

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23951

研究課題名(和文) 肝がん微小環境におけるヒト肝星細胞由来老化関連分泌因子の機能解析

研究課題名(英文) functional analysis of senescence-associated secretory factors from human hepatic stellate cells in liver cancer microenvironment

研究代表者

小田桐 直志 (Odagiri, Naoshi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10623241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：老化肝星細胞は肝線維化の進行に抑制的な役割を果たすと考えられているが、その特徴については不明な点が多い。TGF $\beta$ は肝星細胞の活性化を引き起こし、肝線維化進展において重要な増殖因子として知られる。老化肝星細胞の表現型変化の機序としてTGF $\beta$ に対する反応性の低下が関与しているのではないかと考えた。老化肝星細胞ではSMAD4蛋白量が低下しており、TGF $\beta$ に誘導されるリン酸化SMAD2/3の核内移行が減弱していることを確認した。さらに、老化肝星細胞におけるSMAD4蛋白の低下は、ERK1/2の亢進に伴うmiR-34aの発現増加によって引き起こされていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変や肝がんはあらゆる原因による慢性肝炎の終末像であり、その治療法の開発は健康上の重要な課題である。また、加齢に伴って肝硬変や肝がんの発症リスクが増加することも知られている。加齢に伴う肝硬変・肝がん発症の分子機序や、その過程における老化肝星細胞の役割などについては不明な点が多い。TGF $\beta$ は肝線維化進行に重要な役割を果たすサイトカインの一つであるが、本研究では肝星細胞が細胞老化を起こすにつれて、TGF $\beta$ に対する反応性が低下することを分子機序とともに示した。肝星細胞に対する細胞老化の誘導は肝線維化治療につながる可能性が示唆されており、更なる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Transforming growth factor (TGF $\beta$ ) is an important factor for development of liver cirrhosis by activating hepatic stellate cells (HSC). Senescent HSC is found in chronic liver disease such as liver cirrhosis, but the character of the senescent HSC is not fully understood. We discover that TGF $\beta$  response is attenuated in the senescent HSC following decreased SMAD4 protein levels. The senescent HSC showed decreased SMAD4 protein levels without reduced SMAD4 mRNA levels and attenuated TGF $\beta$ -induced nuclear translocation of phosphorylated SMAD2/3. In addition, miR-34a-mimic decreased SMAD4 protein levels in the normal HSC while miR-34a-inhibitor increased SMAD4 protein levels in the senescent HSC. Furthermore, an ERK1/2 activator enhanced miR-34a expression in the normal HSC while an ERK1/2 inhibitor suppressed miR-34a expression in the senescent HSC. We concluded that TGF $\beta$  response is attenuated in the senescent HSC due to SMAD4 expression suppressed by ERK1/2-miR-34a axis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝星細胞 細胞老化 老化関連分泌表現型 肝がん

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

慢性肝炎の終末は、背景肝疾患に問わず、肝硬変・肝がんである。しかし、肝硬変・肝がんの特効薬は存在せず、また、肝硬変から肝がんへ至る分子機序も不明な点が多い。興味深いことに、肝硬変患者から肝がんへ進展する症例の多くは70歳以上の高齢者である。これは加齢、臓器老化と肝がんが関連あることを示唆しているが、その要因は分かっていない。

肝硬変患者の肝組織には老化肝星細胞が発見され、マウスモデルの研究から、老化肝星細胞に由来する分泌因子が肝発がんを促進的に作用していることが示唆された。申請者は、すでに老化ヒト肝星細胞ではANGPTL4・IL-8・PF4V1（老化3因子）の遺伝子発現が増加しており、*in vitro*においてそれらの遺伝子発現はERKの制御を受けていることを証明し、既に報告した。これまでの研究から、静止型と活性型の肝星細胞の特徴については多くのことが明らかになってきているが、老化肝星細胞については大部分が不明なままである。

### 2. 研究の目的

老化肝星細胞は肝線維化抑制的な性質を有することが報告されているが、その機序は不明な点が多い。Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF $\beta$ )は肝星細胞に対して活性化を誘導し、線維産生を促進させるサイトカインであり、肝線維化進行に深く関与している。老化肝星細胞の性質変化の機序として、TGF $\beta$ に対する反応性が変化している可能性を考えた。老化肝星細胞の性質変化の分子機序を解明することで、現在治療薬の選択肢が乏しいこれらの疾患に対する新規機序の治療薬開発に資する知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) HHStcCに対して5 ng/mLのTGF $\beta$ を添加し、48時間培養後のSA- $\beta$ gal活性と肝星細胞関連遺伝子（ $\alpha$ SMA、COL1A1、CYGB）の遺伝子発現を定量的PCRによって解析した。

