

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19336

研究課題名(和文)肝線維化におけるCD39の役割の解明とCD39を用いた新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Role of CD39 on development of liver fibrosis and application of CD39 in treating liver fibrosis

研究代表者

吉田 理 (Yoshida, Osamu)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70746809

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)：肝臓の線維化には肝星細胞が深くかかわっているが、肝星細胞の活性化の機序については不明な点が多い。申請者は、肝星細胞上に細胞外ATPのレセプターであるP2X7を発現し、肝星細胞の活性化にDAMPsである細胞外ATPが関わることを明らかにした。CD39は細胞外ATPの分解酵素であり、*in vitro*において肝星細胞の活性化を抑制した。CD39による肝硬変の抑制について検討中であるが、CD39が抗線維化療法のターゲットになる可能性示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatic stellate cell (HSC) is involved in the pathogenesis of liver fibrosis, however the mechanism underlying HSC activation is not well known. Applicant have revealed that HSC expressed P2X7, the receptor for extracellular ATP (eATP) and HSC activation was mediated through ATP/P2X7 axis. Further, HSC activation was inhibited by CD39 which is a hydrolytic enzyme for eATP *in vitro*. Although therapeutic potential of CD39 in liver cirrhosis is still under investigation, CD39 may be a promising anti-fibrotic agent in liver diseases.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝線維化 肝星細胞 細胞外ATP CD39

1. 研究開始当初の背景

肝臓の慢性炎症は肝の線維化を誘発し、肝硬変へ進展する。慢性 C 型肝炎では治療の進歩により、C 型肝炎ウイルス(HCV)の排除が可能となった。HCV 排除により肝炎は鎮静化するが、肝の線維化は残存し、線維化した肝臓からは肝癌の発生がみられるため、肝の線維化が発癌の母地になると考えられる。そのため、肝臓の線維化に対する治療が求められているが、肝線維化に対する治療法は確立していない。

肝の線維化では免疫担当細胞と肝星細胞の活性化が病態の中心となる。肝臓の炎症では、肝炎ウイルスなどの病原体 (pathogen associated molecular patterns、PAMPs) や肝細胞障害時に放出された障害細胞由来の分子 (damage associated molecular patterns、DAMPs) が、マクロファージ、樹状細胞 (DC) などの免疫担当細胞を刺激し、炎症性サイトカインの産生を促す。申請者は、DAMP である自己 DNA が形質細胞様 DC を刺激し IFN- γ 産生を促すことを報告した¹⁾。産生された炎症性サイトカイン、あるいは PAMPs、DAMPs 自身が肝星細胞を活性化し、活性化した肝星細胞は繊維芽細胞様細胞に変質、TGF- β 、コラーゲンを産生し、障害部位に細胞外器質を沈着させ、障害部位の修復を行う。肝臓の慢性炎症では、肝細胞障害、炎症、組織修復が継続的に繰り返され、細胞外器質が溶解する前に新たな細胞外器質が沈着し、肝の線維化が定着する²⁾。

ATP (adenosine triphosphate) は、細胞内に存在し、エネルギー源として利用される。細胞障害により細胞外に放出された細胞外 ATP は DAMP として働き、免疫担当細胞を引き寄せ、それらを活性化、炎症性サイトカインの産生を促し、炎症の形成・持続に関与する³⁾。細胞外 ATP の肝星細胞に対する影響は明らかではないが、肝星細胞が細胞外 ATP レセプターを発現⁴⁾しており、肝星細胞は細胞外 ATP により活性化され、肝の線維化に関与する可能性がある。

申請者は細胞外 ATP を分解する CD39 に着目し、研究を行ってきた。CD39 は内皮細胞、種々の免疫担当細胞に発現する細胞外核酸分解酵素で、細胞障害により放出された細胞外 ATP を分解し、アデノシンへ変換する。CD39 は、DAMP である細胞外 ATP を分解すること、免疫抑制物質であるアデノシンを増加させることで免疫担当細胞の活性を抑制し、炎症を鎮静化する⁵⁾。申請者は、肝樹状細胞が CD39 を高発現し、肝樹状細胞に発現する CD39 が虚血による肝細胞障害時の炎症の軽減に寄与していることを報告した⁶⁾。肝星細胞は ATP 分解能を有するため⁷⁾、CD39

を発現している可能性がある。肝星細胞に発現した CD39 は細胞外 ATP の分解とアデノシンの増加を促すことで、免疫担当細胞の炎症性サイトカイン産生と肝星細胞自身の活性化を抑制し、肝の線維化に対して抑制的に働くことが予想される。可溶性 CD39 は、免疫担当細胞だけでなく肝星細胞の活性化を抑制する肝線維化に対する新しい治療法になる可能性がある。

引用文献

- 1) Yoshida O, Castellaneta A, et al. Hepatology. 2014; 60; 267-77. Co-first author.
- 2) Pellico A, et al. Nat Rev Immunol. 2014; 14; 181-94.
- 3) Idzko M, et al. Nature. 2014; 509: 310-7.
- 4) Dranoff JA, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2014; 287: G417-24.
- 5) Eltzsching HK, et al. N Engl J Med. 2012; 367: 2322-33.
- 6) Yoshida O, et al. Hepatology. 2013; 56: 2163-75.
- 7) Ikeda N, et al. Hepatol Res. 2012; 42: 91-102.

