

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07952

研究課題名(和文) 肝がんにおける肝星細胞形質転換の意義

研究課題名(英文) Significance of hepatic stellate cell transformation in liver cancer.

研究代表者

松原 三佐子(佐藤) (Sato-Matsubara, Misako)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：00635120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：サイトグロビン(CYGB)は肝内では肝星細胞(HSC)にのみ発現しガス結合能を有するタンパク質であり、CYGB欠損が線維化・発がんに関与する。しかし、活性化HSCにおけるCYGBの生理作用および発現制御機構は不明であった。本研究では、肝線維化の進展に伴い、CYGBの発現量が低下すること、TGF- β がpSMAD2/SP3-M1経路を介してCYGBの発現を抑制することを明らかにした。さらに、CYGB発現の低い患者では、酸化的DNA損傷が増加することが分かり、CYGBが酸化ストレスで生じるDNA損傷から細胞を保護する役割があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣の西欧化に伴い肥満や糖尿病と関連する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は増加しており、本邦でも100万人に達する。慢性肝炎は肝線維化を誘発し、多くは不顕性に、且つ、緩徐に進行して肝硬変や肝がんを呈した末期状態で発見される。病因の如何によらず肝がんの母地は肝硬変であることが殆どである。そのため、肝線維化の病態進展を理解し、その原因細胞と考えられる活性化肝星細胞を標的とした新たな治療薬の開発が急務である。本研究では、このHSC特異的に発現するCYGBの発現制御機構を明らかにし、分子基盤に基づいた抗線維化および抗肝がん治療法の開発に繋げる。

研究成果の概要(英文)：Liver fibrosis is an intractable disease that, if left untreated, progresses to cirrhosis, of which 2-8% develop liver cancer. Cytoglobin (CYGB) is a protein that is expressed only in hepatic stellate cells (HSC) in the liver and has gas-binding ability. Interestingly, CYGB deficiency in HSC causes fibrosis and carcinogenesis. However, the physiological action and regulation of CYGB expression in activated HSC were unknown. In this study, we found the level of CYGB decreased with the progress of liver fibrosis. TGF- β , an HSC activation inducer, suppressed the expression of CYGB via the pSMAD2/SP3-M1 pathway. In addition, patients with low CYGB expression were found to have increased oxidative DNA damage, demonstrating that CYGB has a role in protecting cells from DNA damage caused by oxidative stress.

研究分野：分子生物学、肝臓学

キーワード：活性化肝星細胞 サイトグロビン 線維化 非アルコール性脂肪性肝炎 TGF-

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣の西欧化に伴い肥満や糖尿病と関連する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は増加しており、本邦でも 100 万人に達する。慢性肝炎は肝線維化を誘発し、多くは不顕性に、且つ、緩徐に進行して肝硬変や肝がんを呈した末期状態で発見される。そのため、肝がんの早期発見と新たな治療薬の開発が急務である。病因の如何によらず肝がんの母地は肝硬変であることが殆どである。肝硬変とは、肝実質が活性化された星細胞 (HSC) や筋線維芽細胞などの間質細胞で置換されて I 型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス物質が蓄積した慢性の線維化病であり、年率 8% で肝がんが発生する。がん組織におけるがん細胞の占める割合は 30% 程度と考えられ、間質が多いがんは悪性度が高いという報告がある。また、肝がん微小環境における HSC は Cancer associated fibroblasts (CAFs) として腫瘍細胞と相互に作用して増殖力を増し、種々の遺伝子の転写活性が亢進している。さらに、近年、細胞老化を起こした HSC の蓄積ががん微小環境の一因であるという報告がなされた。がん微小環境の形成はがんの悪性化や薬剤耐性の原因となることが知られており、微小環境の特徴を利用し治療薬の開発に繋げる試みがなされている。こうした中、我々は肝内で HSC に特異的に発現しガス結合能を有するサイトグロビン (Cytoglobin, CYGB) を発見しその機能解析を継続した。その結果、CYGB 欠損 (KO) マウスを用いた解析により CYGB が肝の炎症・線維化・発がんに関与することを見出した (Am J Pathol. 2015;185:1045-60, Sci Rep. 2016;24990)。これらは、CYGB の欠損により HSC の活性化形質が変化した結果、酸化ストレス制御の喪失と細胞老化制御の破綻によりがんの発生や生育に至適な微小環境を提供するとの可能性を示唆する。依って線維化肝からの発がん抑止には CYGB の肝恒常性維持作用を利用し、HSC を中枢に据えた肝細胞、免疫細胞等との細胞間ネットワーク再構築が重要であると考え、CYGB 欠損による遺伝子変動を手掛かりとし、新規抗線維化治療薬および抗肝がん治療法の開発を目指した分子基盤研究を遂行した。