(2) TGF $\beta$ はSMAD経路を介して肝星細胞の活性化を誘導することが知られているため、正常なHHStcC (NC) と老化HHStcC (SC) にTGF $\beta$ を添加し、SMAD経路の下流蛋白のリン酸化をWestern blotting (WB) や蛍光免疫染色により解析した。また、両群のサンプルを核と細胞質の成分に分離した上でWBによる解析も行った。

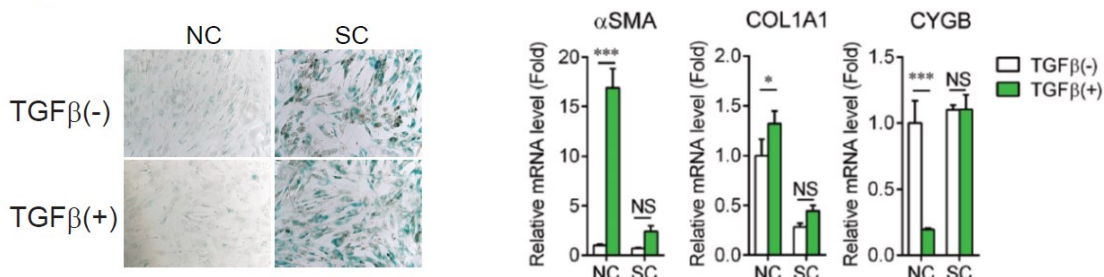
(3) 定量的PCRではNCとSCのSMAD4 mRNA発現量に有意差はなく、マイクロRNA (miRNA)の関与の可能性が考えられた。TargetScan (version 7.1)によりSMAD4と関連するmiRNA群を候補とし、NCとSCにおける発現量を定量的PCRにより解析した。

(4) 老化肝星細胞において発現増加しているERK1/2がmiR-34aの発現に影響を与えている可能性を考え、ERK阻害剤のSCH772984と、ERK経路刺激因子であるEGFをSCに添加することで、miR-34aの発現の変動を調べた。

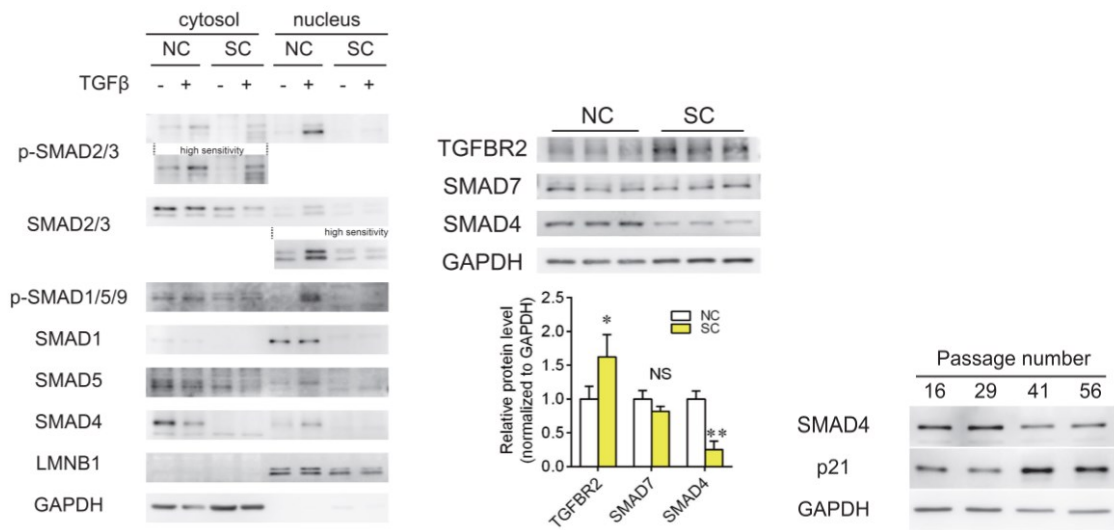
(5) 肝星細胞におけるSMAD4の発現変化にmiR-34aが関与していることを確認するため、miR-34a mimicをNCに導入することでSMAD4が減弱するかどうか、逆にSCにmiR-34a阻害剤を添加することでSMAD4が増加するかどうかを確認した。