2. 研究の目的

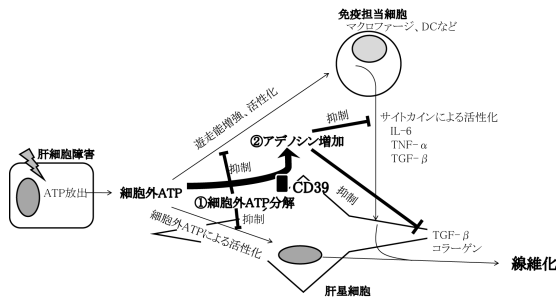
本研究では、CD39 の肝星細胞の発現と肝線維化における役割を明らかにし、CD39 を用いた肝線維化に対する新しい治療法の開発を目的とし、以下のことを明らかにする。

- ✓ 細胞外 ATP が肝星細胞を活性化し、肝の線維化を誘導すること。
- ✓ 肝星細胞に CD39 が発現し、肝星細胞に発現した CD39 が ATP を分解し、アデノシンへ変換すること。
- ✓ 肝星細胞に発現する CD39 が免疫担当細胞と肝星細胞の活性化を抑制し、線維化を抑制すること。
- ✓ CD39KO マウスから分離した肝星細胞は、WT マウス肝星細胞より活性化しており、線維化を誘導しやすいこと。
- ✓ CD39KO マウスと WT マウスに四塩化炭素により肝の線維化を誘導し、免疫担当細胞と肝星細胞の活性化の程度、肝の線維化の程度を比較し、CD39 欠損が肝線維化を促進すること。
- ✓ 四塩化炭素による肝線維化マウスに可溶性 CD39 を投与し、CD39 が肝線維化の治療に応用できること。

3. 研究の方法

肝星細胞を分離し、肝星細胞上の CD39 の発現を確認、その ATP 分解能、アデノシン産生能を評価する。細胞外 ATP による肝星細胞の活性化の可否を明らかにす

るため、肝星細胞を高濃度の ATP で刺激し、ATP による肝星細胞の活性化の有無を評価する。肝星細胞に発現する CD39 の役割を明らかにするため、WT マウスと CD39KO マウスから肝星細胞を分離し、活性化能、線維化誘導能など機能を比較検討する。肝線維化における CD39 の役割を明らかにするため、WT マウスと CD39KO マウスに四塩化炭素を投与し、肝の線維化を誘導し、WT マウスと CD39KO マウスの線維化の程度、免疫担当細胞、星細胞の活性化などを比較する。可溶性 CD39 の治療効果を検討するため、WT マウスに四塩化炭素と可溶性 CD39 を投与し、可溶性 CD39 の肝線維化の抑制、肝星細胞と免疫担当細胞の活性化の抑制を検討する。



(1) 肝星細胞における CD39 の発現と ATP による肝星細胞の確認

肝星細胞の分離

肝星細胞の分離は申請者の留学先のピッツバーグ大学 Angus Thomson 教授の研究室のプロトコール(Sumpter TL, et al. J Immunol. 2012; 189: 848-3858)に従う。

肝星細胞における CD39 の発現とその機能の検討

分離した肝星細胞に発現する CD39 をフローサイトメトリーにて確認する。肝星細胞に発現する CD39 の機能は ATP 分解能、アデノシン産生能で検討する。

肝星細胞の活性化

分離した肝星細胞を ATP (100nM)、TGF- (2.5nM)で刺激し、肝星細胞の活性化マーカー (SMA、MIP-1、collagen I 等) の発現を RT-PCR、免疫沈降で確認する。

(2) 肝線維化モデルマウスの作成

WT マウスに四塩化炭素 (1 μL/g body weight、腹腔内投与、3 回/週、10 週間) を投与し、組織学的に線維化を評価する。また、肝星細胞の活性化を SMA 染色にて検討する。

