

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09365

研究課題名(和文) 肝線維化からみた肝発癌メカニズムの解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of HCC carcinogenic mechanism from the viewpoint of liver fibrosis and development of new treatment methods

研究代表者

野尻 俊輔 (NOJIRI, SHUNSUKE)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：50381843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト星細胞でATBF1や肝臓線維化に係るcollagen I, PDGFR, HNF1, AFP, TGF β , TNF α , PPAR α , PPAR γ 遺伝子及び蛋白レベルでの発現を確認した。ATBF1の強制発現とノックダウンによる各遺伝子の変化を観察した。ATBF1によるcollagen Iの有意な発現亢進とPDGFRの増加を認めた。これらはX線照射によるストレスによっても起こるがATBF1発現抑制するとこれらの反応が弱まった。肝線維化にATBF1が関与している可能性があることが示唆された。ATBF1ノックアウトマウスを作成中で完成次第in vivoでの実験を予定している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓病の終末病態である肝硬変は肝臓の星細胞の活性化によって起こる慢性の線維化が原因の一つとされている。これらは様々な肝臓にかかるストレスによって起こるがそのシグナル経路の一つがATBF1を介したcollagen Iの活性化によって起こることが細胞レベルで明らかになった。今後は動物実験で確かめることが必要であり今後この経路に着目した肝硬変の治療薬の開発につながる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the expression of ATBF1 and many genes that was concerned liver fibrosis such as collagen I, PDGFR, HNF1, AFP, TGF β , TNF α , PPAR α , PPAR γ . The change of each gene was observed by forced expression and knockdown of ATBF1. Significant increased expression of collagen I and PDGFR was observed by ATBF1 expression. These changes was observed by X-ray irradiation and these reactions weakened under ATBF1 expression suppression. ATBF1 knockout mouse is being created, and will be tested in vivo as soon as it is completed.

研究分野：肝臓

キーワード：ATBF1 肝臓線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変はコラーゲン産生の過剰が原因の一つでありまた高率に発癌する高危険群である。しかし線維化と発癌の直接の因果関係を証明した報告はない。ATBF1(別名 ZFH3)は広く細胞の増殖、分化に関わる因子として知られており、我々は ATBF1 により AFP を抑制し肝細胞増殖を抑制することを報告してきた。今回、網羅的解析により ATBF1 により誘導される因子として線維化に関係する因子の Collagen I、また肝癌発癌に重要な位置を占める PDGFR を同定した。

2. 研究の目的

肝硬変の成因のシグナル上の重要な因子として Collagen I が知られている。星細胞の活性化が起こり Collagen が産生されることにより肝臓線維化が促進される。X線、低酸素などのストレスにより肝臓の線維化が促進するがそのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究は ATBF1 による新たな肝臓の線維化制御メカニズム、肝癌発生の因果関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験は大きく分けて培養細胞による実験と動物実験の2通りの方法で行う。細胞実験は培養ヒト星細胞 LX-2 とヒト血管平滑筋細胞(PCS-100)及び肝臓内皮細胞(HEC)を使用する。初めに ATBF1 の強制発現系と siRNA による抑制系で線維化に関係する PPAR γ , TIMP1, MMP, AFP, TGF β , TNF α , collagen I, PDGFR(b), HNF1 の遺伝子発現を調べ ATBF1 関連シグナルを選定する。酸化ストレスには DNA 損傷モデルとして放射線刺激を使用する。最終的には血管内皮細胞と平滑筋細胞及び星細胞を共培養し VEGF による内皮細胞からの PDGF 放出を促した際の ATBF1 強制発現系及び抑制系での星細胞、平滑筋細胞の増殖能、遊走性を確認する。動物実験は Cre-Lox-PKO マウスに NASH モデルである STAM マウス作成法を併用し線維化、発癌に対する ATBF1KO の影響を観察する。最後にヒト肝癌組織を用い ATBF1 と関連遺伝子の蛋白発現、細胞内動態、遺伝子発現を検証する。

4. 研究成果

各種細胞を使用し候補因子の発現状態を確かめ ATBF1 発現量の変化による各遺伝子群の変化を確認した。内皮細胞においては ATBF1 の発現は確認できたがその強制発現系と遺伝子抑制系両者において他の遺伝子は多少の変化は見られたものの統計学的有意差は見られなかった。また平滑筋細胞では ATBF1, AFP 等の発現が見られなかった。

ヒト星細胞では PPAR γ , TIMP1, MMP, TGF β , TNF α , collagen I, PDGFR(b), HNF1 の遺伝子発現を確認した。そのうえで ATBF1 の変化による各種遺伝子変化を検討した。ATBF1 強制発現により collagen I, PDGFR(b)は上昇したが統計学的有意差を示したのは collagen Iのみであった。PPAR γ , TIMP1, MMP, TGF β , TNF α , HNF1 の遺伝子レベルでの変化はなかった。内皮細胞と星細胞の共培養系での VEGF による反応を検討したが共培養による星細胞の生存率が良くなくデータとして採用できなかった。

