

令和元年6月21日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15952

研究課題名(和文)細胞外ATPによる肝星細胞の活性化、肝線維化進展機序の解明

研究課題名(英文) Role of extracellular ATP on Hepatic stellate cell activation and liver fibrosis development

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝星細胞(LX-2細胞)におけるP2X7の発現をRT-PCR、ウエスタンブロットにて確認した。しかし、ATPによるP2X7を介した肝星細胞の活性化は確認できなかった。P2X7ノックアウトマウスに線維化を誘導することに成功したが、WTマウスとの差は見られなかった。一方、肝星細胞が分泌する液性因子が肝細胞癌の増殖、進展に寄与することを明らかにした。肝星細胞の液性因子の分泌を、肝星細胞上のProtein Kinase Rが制御していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝星細胞の活性化における細胞外ATP、P2X7の役割を明らかにすることはできなかった。一方で、肝細胞癌の進展に肝星細胞が分泌する液性因子が寄与することを明らかにした。さらに肝星細胞の液性因子分泌はPKRが制御することを明らかにした。この成果は、肝硬変患者における肝細胞癌の進展機序の解明にみならず、新規治療薬の標的となる可能性を秘めている。肝星細胞におけるPKRの役割をさらに追及することで、肝の線維化に対する新しい治療法の開発も可能とする可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：P2X7, extracellular ATP receptor, expression on hepatic stellate cell(HSC) was confirmed by RT-PCR and Western blotting assay. However, HSC activation by ATP was not mediated by P2X7. Although liver cirrhosis model was established on P2X7 knockout mouse, the severity of fibrosis was similar with wild type.

We have found that soluble agent from HSC promoted HCC development. Further the HCC development was regulated by protein kinase R(PKR) on HSC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝星細胞 細胞外ATP P2X7 PKR

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

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を促す。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、現在、HCV 排除後の線維化肝からの発癌 (SVR 後発癌) が新たな問題となっている。また、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、pericellular fibrosis や perivenular fibrosis などの多彩な線維化を示し、近年、肝硬変、肝癌の原因として増加傾向にある。すなわち、肝の線維化は、肝不全のみならず、肝癌の母地となりうる。そのため、肝臓の線維化の機序の解明と肝線維化に対する治療法の確立が求められる。

肝の線維化では、免疫担当細胞、肝星細胞の活性化が病態の中心となる。肝臓の炎症は、肝炎ウイルス、細菌などの病原体 (pathogen associated molecular patterns、PAMPs) や傷害肝細胞より放出された傷害細胞由来分子 (damage associated molecular patterns、DAMPs) が、免疫担当細胞を刺激することに起因する。申請者は、肝細胞傷害時に自己 DNA が放出され、自己 DNA が DAMP として形質細胞様樹状細胞を刺激、IFN- α 産生を促すことを報告した Yoshida O, Castellaneta A, et al. *Hepatology*.2014;60:267-77。免疫担当細胞より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。

ATP (adenosine triphosphate) は、全ての細胞内に存在し、細胞活動のエネルギー源として利用される。恒常状態の細胞外 ATP 濃度は 10nM 以下で維持されるが、細胞傷害により ATP が細胞外に放出されると、細胞外 ATP 濃度は 100nM 以上に上昇する。細胞外 ATP は DAMP として働き、免疫担当細胞を遊走、活性化、炎症性サイトカイン産生を促し、炎症の形成・持続に關与する。申請者は、細胞外 ATP 分解酵素である CD39 に着目し、肝樹状細胞が CD39 を発現し、CD39 が肝虚血再灌流障害 Yoshida O, et al. *Hepatology*.2013;58:2163-75、肝移植後の拒絶反応の軽減 Yoshida O, et al. *Transpl Immunol*.2015;32:76-83.に寄与することを報告した。現在、肝星細胞の活性化と肝線維化における CD39 の役割を明らかにする研究に従事する。その経過で、肝星細胞が細胞外 ATP のレセプターである P2X7 を発現し、細胞外 ATP 刺激にて活性化することを見出した。ATP のレセプターは 10 種類以上存在するが、P2X7 は各種免疫担当細胞に発現し、P2X7 のみが 100nM 以上の高濃度で作動するため、P2X7 が細胞傷害の際の細胞外 ATP 感知の中心と考えられている。また、P2X7 を介した ATP 刺激は、炎症で重要なインフラマソームのセカンドヒット経路として注目されている。