肝線維化と肝障害の評価

肝の線維化は鍍銀染色、肝の炎症はヘマトキシリン・エオジン染色にて、病理医による盲検的な評価を行う。また、血液検査にて AST 値、ALT 値、

Albumin 値を測定する。

肝線維化における肝星細胞の活性化の検討

肝組織における SMA の染色と、SMA、MIP-1、collagen I の組織の発現を RT-PCR にて検討する。

肝線維化におけるマクロファージ、樹状細胞の活性化の検討

線維化肝よりリンパ球を分離し、マクロファージ、樹状細胞の活性化をフローサイトメトリーにて検討する。肝組織中の炎症性サイトカイン産生を RT-PCR にて検討する。

(3) 肝星細胞に発現する CD39 の役割の解明

CD39KO マウスの移送、繁殖

肝星細胞に発現する CD39 の役割の検討

WT マウス、CD39KO マウスから肝星細胞を分離し、肝星細胞の活性化能を比較し、CD39 の発現の有無による肝星細胞の機能変化を検討する。

(4) CD39 の肝線維化における役割 CD39KO マウスにおける肝線維化の検討

CD39KO と WT マウスに四塩化炭素を投与し、肝の線維化を誘導する。CD39KO マウスと WT マウスの肝の線維化、肝星細胞の活性化、肝マクロファージ、肝樹状細胞の活性化の程度を比較し、CD39 欠損が肝線維化に及ぼす影響を検討する。

(5) 可溶性 CD39 を用いた治療法の検討

WT マウスに四塩化炭素と同時に可溶性 CD39 (5U/mouse、週 3 回、10 週間) を投与し、CD39 による肝線維化抑制能を検討する。

肝線維化の程度、星細胞の活性化、肝マクロファージ、肝樹状細胞の活性化の程度を非治療群と比較検討する。

4 . 研究成果

(1) 肝星細胞における CD39 の発現と ATP による肝星細胞の確認

健常マウスから肝星細胞の分離と培養実験が可能となっている。マウス初代培養肝星細胞、ヒト肝星細胞株 (LX-2) とともに ATP のレセプターである P2X7 が発現し、ATP 刺激にて、TGF- による活性化の増強が確認された。CD39 の発現については PCR で確認中だが、ATP の分解が確認され、CD39 の発現が示唆される。

(2) 肝線維化モデルマウスの作成

CCL4 の腹腔内 12 週投与にて肝硬変モデルマウスの作成に成功した。肝臓の線維化は Azan 染色にて確認済である。

(3) 肝星細胞に発現する CD39 の役割の
説明

CD39KO マウスの移送、繁殖
CD39KO マウスの供与先であるハーバード
大学において繁殖が安定しておらず、搬
送の調整中である。SiRNA による実験を
行っている。

(4) CD39 の肝線維化における役割
上記の理由により、CD39KO マウスの搬入
が遅延している。

(5) 可溶性 CD39 を用いた治療法の検討
可溶性 CD39 による肝星細胞の活性化抑
制は in vitro で確認された。in vivo で
の肝硬変の改善傾向は確認できたが、有
意差は得られていない。

今後の展望

肝星細胞の活性化に細胞外 ATP が関わる
ことが明らかになり、細胞外 ATP とその
レセプターである P2X7 が肝線維化の治
療ターゲットになりうる。

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 2 件)

Yokota S, Yoshida O, Ono Y, Geller DA,
Thomson AW. Liver transplantation in
the mouse: Insights into liver
immunobiology, tissue injury, and
allograft tolerance. Liver Transpl.
2016;22(4):536-46. (査読あり)

Yokota S, Ueki S, Ono Y, Kasahara N,
Pérez-Gutiérrez A, Kimura S, Yoshida O,
Murase N, Yasuda Y, Geller DA, Thomson
AW. Orthotopic mouse liver
transplantation to study liver biology
and allograft tolerance. Nat Protoc.
2016; 11(7): 1163-74. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

吉田理、阿部雅則、日浅陽一 . 当科に
おける GLOBE Score と UK-PBC Risk Score
の有用性の検討 . JDDW 2016.2016 年 11
月 3 日 ~ 6 日 . 神戸国際展示場、兵庫県
神戸市 .

Yoshida O, Kimura S, Matta BM, Imai
Y, Abe M, Hiasa Y, Thomson AW.
Promotion of liver transplant
tolerance by liver plasmacytoid
dendritic cells. 2015 年 11 月 13 日 ~
16 日 . サンフランシスコ、アメリカ .

吉田理、阿部雅則、日浅陽一 . CD39 に
よる肝樹状細胞機能と肝虚血再灌流障害

の制御 . 第 51 回日本肝臓学会総会 . 2015
年 5 月 21 日 ~ 22 日 . 熊本キャッスルホ
テル、熊本県熊本市 .

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者
吉田 理 (Yoshida, Osamu)
愛媛大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 70746809

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし