (図 6)。

図 6

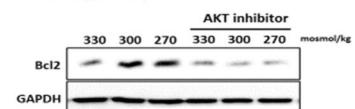
TRPV2 ノックダウンによって低浸透圧環境による抗アポトーシス効果がキャンセルされた



TRPV2 ノックダウンによって低浸透圧環境による AKT 経路活性化がキャンセルされた



AKT 阻害剤によって低浸透圧環境による Bcl-2 発現増強効果がキャンセルされた



以上のことから、肝硬変時の低ナトリウム血症下では肝星細胞や肝がん細胞のアポトーシスを阻害することで持続的肝星細胞の活性化による更なる肝線維化進展ならびに肝発がんに寄与していることが示唆された。また我々の研究結果から、今まで以上に積極的な肝硬変時における低ナトリウム血症への介入が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宇留島隼人・池田一雄	4. 巻 51
2. 論文標題 【肝星細胞活性化と肝硬変・肝がん】肝星細胞活性化の新規initiation factor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 526-529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宇留島隼人、松原勤、小田桐直志、池田一雄
2. 発表標題 低浸透圧環境は活性化肝星細胞や肝がん細胞のアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 第31回肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宇留島隼人、松原勤、河田則文、池田一雄
2. 発表標題 低浸透圧環境下における肝がん細胞アポトーシス抑制のメカニズム解析
3. 学会等名 第7回 Kansai Liver Club
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayato Urushima, Tsutomu Matsubara, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Oligonol suppresses activation of hepatic stellate cell by inhibition of YAP/TAZ pathway
3. 学会等名 26th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇留島隼人, 松原勤, 湯浅秀人, 井上孝二, 和氣健二郎, 佐藤哲二, 池田一雄
2. 発表標題 肝細胞-星細胞間接着と星細胞活性化との関連
3. 学会等名 第32回肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇留島隼人, 湯浅秀人, 松原勤, 井上孝二, 和氣健二郎, 佐藤哲二, 池田一雄
2. 発表標題 肝細胞-肝星細胞間の接着結合喪失は肝星細胞活性化に寄与する
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayato Urushima, Hideto Yuasa, Misako Takayama, Tsutomu Matsubara, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Oligonol ameliorates hepatic fibrosis through the inhibition of FAK-YAP pathway in hepatic stellate cells
3. 学会等名 27th International Congress on Nutrition and Integrative Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayato Urushima, Hideto Yuasa, Tsutomu Matsubara, Yaiko Hara, Koji Inoue, Kenjiro Wake, Tetsuji Sato, Kazuo Ikeda
2. 発表標題 Stellate cells initiate the activation by the loss of adherens junction with hepatocytes
3. 学会等名 20th International Symposium on Cells of Hepatic Sinusoid (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇留島隼人, 松原勤, 湯浅秀人, 河田則文, 池田一雄
2. 発表標題 肝硬変時の低ナトリウム血症による低浸透圧環境が門脈圧亢進に及ぼす影響
3. 学会等名 第26回日本門脈圧亢進症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅秀人, 宇留島隼人, 松原勤, 池田一雄
2. 発表標題 正常肝ないし障害肝の肝星細胞におけるfilopodia関連タンパク質の発現解析
3. 学会等名 第33回肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯浅秀人, 宇留島隼人, 松原勤, 池田一雄
2. 発表標題 肝星細胞 - 肝細胞間の接着と肝星細胞活性化との関係について
3. 学会等名 第14回中四国電子顕微鏡研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----