星細胞では ATBF1 の強制発現と siRNA を使用したノックダウンによる各遺伝子の変化を観察した(図1)。ATBF1 発現による collagen I の有意な発現亢進 (Control : ATBF1 強制発現, 1 : 1.88 \pm 0.18, P<0.001)と ATBF1 抑制による Collagen I の有意な発現低下 (Control : ATBF1 発現低下, 1 : 0.72 \pm 0.16, P=0.0051) を認めた。X線照射によるストレスによって

ATBF1、Collagen I の発現増加が起こるが ATBF1 の強制的な 90%発現抑制状態では Collagen I 発現反応が約 30%減弱した(Control : X-Ray 照射, $1 : 2.12 \pm 0.3$, $P < 0.001$), ATBF1 発現抑制下での(Control : X-Ray 照射, $1 : 1.43 \pm 0.23$, $P = 0.0032$)(図 2)。以上の結果よりストレスによる星細胞の Collagen I 発現の上流に ATBF1 が関係していることが示唆された。また siRNA による ATBF1 発現抑制は 90%と高く発現はほぼ抑制されていたにも関わらず Collagen I 発現の現象は 30%にとどまったため Collagen I の発現を規定するものは ATBF1 以外にも存在することが考えられた。

図 1

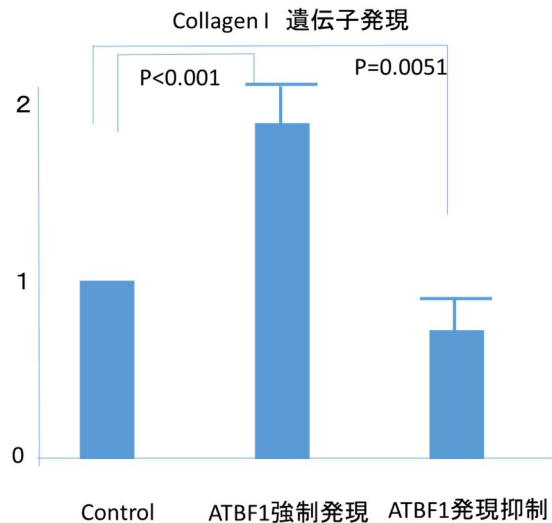
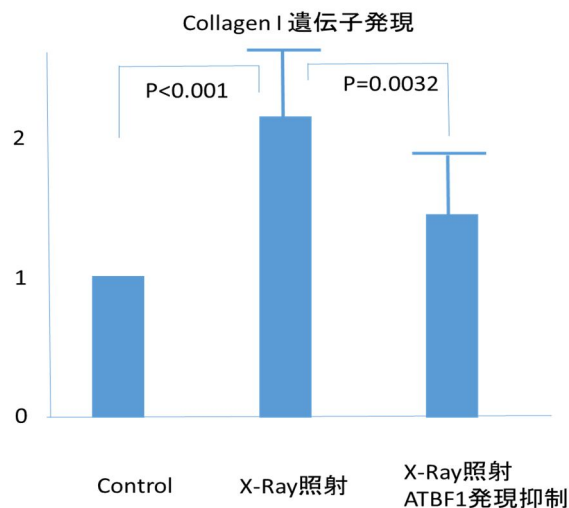


図 2



一方で肝細胞癌細胞では ATBF1 の強制発現は癌細胞増殖抑制に働くものの Collagen I 発現の変化は遺伝子的にも蛋白発現でも差がなかった。X-Ray 照射により肝癌細胞の増殖抑制を認め ATBF1 の増加や AFP の低下を確認した。この様に細胞種により ATBF1 によるシグナル伝達の違いが明らかになった。ATBF1 は肝臓を構成する細胞の種類によって異なった反応を示し星細胞では細胞ストレスによる線維化を促進し、一方肝細胞癌では抑制的に働く 2 面性をもつことが示唆された。現在 ATBF1 ノックアウトマウス作成中でありヘテロからホモマウスができつつある。完成次第 in vivo での実験を予定

し線維化と発癌の関係を検証する予定である。

当研究により肝硬変の新たな線維化メカニズムが解明された。ATBF1 が様々なストレスによる肝臓線維化促進に関して非常に重要な役割を担っている可能性が示唆され今後 ATBF1 を介した Collagen I 抑制による肝臓の線維化治療に発展できるように研究を継続していく必要がある。

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 0件）

1. 著者名 NOJIRI S, Fujiwara K, Shinkai N, Iio E, Joh T	4. 巻 33
2. 論文標題 Effects of branched-chain amino acid supplementation after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: A randomized trial.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nutrition	6. 最初と最後の頁 20-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nut.2016.07.013.	査読の有無 有
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0件

〔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 分 担 者	三浦 裕 (MIURA YUTAKA) (90285198)	至学館大学・健康科学部・教授 (33909)	