2. 研究の目的

ATP を含む DAMP による肝星細胞の活性化の機序は不明な点が多く、本研究では、細胞外 ATP が P2X7 を介し、肝星細胞を活性化、肝の線維化への関与を明らかにすることを目的とする。また、肝星細胞上のインフラマソームとインフラマソームの制御における P2X7 の役割を明らかにする。さらに、P2X7 をターゲットとした肝の抗線維化療法の開発に挑む。

3. 研究の方法

1) マウス肝星細胞における P2X7 の発現と ATP による肝星細胞活性化の確認

肝星細胞の分離

マウス肝星細胞の分離は、交流のある Columbia 大学 Shwabe 教授のグループの分離プロト

コール (Mederacke I, et al. Nat Protoc.2015;10:305-315) に従う。申請者らはマウス肝星細胞分離法を習熟している。

肝星細胞における P2X7 の発現の検討

分離した肝星細胞に発現する P2X7 を免疫蛍光染色、RT-PCR、ウェスタンブロットにて確認する。

肝星細胞の活性化

分離した肝星細胞を ATP (100nM)、TGF- β (2.5nM)で刺激し、肝星細胞の活性化マーカー (α SMA、MIP-1、collagen I 等) の発現を RT-PCR、ELISA、ウェスタンブロットで確認する。

肝星細胞におけるインフラマソームの検討

肝星細胞を ATP で刺激し、インフラマソームに関与する分子であり、ASC、NLRP3、caspase-1 の発現について、RT-PCR、ウェスタンブロットにて検討する。

2) 肝線維化における P2X7 の役割

肝線維化モデルマウスは当教室にて確立しており、WT マウスと P2X7KO マウスに四塩化炭素 (1 μ L/g body weight、腹腔内投与、3 回/週、10 週間) を投与し、WT マウス、P2X7KO マウスにおける線維化の程度を比較、肝線維化における P2X7 の役割を検討する。また、WT マウスと P2X7KO マウスから肝星細胞を分離し、機能解析を行い、肝星細胞における P2X7 を検討する。

肝線維化と肝障害の評価

肝の線維化はアザン染色、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 α SMA の染色と、 α SMA、MIP-1、collagen I の組織の発現を RT-PCR にて検討する。

3) ヒト肝星細胞における P2X7 の役割の検討

ヒト肝星細胞における P2X7 の発現と ATP 刺激の検討

ヒト初代肝星細胞 (HHSteC) とヒト肝星細胞株 (LX-2) を用いる。

- ・ P2X7 の発現、ATP 刺激による活性化はマウスの実験同様、免疫蛍光染色、RT-PCR、ウェスタンブロットにて確認する。

ヒト肝星細胞における P2X7 の発現抑制実験

HHSteC、LX-2 に SiRNA を用いて P2X7 をノックダウンする。

P2X7 をノックダウンしたヒト肝星細胞を TGF- β 、ATP で刺激し、肝星細胞の活性化、collagen I 産生能を検討し、ヒト肝星細胞における P2X7 の役割を検討する。

4) 細胞外 ATP、P2X7 をターゲットとした線維化治療の検討

抗線維化治療として、細胞外 ATP 分解酵素、P2X7 レセプター阻害剤を用いる

in vitro での検討

ヒト肝星細胞、マウス初代肝星細胞を TGF- β 、ATP で刺激、活性化する際に細胞外 ATP 分解酵素もしくは P2X7 レセプター阻害剤を添加し、肝星細胞の活性化抑制、コラーゲン産生抑制について検討を in vitro にて行う。

