

令和元年6月13日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08472

研究課題名(和文) 肝星細胞のエピジェネティクス制御と肝線維化に関する検討

研究課題名(英文) Chip analysis for histone variants in activated hepatic stellate cells

研究代表者

池田 一雄 (Ikeda, Kazuo)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80275247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝星細胞は、類洞の周皮細胞として、ビタミンAを蓄える細胞であるが、肝障害時には、増殖し、細胞外マトリックスを産生し、肝線維化を引き起こす。本研究においては、ヒストンバリエントと肝星細胞活性化の関連について検討した。ゲノムワイドなChip-シークエンスを検討したが、星細胞活性化に関わる因子との直接的な関連は現時点では明らかにできていない。しかしながら、Chip DNAを用いたリアルタイムPCRでは、肝線維化マーカーの遺伝子発現と比例してヒストンバリエントの蓄積が、それぞれのマーカーの遺伝子座で確認できたため、今後さらなる解析を進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法は劇的な進歩を遂げているが、B型慢性肝炎や脂肪肝の一部が慢性肝炎化した脂肪性肝炎、NASHの画期的な治療薬はなく、これら慢性肝炎に引き続き肝硬変、肝癌を生じることがわかってきており、大きな社会問題となっている。エピジェネティクス制御と線維化に関連する遺伝子やマイクロRNAの発現制御の関連を明らかにすることができれば、未だ特出すべき治療法が開発されていない難治性疾患である肝硬変やその他の臓器線維症の創薬開発の可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Hepatic stellate cells work as sinusoidal pericytes and store vitamin A-associated lipid droplets. In liver injury, hepatic stellate cells proliferate and produce a large amount of extracellular matrixes. Stellate cells activation is an important event in pathology of liver diseases because it is believed to play a role in the development of fibrosis. In this study, we assessed the roles of histone variants H3.3 and H2A.Z in the activation of hepatic stellate cells. Chip analysis revealed that histone variants were accumulated in the regions of the genes, such as alpha-SMA and collagen1A2, in activated stellate cells. We also performed genome-wide chip-sequence in hepatic stellate cells. We have been still investigating the specific regions related to stellate cells activation.

研究分野：解剖学 臓器病理学

キーワード：肝星細胞 肝線維化 ヒストンバリエント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

臓器線維症は、いまだ特出すべき治療法が開発されていない難治性疾患の一つで、様々な臓器で慢性炎症や物理的負荷によってもたらされる疾患である。我々は、その中でも特に肝臓に注目し、肝臓の線維化過程に中心的な役割を果たすと考えられている肝星細胞の機能や活性化の分子機構のメカニズム解明のため、分離培養星細胞を用いて星細胞活性化に伴って変動する各種分子動態を遺伝子レベルおよび蛋白質レベルでの解析を行ってきた。また、星細胞の活性化の制御による肝線維化、肝硬変の治療を開発することを目標に、実験的に、血管内皮細胞増殖抑制剤、TNP-470 が肝星細胞の活性化を抑制することや膵炎の治療薬として使用されているセリンプロテアーゼインヒビターが TGF-beta の発現および活性を抑制することで、肝線維化を抑制すること、さらに、組み換えアデノウイルスベクターを用いてコラーゲンプロモーターによる細胞特異的遺伝子制御により肝線維化を抑制することを明らかにしてきた。

これまでの研究成果の集積から、我々が星細胞での発現をはじめて見いだした分子や活性化星細胞のマーカーとなる分子が、DNA アレイやプロテオミクスに代表される遺伝子解析とタンパク質解析で、発現が一致して変動することを確認してきたが、また同時にその発現が一致しない分子も認められる事実も確認している。そして、この発現の不一致に対する答えの手掛かりを示してくれるのがノンコーディング RNA の解析やエピジェネティックな解析であるのではないかと考え、まず最初にマイクロ RNA の肝星細胞における網羅的解析を進め、miR-29 がコラーゲン産生に、miR-195 が細胞増殖に関与すること、さらに、miR-221/222 が、臨床症例で、肝線維化の増強と正の相関を示すことを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、特に最近注目を集めるエピジェネティクス制御の観点から肝線維化に関わる細胞を、ヒストン 2A.Z やヒストン 3.3 といった遺伝子発現に直接関与するといわれているヒストンバリエーション領域を Chip シークエンスを用いて解析し、細胞の可塑性、線維化の責任細胞のオリジンに違いがあるかどうか、線維化領域に様々な heterogeneity を生み出すのかどうかを明らかにすること、クロマチンの動的変動と遺伝子機能制御の関連について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

使用した細胞は、ヒト肝星細胞の細胞株 (LX-2, HHSteC) とヒト皮膚線維芽細胞の細胞株 (RGB021) で、これらの細胞は 10% FBS 含 DMEM にて培養し、chip-sequence assay に用いられた。

#### Chip-Sequence Assay

ホルムアルデヒドを用い、タンパク質と DNA をクロスリンクさせた後、断片化には超音波処置と Micrococcal nuclease 処理の両方を用いた。クロマチンの免疫沈降には、抗 H2A.Z 抗体 (Active Motif)、抗 H3.3 抗体 (UBI)、simple Chip Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling) を用いた。

シークエンス解析には、イルミナ MiSeq をもちい、その後、統合部位のマッピングを行った。また、TGF-beta により肝星細胞の遺伝子発現を誘導し、Chip DNA 断片で、リアルタイム PCR により、alpha-SMA, Col1A2, Ppar-gamma 遺伝子座でのヒストンバリエーションの蓄積量を解析した。