2. 研究の目的

本研究で使用される HHSteC 細胞 (ScienCell 社) は正常肝臓から樹立されたヒト星細胞株であり、同社の培養液およびサプリメント中で静止期 HSC として機能を保持した状態 (CYGB 高発現、 α SMA 低発現) での培養が可能である (Sato-Matsubara M, et al. J Biol Chem. 2017)。また、活性化誘導因子である Transforming growth factor-beta (TGF- β) は、 α SMA やコラーゲンの産生を誘導し、HHSteC 細胞の活性化を促す。しかし、活性化 HSC における CYGB の役割は不明であった。申請者は HHSteC 細胞における形質の変化を指標とし、TGF- β による CYGB の発現制御機構を調べ、NASH の病態進展における CYGB の抗酸化作用と分子制御機構について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト組織標本：大阪市立大学医学部附属病院の肝胆膵病態内科にて非アルコール性脂肪性肝疾患の患者 (NAFLD)/非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と診断された組織標本を用いて HE、シリウスレッド染色および免疫染色を行った。

細胞培養：ScienCell 社より購入した初代 HSC 細胞株 (HHSteC) と University College London より空輸便で送られる初代ヒト HSC 細胞 (primary hHSCs) は 2% FBS/SteCM に付属の Supplement を添加した培養液で培養した。

In vitro 実験：HHSteC 細胞、初代ヒト HSC 細胞ともに 1×10^5 細胞/ml を SteCM コンプリート培養液で播種し、翌日 2% FBS/SteCM、Supplement なしに置換した。リコンビナントヒト TGF- β

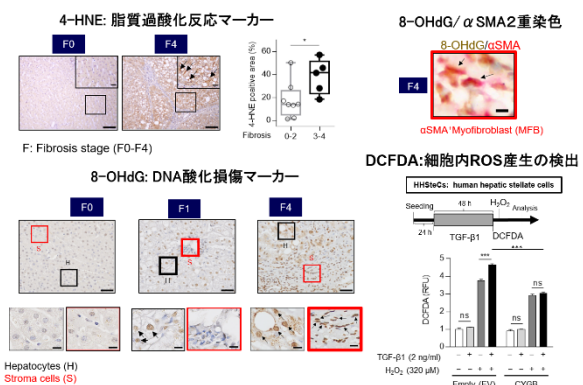
は濃度依存性実験を行った上で至適濃度を算出した (2 ng/ml)。DNA 酸化損傷マーカーである 8-OHdG の ELISA および免疫染色を行った。ELISA 法は DNA を DNA Extract WB kit (Wako) で抽出し、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-OHdG/8-oxo-dG) に特異的な抗体を使用した ELISA キット (JaICA) で細胞 DNA 内の 8-OHdG を測定した。細胞内の酸化ストレス誘導には過酸化水素(H₂O₂)を使用した。リコンビナント電子スピン共鳴 (ESR) を用いて CYGB のヒドロキシラジカル(\cdot OH)に対する捕食能を測定した。コントロールには既知の抗酸化物質であるグルタチオンを使用した。

ChIP 解析: ChIP 法は、SimpleCHIP Enzymatic Chromatin IP kit (Cell Signaling Technology) を用いて行った。TGF- β (2 ng/ml) で HHStcC 細胞を 6 時間処理し 37%ホルマあるデヒドで固定した後 ChIP Buffer で細胞を回収した。クロマチン断片化確認後 Input コントロールとして同量各サンプル (2%相当) を ChIP Buffer から採取し、残りを Anti-SP1 または SP3 rabbit 抗体 (Cell signaling Technology) と反応させクロマチン免疫沈降を行った。DNA の定量化には PCR 法を用いて Input クロマチン量に対する IP クロマチン量の割合で算出した。