In vivo での検討

WT マウスに四塩化炭素投与と同時に細胞外 ATP 分解酵素、P2X7 レセプター阻害剤を投与し、肝線維化の抑制について組織学的に検討する。

また、細胞外 ATP 分解酵素、P2X7 レセプター阻害剤を投与した線維化モデルマウスから、肝星細胞を分離し、in vivo における肝星細胞の活性化抑制能を検討する。

4 . 研究成果

(1) 肝星細胞株 (LX-2) における P2X7 の発現と ATP 刺激による活性化

LX-2 細胞における P2X7 の発現を RT-PCR とウエスタンブロットにて確認した。しかし、ATP 単独刺激、TGF- β と ATP の共刺激にて、LX-2 細胞の活性化は確認できなかった。

(2) 肝星細胞における P2X7 と線維化における役割

P2X7 ノックアウトマウスを購入し、繁殖に成功した。P2X7 ノックアウトマウス、野生株マウスに四塩化炭素を投与し、肝の線維化を誘導した。両群とも肝の線維化がみられたが、肝の線維化の程度については、P2X7 ノックアウトマウス、野生株マウスの間に有意差はみられなかった。また、線維化肝におけるコラーゲン 1 α 、 α SMA の発現量を RT-PCR にて比較したが、P2X7 ノックアウトマウス、野生株マウスの間に有意差は見られなかった。P2X7 ノックアウトマウス、野生株マウスから肝星細胞を分離し、ATP、LPS、TGF- β で刺激したが、分離肝星細胞のコラーゲン 1 α 、 α SMA の発現量には両群間で有意差は見られなかった。

(3) 肝星細胞におけるインフラマソームの検討

LX-2 細胞における ASC、NLRP3 の発現は RT - PCR にて確認した。しかし、ASC、NLRP3 発現量と LX-2 の活性化、IL-1 β 産生量との関連を見出すことはできなかった。

(4) 細胞外 ATP、P2X7 をターゲットとした治療法の開発

In vitro、in vivo の実験にて、肝線維化、肝星細胞の活性化における、P2X7 と ATP の役割について証明することができず、治療開発の実験に移行できなかった。

(5) 肝星細胞活性化における Protein Kinase R (PKR) の役割

肝星細胞 (LX-2) における PKR の発現を RT-PCR、ウエスタンブロットにて明らかにした。また、LX-2 細胞を LPS、TGF- β で刺激すると PKR の発現が亢進し、PKR の発現を阻害剤、SiRNA にて抑制すると LPS、TGF- β 刺激による LX-2 細胞の活性化が抑制されることを明らかにした。さらに、LX-2 細胞の分泌物が肝細胞癌の増殖を促進し、LX-2 細胞上の PKR を抑制すると、その作用が抑制され、肝星細胞が肝癌の進展に寄与することを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Imai Y, Yoshida O, Watanabe T, Yukimoto A, Koizumi Y, Ikeda Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y. Stimulated hepatic stellate cell promotes progression of hepatocellular carcinoma due to protein kinase R activation. PLoS One. 2019 Feb 22;14(2):e0212589. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

1. 今井祐輔、吉田理、行本敦、渡辺崇夫、小泉洋平、徳本良雄、廣岡昌史、阿部正雄利、日浅陽一 . 肝星細胞における Protein Kinase R が肝細胞癌の進展に及ぼす影響 : 第 32 回肝臓洞壁細胞研究会 , 2018 年 11 月 30 日 , 東京
2. Yoshida O, Abe M, Sunago K, Yukimoto A, Imai Y, Nakamura Y, Watanabe T, Koizumi Y, Hirooka M, Kumagi T, Hiasa Y. Validation of the GLOBE Score and the UK-PBC Score in Japanese Patients of PBC. 27th Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, New Delhi, March 14, 2018

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：今井祐輔

ローマ字氏名：Imai, Yusuke

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。