#### 4. 研究成果

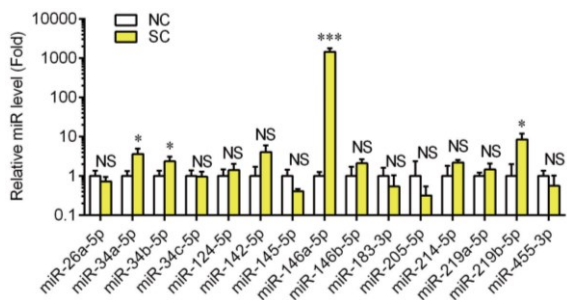
(1) TGFβの添加により、HHStECのSA-βGal活性と老化3因子の遺伝子発現に有意な差は見られなかった。肝星細胞関連遺伝子については、正常細胞ではαSMA・COL1A1の発現増加、CYGBの発現低下が認められたのに対して、老化細胞ではこれらの変化が減弱していた。これらの結果から、老化肝星細胞ではTGFβに対する反応性が変化している可能性が示唆された。



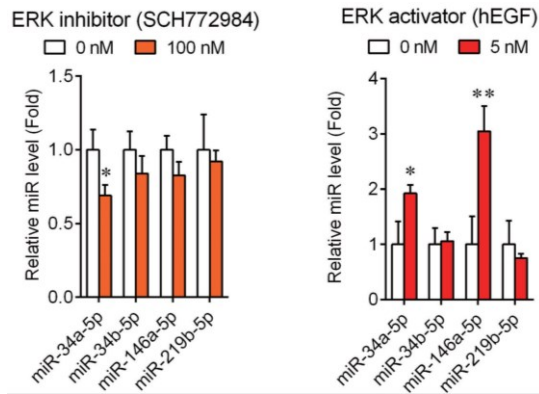
(2) TGFβを添加したNCとSCのサンプルを核と細胞質の成分に分画し、リン酸化SMAD2/3の発現をWBにより確認したところ、SCの核分画ではNCの核分画に比較してリン酸化SMAD2/3の発現が低下していることがわかった。さらにSMAD4の発現をWBによって解析したところ、SCのSMAD4発現は核・細胞質の両方で減弱していた。異なる回数の反復継代を行ったサンプル (Passage 16, 29, 41, 56) でSMAD4の発現をWBで解析したところ、Passage 41, 56のサンプルではSMAD4の発現が減弱していた。



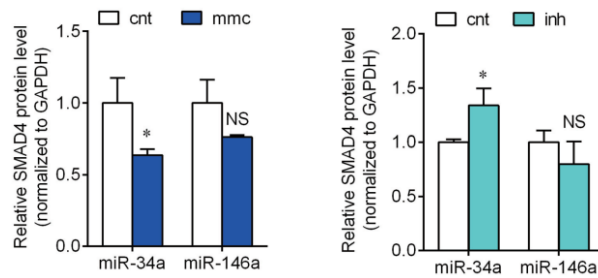
(3) SCでは、miR-34a, miR-34b, miR-146a, miR-219bの発現量が有意に増加していた。このうち、miR-34a-5pの発現はERK阻害剤により抑制され、EGF添加で増加し、ERKによる制御を受けているものと考えられた。



(4) SCをSCH772984で処理するとmiR-34aの発現は抑制され、NCにEGFを添加するとmiR-34aとmiR-146aの発現が増加した。これらの結果より、miR-34aはERKの制御を受けていることが確認できた。



(5) NCにmiR-34a mimicを導入するとSMAD4の発現量が減弱し、SCにmiR-34a阻害剤を添加することでSMAD4の発現量は増加した。一方、NCにmiR-146a mimicを導入してもSMAD4の発現量は変化せず、SCにmiR-146a阻害剤を添加してもSMAD4の発現量は変化しなかった。これらの結果から、老化肝星細胞におけるSMAD4の変動はERK1/2-miR-34aの経路を介した機序で生じているものと考えられた。



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Minh Phuong Dong, Masaru Enomoto, Le Thi Thanh Thuy, Hoang Hai, Vu Ngoc Hieu, Dinh Viet Hoang, Ayako Iida-Ueno, Naoshi Odagiri, Yuga Amano-Teranishi, Atsushi Hagihara, Hideki Fujii, Sawako Uchida-Kobayashi, Akihiro Tamori, Norifumi Kawada	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical significance of circulating soluble immune checkpoint proteins in sorafenib-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60440-5.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoshi Odagiri
2. 発表標題 Putative role of ERK1/2 signaling of senescent human hepatic stellate cells in hepatocellular carcinoma derived from liver cirrhosis.
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2019（国際学会）
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
研究協力者	松原 勤 (Matsubara Tsutomu)	大阪市立大学大学院医学研究科・機能細胞形態学・准教授  (24402)	
研究協力者	河田 則文 (Kawada Norifumi)	大阪市立大学大学院医学研究科・肝胆病態内科学・教授  (24402)	

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
---------	---------