組織免疫染色: 細胞は 4%パラホルムアルデヒドで肯定し、脂質過酸化反応マーカー Anti-4-HNE (), Anti-8-OHdG (1:100, JaICA), Anti-human CYGB 抗体 (1:300, In house)、anti-human α SMA 抗体 (1:200, DAKO)、Anti-SMAD2 (1:100, Cell signaling Technology) で一晩反応した。蛍光染色用の二次抗体には Alexa Flour 594-conjugated goat anti-rabbit と Alexa Flour 488 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:500, Thermo Fisher Scientific)を使用した。DAPI で核染色後封入し、BX-X710-All-in One Fluorescence Microscope (Keyence)で検鏡した。

4. 研究成果

まず、4-HNE および 8-OHdG 抗体の免疫染色について、線維症の段階が異なる (Fibrosis stage; F1-F4) ヒト NAFLD/NASH 標本で免疫組織化学を行った。既報と同様、脂質過酸化の最終産物である 4-HNE は、間質細胞ではなく肝細胞のみ陽性を示し、高度線維化症 (F3, F4) で有意に増加した。酸化的 DNA 損傷のマーカーである 8-OHdG は、非線維性組織 (F1, F2) は陰性、F4 では、肝細胞だけでなく間質細胞も 8-OHdG に対して強く陽性であり、それらの 8-OHdG 陽性細胞は α SMA にも陽性を示した。これらの観察から、進行した線維症の間質にある線維芽細胞が DNA 損傷に対して脆弱になるという仮説を立てた。そこで、DCFDA 法を用いて HHStcC 細胞内の ROS 量を測定した。細胞を播種後、TGF- β で 48 時間前処理して活性化させ、洗浄してから H₂O₂ に暴露した。結果、H₂O₂ は細胞内 ROS を増加させたが、TGF- β 処理では増加が認められなかった。しかし、TGF- β を予め処理した HHStcC 細胞では H₂O₂ 暴露後細胞内 ROS の顕著な増加がみられた。これは、活性化された HSC が酸化ストレスの影響を受けやすいことを示唆している。さらに、CYGB の過剰発現は細胞内 ROS を減少させた (右図)。



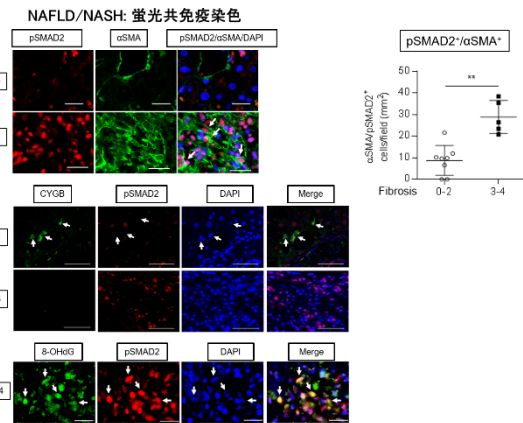
TGF- β は、既知の細胞内抗酸化物質の中で、CYGB を最も減少させることが分かった。そこで、CYGB の生理学的機能を調べるため、 \cdot OH 特異的蛍光プローブを用いて以下の実験を行った。TGF- β で活性化された HHStcC 細胞は、H₂O₂ 暴露により、DCDA アッセイの結果と同様、細胞内 \cdot OH の蓄積を最も誘導することが分かった。また、CYGB の過剰発現は、細胞内 \cdot OH を大幅に減少させた。