### 4. 研究成果

Chip-Seq により、ヒストン 2A.Z の結合領域として同定した部位は、ヒト皮膚線維芽細胞 RGB021 で 389 部位、ヒト肝星細胞 LX2 で 485 部位の領域があり、その中で、LX2 特異的に結合が認められた領域は 11 部位存在した。また、ヒストン 3.3 の結合領域として同定した部位は、ヒト皮膚線維芽細胞 RGB021 で 419 部位、ヒト肝星細胞 LX2 で 398 部位の領域があり、その中で、LX2 特異的に結合が認められた領域は 9 部位存在した。

現時点までの解析では、直接、肝星細胞活性化につながる因子の同定には至っていないが、今後さらなる検討を必要とする。

rodent の分離肝星細胞実験で、活性化星細胞で発現の増強が認められた microRNA-23, 34, 125, 210, 214, 218, 221, 222 や活性化星細胞で発現の現象が認められた micro-19, 26, 92, 130, 143, 145, 191, 335 との直接的な関連についても見いだせなかった。

しかしながら、星細胞の活性化に伴ってその発現が変動する alpha-SMA, collagen1A2, Ppar-gamma の遺伝子座でのヒストンバリエーションの蓄積は、遺伝子の発現と同様に、その増減を示しており、今後もさらなる解析を進めていきたい。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Involvement of ERK1/2 activation in the gene expression of senescence-associated

secretory factors in human hepatic stellate cells.

Odagiri N, Matsubara T, Higuchi M, Takada S, Urushima H, Sato-Matsubara M, Teranishi Y, Yoshizato K, Kawada N, Ikeda K  
Molecular and Cellular Biochemistry 455(1-2), 7-19, 2019 査読有

Fibroblast growth factor 2 (FGF2) regulates cytoglobin expression and activation of human hepatic stellate cells via JNK signaling

Sato-Matsubara M, Matsubara T, Daikoku A, Okina Y, Longato L, Rombouts K, Le Thi Thanh T, Adachi J, Tomonaga T, Ikeda K, Yoshizato K, Pinzani M, Kawada N  
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 292(46), 18961-18972, 2017 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

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  
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  
第 124 回日本解剖学会総会 2019 年 3 月 29 日

四塩化炭素投与ラット肝炎モデルにおける肝星細胞活性化の検討  
原矢委子、黒田範行、井上孝二、松原勤、宇留島隼人、池田一雄、和氣健二郎、佐藤哲二  
第 124 回日本解剖学会総会 2019 年 3 月 29 日

肝星細胞活性化と肝障害 シンポジウム；肝臓、最新の話題と理論  
池田一雄、松原勤、宇留島隼人、湯浅秀人  
第 124 回日本解剖学会総会 2019 年 3 月 29 日

肝細胞 星細胞間接着と星細胞活性化との関連  
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  
第 32 回肝類洞壁細胞研究会 2018 年 12 月

脂肪性肝炎の進展における CYGB 保護作用の分子機序解析  
松原三佐子、翁良徳、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文  
第 32 回肝類洞壁細胞研究会 2018 年 12 月

TGFbeta1 reduces Cytoglobin expression via Smad2-SP3 pathway in human, but not mouse, hepatic stellate cells

Sato-Matsubara M, Okina Y, Matsubara T, Daikoku A, Fujii H, Rombouts K, Ikeda K, Yoshizato K, Pinzani M, Kawada N  
AASLD single topic conference; Hepatic fibrosis 2018 年 9 月

肝細胞と肝星細胞の共培養による肝星細胞の活性化抑制  
松原三佐子、松原 勤、宇留島隼人、大黒 敦子、池田 一雄、森浦芳枝、門野千穂、河田 則文、吉里 勝利  
第 25 回肝細胞研究会 2018 年 7 月

ヒト肝星細胞における脱活性化誘導制御機構の解明  
松原三佐子、大黒 敦子、松原 勤、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文  
第 54 回 日本肝臓学会総会 2018 年 6 月

ヒト肝星細胞における老化関連分泌因子の遺伝子発現解析  
松原 勤、小田桐直志、河田 則文、池田 一雄  
第 123 回日本解剖学会総会 2018 年 3 月 29 日

肝星細胞の spine を介した肝細胞との接着の意義  
宇留島隼人、松原勤、井上孝二、和氣健二郎、佐藤哲二、池田一雄  
第 123 回日本解剖学会総会 2018 年 3 月 29 日

ヒト肝星細胞の老化関連分泌表現型解析  
小田桐直志、松原 勤、河田 則文、池田 一雄  
第 31 回肝類洞壁細胞研究会学術集会 2017 年 11 月 24 日

肝星細胞における TGF-β1/Smad シグナルを介した Cytoglobin 発現制御機構  
松原三佐子、翁 良徳、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文  
第 31 回肝類洞壁細胞研究会学術集会 2017 年 11 月 24 日

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  
宇留島隼人、松原 勤、小田桐直志、池田 一雄  
第 31 回肝類洞壁細胞研究会学術集会 2017 年 11 月 24 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：松原 勤  
ローマ字氏名： Matsubara Tsutomu  
所属研究機関名：大阪市立大学  
部局名：大学院医学研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：20628698

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。