

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19330

研究課題名（和文）肝星細胞のエネルギー代謝に着目した肝硬変抑制法の開発

研究課題名（英文）Development of therapy for liver cirrhosis : focused on energy metabolism of liver stellate cell

研究代表者

岩本 拓也 (IWAMOTO, Takuya)

山口大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：80634716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：肝線維症は肝細胞損傷が原因で細胞外基質の過剰生産や分解低下により生じる。肝硬変における肝星細胞のエネルギー代謝に着目した基礎的研究を行うことで、星細胞の活性化制御による肝線維化改善、さらには肝硬変治療につながる新たな治療法開発を目的とした。エネルギー代謝に関与する遺伝子をノックダウンし、星細胞活性化に関わるかどうか評価を行ったところ、肝星細胞活性化と関係が深いことを見出した。またマイクロアレイのデータをIPAで解析を行い評価したところ、興味深いPathway解析の結果などが得られた。

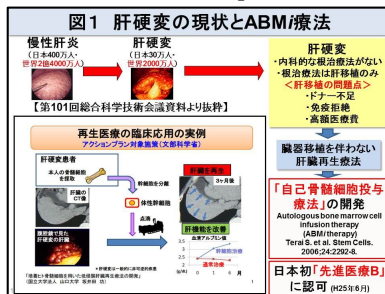
研究成果の概要（英文）：Liver fibrosis is caused by damage of hepatocytes. Overexpression of extracellular matrix and reduction of degradation of extracellular matrix is related to fibrosis. We focused the basic research of energy metabolism of liver stellate cells and aimed to develop new therapy for improve liver fibrosis and liver cirrhosis. We have knockdown the expression of energy metabolism related genes and found that the AK gene isozyme is related to activation of liver stellate cells. We further investigated the gene expression analysis by IPA, and found some interesting pathway data.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝硬変 肝星細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々は世界に先駆けて肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法 (Autologous Bone Marrow Cell infusion, ABM<sub>i</sub>療法)を開発した。現在までに、山口大学、山形大学、国立国際医療研究センター、韓国延世大学と多施設臨床研究を行い、その有効性を報告してきた。平成 25 年 6 月には日本初の“先進医療 B”に認められ、現在多施設臨床研究を推進している(図 1)。これまでの臨床研究の結果より明らかになったことは“肝硬変症患者に自己骨髄細胞投与”を行うことで、ヒトでは肝前駆細胞の活性化、肝細胞の増殖の結果、肝機能が改善する (Terai S et al. Stem Cells 2006, Cell Transplantation 2010)。



肝線維症は肝細胞損傷が原因で細胞外基質の過剰生産や分解低下により生じる。肝線維化は慢性肝障害で見られ、コラーゲンなど細胞外マトリックスの過剰蓄積が原因と考えられている。肝星細胞は細胞外マトリックスの蓄積に關与する主な細胞である。静止期の肝星細胞は vitaminA と脂質をためる細胞であるが一度活性化すると myofibroblast 様の細胞になり fat vacuoles や vitaminA の蓄積がなくなり、 $\alpha$ -smooth-muscle actin ( $\alpha$ -SMA)や Vimentin などの発現が増加し、多くのコラーゲンを蓄積し、線維化促進作用のある TGF- $\beta$ 、CTGF、IL-6 が分泌されることが知られている。近年肝星細胞で Hypoxia-inducible factor 1 alpha (Hif-1a)がラット肝星細胞培養細胞の活性化に關与することが報告されるなど、肝星細胞の代謝に關

わる報告があるものの、肝星細胞自体についての詳細に関しては解っていないことが多い。そこで本研究では肝星細胞のエネルギー代謝に着目した。生物は核酸、タンパク合成、各種生体反応を行うために、エネルギーが必要である。主要なエネルギー通貨分子である ATP は人体で約 250g 含まれており、リサイクルされることで、一日当たり体重と同量程度合成されている。ATP 産生の重要な経路は解糖系、クエン酸回路/酸化的リン酸化、ベータ酸化である。これまでにエネルギー代謝調節についてはさまざまな分子が研究されている。

## 2. 研究の目的

これまでに骨髄細胞から肝細胞への分化評価モデル(GFP/CC14 モデル)の研究を行い、肝機能と生存率の回復、肝線維化改善について報告し骨髄細胞投与により硬変肝が修復されることを報告してきた。しかし肝線維化の改善についての詳細なメカニズムは未だ解っておらず、より効率のよい改善効果を得るために検討が必要である。本研究は肝硬変における肝星細胞のエネルギー代謝に着目した基礎的研究を行うことで、星細胞の活性化制御による肝線維化改善、さらには肝硬変治療につながる新たな治療法開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

肝星細胞として HHStec 細胞と LI90 細胞を使用した。肝星細胞活性化に關与する分子をプラスミドベクターを用いた過剰発現もしくは siRNA でノックダウンした細胞を作製した。肝星細胞の活性化のマーカーである SMA やコラーゲンの発現を指標とし、肝星細胞の活性化状態の評価、ATP の濃度変化、細胞の増殖性などを解析した。さらに効果があることが期待された遺伝子については、ノックダウンした株のマイクロアレイ解析を行い遺伝子発現の網羅的解析を行った。さらにメタボ