次に、電子スピン共鳴を使用して CYGB の \cdot OH に対する捕食能を調べたところ、1 nmol rhCYGB

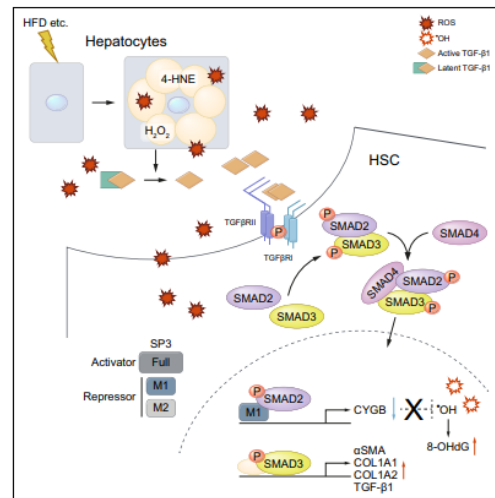
の $\cdot\text{OH}$ 除去活性は 4.05 μmol グルタチオン相当であった。また、8-OHdG ELISA の結果、CYGB の過剰発現が HHStcC 細胞の DNA 損傷を減衰させることが分かった。

複数の実験系を通して、TGF- β はヒト HSC のみ CYGB の発現を抑制し、マウスの CYGB 発現には影響を及ぼさないこと、TGF- β は細胞内シグナル分子である SMAD2 を介し SMAD2 が CYGB のプロモーター領域内の SP1/3DNA 結合サイトへ SP3 のアイソフォーム M1 をリクルートすることで CYGB の発現を転写抑制することが分かった。

ヒト NAFLD/NASH 組織を用いて HE、シリウスレッド、および免疫染色を行った。線維症の進行に伴い、シリウスレッドと SMA のリン酸化 SMAD2 の陽性像が間質細胞で有意に増加した。さらに、線維症の病期分類において、CYGB の陽性細胞数が有意に減少した。同検体を用いて、共免疫染色を行った結果、pSMAD2⁺/SMA⁺細胞は F0-2 に比べ、F3-4 で有意に増加し、CYGB⁺/pSMAD2⁺細胞は存在しないことから、活性化 HSC は CYGB 陰性であることが示唆された。また、DNA 損傷マーカーである 8-OHdG⁺/pSMAD⁺細胞が F4 で多数確認されたことから活性化 HSC は酸化ストレスに対して脆弱であるという私の仮説を裏付ける結果がヒト NASH 組織検体にて示された (右図)。