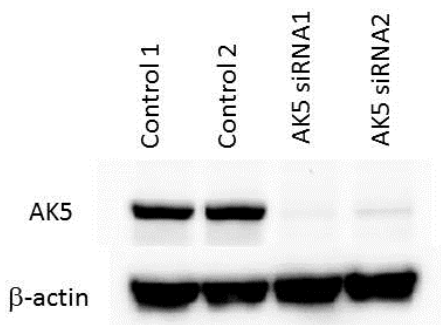
ローム解析を行い代謝の改変を詳細に解析した。

#### 4. 研究成果

生物の細胞内で各コンパートメントの ATP 濃度には違いがあり、ATP 産生場所から消費場所へとエネルギーを転移することは重要である。アデニル酸キナーゼは、細胞内アデニンヌクレオチドの恒常性維持においても重要な役割を担う酵素である。7 種のアイソザイムがこれまでに同定されており、それぞれ組織分布、細胞内局在性が異なる。これまでに申請者はエネルギー代謝の視点から、肝星細胞の活性化について研究を行ってきた。

SMA やコラーゲンの発現を指標とし、肝星細胞の活性化に関わるエネルギー代謝、すべてのアデニル酸キナーゼアイソザイム (AKiso) をノックダウンし(図 2)、活性化に関わるかどうか評価を行ったところ、アデニル酸アイソザイム B (AKisoB) が肝星細胞活性化と関係が深いことを見出した。

**図2**  
肝星細胞HHStecを使用した  
AK5ノックダウン



効率よくAK5をノックダウンすることができた

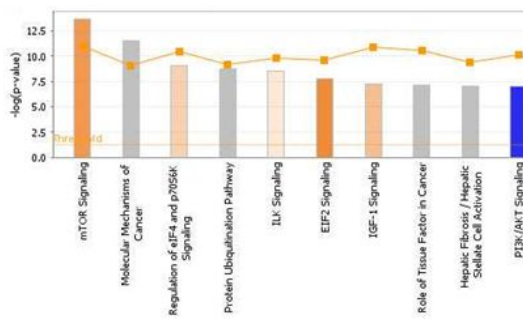
マイクロアレイ解析において AKisoB をノックダウンすると SMA が 2.7 倍、Col1A1 が 2.1 倍に増加しを確認した(表 1)。

**表 1** マイクロアレイ解析 星細胞の活性化に関わる遺伝子

		control siR	control siR	control siR	AK5 siRNA	AK5 siRNA	AK5 siRNA	AK5 siRNA	Ratio	P-value
COL1A1	Homo sapi	104689.7	90527.77	105180.9	206436.9	215951.6	209820.6	2.104489	0.000116	
ACTA1	Homo sapi	8.958045	11.42386	10.41095	11.92722	12.55141	7.987372	1.054346	0.750462	
ACTA2	Homo sapi	1861.286	1649.328	1801.494	4524.146	4723.308	5196.516	2.719068	0.000116	
ACTB	Homo sapi	7000.531	7430.088	6371.998	6905.884	7011.728	7885.308	1.038471	0.535702	
ACTG	Homo sapi	172772.8	168716.3	171245.4	160854.7	163849.5	181513.8	0.991155	9.840468	

またマイクロアレイのデータを IPA で解析を行い評価したところ、興味深い Pathway 解析の結果などが得られた(図 3)。

**図 3** マイクロアレイによる Pathway 解析



以上の結果により AKisoB は肝星細胞の活性化にかかわることから、AKiso の肝星細胞活性化における詳しい機序の解明が今後必要である。例えば AKisoB の遺伝子過剰発現させる薬剤のスクリーニングなどが必要であり今後解析予定である。さらに薬剤による活性型星細胞の発現抑制効果についても詳細な解析を行うためノックアウトマウス作製を行っている。本研究により肝硬変の線維化改善治療薬の創薬、および肝線維化のメカニズム解析につながってゆくことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takuya Iwamoto、他 (1/10 番目).  
Predictors of the effect of tolvaptan on  
prognosis of cirrhosis. Internal Medicine.  
査読有. 55(20)巻、2016、2911-2916.

〔学会発表〕(計 6 件)

岩本 拓也、食道静脈瘤治療後の再発時期は予測可能か、第 41 回日本肝臓学会総会西部会、2015 年 12 月 3-4 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

岩本 拓也、トルバプタン有効因子の解析、第 22 回日本門脈圧亢進症学会総会、2015 年 9 月 10-11 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

岩本 拓也、当院におけるトルバプタンによる腹水治療効果の検討、第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21-22 日、ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

岩本 拓也、トルバプタンによる腹水治療効果の検討、第 101 回日本消化器病学会総会、2015 年 4 月 23-25 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

岩本 拓也、トルバプタンによる腹水コントロールの検討、第 21 回日本門脈圧亢進症学会、2014 年 9 月 12-13 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

岩本 拓也、食道静脈瘤の治療後再発要因の解析と再発予測式の作成、第 100 回日本消化器病学会、2014 年 4 月 23-26 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

〔図書〕(計 1 件)

岩本 拓也 他、医歯薬出版株式会社、医学のあゆみ、2015、255 (237-238)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 拓也(IWAMOTO, Takuya)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80634716

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

藤澤 浩一(FUJISAWA, Koichi)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00448284