本研究は、(1) ヒト NASH 肝組織において過剰に蓄積した ROS が HSC の DNA 損傷を惹起した、(2) CYGB は OH に対して捕食能を有し、ヒト HSC の 8-OHdG 生成を減弱させた、(3) TGF- β による CYGB の発現抑制は細胞の酸化 DNA 損傷を誘導した、(4) TGF- β は pSMAD2/SP3-M1 経路を介してヒト CYGB の発現を抑制した、ことを見出し *Journal of Hepatology* に報告した (右図、Graphic abstract)。この結果から DNA 損傷を受けた HSC が肝細胞を含む周辺の細胞にどのような影響を与えるかを調べるため、引き続き遺伝子改変マウスおよび細胞を用いた実験を行っている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinori Okina, Misako Sato-Matsubara, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku, Lisa Longato, Krista Rombouts, Le Thi Thanh Thuy, Hiroshi Ichikawa ⁵ , Yukiko Minamiyama ⁶ , Mitsutaka Kadota ⁷ , Hideki Fujii, Masaru Enomoto, Kazuo Ikeda, Katsutoshi Yoshizato, Massimo Pinzani, and Norifumi Kawada	4. 巻 -
2. 論文標題 TGF- β -driven reduction of cytoglobin leads to oxidative DNA damage in stellate cells during non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2020.03.051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Odagiri N, Matsubara T, Higuchi M, Takada S, Urushima H, Sato-Matsubara M, Teranishi Y, Yoshizato K, Kawada N, Ikeda K.	4. 巻 455
2. 論文標題 Involvement of ERK1/2 activation in the gene expression of senescence-associated secretory factors in human hepatic stellate cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem.	6. 最初と最後の頁 7-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-018-3466-x	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 該当する
1. 著者名 Kozuka R, Enomoto M, Sato-Matsubara M, Yoshida K, Motoyama H, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N, Murakami Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Association between HLA-DQA1/DRB1 polymorphism and development of hepatocellular carcinoma during entecavir treatment.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 937-946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14454	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 該当する
1. 著者名 松原三佐子, 吉里則文, 河田則文	4. 巻 51
2. 論文標題 肝星細胞の活性化の仕組み、サイトグロビンの作用から見えてくる新しい視点	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 530-534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yoshinori Okina, Misako Sato-Matsubara, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku, Hideki Fujii, Kazuo Ikeda, Katsutoshi Yoshizato, Massimo Pinzani, Norifumi Kawada
2. 発表標題 Downregulation of Cytochrome P450 by TGF-β Leads to Hydroxyl Radical-induced Oxidative DNA Damage in Human HSCs.
3. 学会等名 JSH international Liver Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Misako Sato-Matsubara, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku, Kazuo Ikeda, Katsutoshi Yoshizato, Norifumi Kawada
2. 発表標題 Identification of Lawsone as an Anti-fibrotic Agent based on High-Throughput Screening System with Human COL1A2 Promoter Activity.
3. 学会等名 JSH international Liver Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Masaru Enomoto, Yutaka Yasui, Misako Sato-Matsubara, Yoshihiro Ikura, Akihiro Tamori, Ritsuzo Kozuka, Etsushi Kawamura, Atsushi Hagihara, Hideki Fujii1, Sawako Uchida-Kobayashi, Yoshiaki Murakami, Norifumi Kawada
2. 発表標題 Histological Evaluations after Achieving a Sustained Virologic Response to Direct Acting Antiviral Treatment for Chronic Hepatitis C in a Short Term
3. 学会等名 JSH international Liver Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Misako Sato-Matsubara, Yoshinori Okina, Tsutomu Matsubara, Atsuko Daikoku1, Krista Rombouts, Le Thi Thanh Thuy, Hideki Fujii1, Kazuo Ikeda, Katsutoshi Yoshizato, Massimo Pinzani, and Norifumi Kawada
2. 発表標題 TGF-β1 transcriptionally repressed cytochrome P450 expression and enhanced H2O2-induced oxidative DNA damage in activated HSCs.
3. 学会等名 JSH international Liver Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 翁良徳、松原三佐子、藤井 英樹、河田 則文
2. 発表標題 TGF- β とサイトグロビンの拮抗作用はヒトNASHにおける星細胞活性化と肝線維化に影響する
3. 学会等名 第55回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤井 英樹、松原三佐子、河田 則文
2. 発表標題 マウス脂肪肝炎モデルにおける加齢の影響
3. 学会等名 第55回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松原 三佐子、谷口 絵美、松原 勤、宇留島隼人、大黒 敦子、森浦 芳枝、門野 千穂、池田 一雄、和氣健二郎、河田 則文、吉里 勝利
2. 発表標題 直接的細胞接着に依存する肝細胞と星細胞の緊密な相互作用
3. 学会等名 第26回 肝細胞研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 大黒 敦子、松原 勤、松原三佐子、池田 一雄、河田 則文
2. 発表標題 LawsoniaはヒトCYGB遺伝子発現誘導作用を持つ抗線維化化合物である
3. 学会等名 第43回 日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 川村 悦史、松原 勤、出口 早苗、樋口 萌、高田さゆり、大黒 敦子、伊藤 得路、木下 正彦、松原三佐子、小田桐直志、田中 肖吾、竹村 茂一、村上 善基、榎本 大、田守 昭博、久保 正二、祝迫 恵子、池田 一雄、河田 則文
2. 発表標題 若年胆管癌組織を使った癌抑制遺伝子の探索
3. 学会等名 第26回 肝細胞研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 松原三佐子、翁 良徳、松原 勤、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文
2. 発表標題 肝線維化病態進展におけるCYGB保護作用の分子機序解析
3. 学会等名 日本臨床分子形態学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 翁 良徳、松原三佐子、松原 勤、大黒 敦子、池田 一雄、吉里 勝利、河田 則文
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎におけるCytoglobin発現制御機構
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学 http://www.med.osaka-cu.ac.jp/liver/research/index.shtml</p>
--

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	松原 勤 (Matsubara Tsutomu) (20628698)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関