

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15828

研究課題名（和文）新規肝線維化治療薬開発を目指したPiezo1チャネルの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Piezo1, aimed to develop new therapeutic drug of liver fibrogenesis.

研究代表者

鈴木 裕可 (Suzuki, Hiroka)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：00581026

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）：肝星細胞において、機械刺激受容チャネルであるPiezo1が機能発現することを明らかにし、transforming growth factor- β （TGF- β ）がPiezo1の機能発現に及ぼす影響を検討した。また、Piezo1活性化薬がTGF- β 刺激による肝星細胞の活性化に及ぼす影響を検討した。さらに、肝星細胞におけるPiezo1の細胞内局在を明らかにし、活性化肝星細胞における、細胞内カルシウム濃度上昇による収縮能についても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝星細胞は肝線維化進展において非常重要的な役割を担っている。そのため、肝星細胞の細胞機能を解析することは、肝線維化治療および肝硬変など様々な肝疾患治療につながる。本研究によりPiezo1が肝線維化に及ぼす影響を明らかにすることで、新たな肝線維化治療薬開発につながることを期待される。また、未だ不明な点が多いPiezo1について新たな知見が得られると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We showed that functional expression of Piezo1 in hepatic stellate cells and examined the effect of transforming growth factor- β (TGF- β) to functional expression of Piezo1. Also, we investigated the effect of Piezo1 agonist to activation of hepatic stellate cells by TGF- β . Furthermore, we found out intracellular localization of Piezo1 in hepatic stellate cells and investigated contractile activity of activated hepatic stellate cells caused by enhancement of intracellular Ca²⁺ level.

研究分野：薬理学

キーワード：Piezo1チャネル 肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は、類洞内皮細胞と肝細胞の間に存在するディッセ腔に位置し、類洞内皮を長い突起で取り巻く細胞である。肝星細胞は肝臓傷害時に活性化され、肝線維芽細胞に形質転換し細胞外マトリックスを産生することで、肝線維化進展に重要な役割を果たす。また、肝線維化の進展過程において肝星細胞がさまざまな表現型を示すことが報告されている。すなわち肝線維化における肝星細胞の機能を明らかにすることは、肝線維化治療の発展に重要である。

肝線維化とは、肝臓において細胞外マトリックスの合成と分解のバランスが崩れ、細胞外マトリックスが肝臓に蓄積している状態である。肝線維化が高度に進展した病態が肝硬変であり、肝細胞癌などの生命予後を大きく左右する。また、肝線維化が進んだ状態ほど肝細胞癌の発生率が増加することから、肝線維化進展の抑制は肝疾患に重要である。肝線維化治療については、インターフェロンや小柴胡湯などの漢方薬、ウルソデオキシコール酸、グリチルリチン、ステロイドなどが使用されているが、肝線維化抑制作用が限定的かつ長期使用が困難である。そのため、新たな肝線維化治療薬の開発は急務であり、肝線維化の機序の解明が期待される。

2. 研究の目的

肝星細胞は肝線維化進展において非常重要的な役割を担っている。そのため、肝星細胞の細胞機能を解析することは、肝線維化治療および肝硬変など様々な肝疾患治療につながる。

これまでに、肝星細胞が炎症・肝細胞壊死・肝細胞障害により生じた TGF- β や platelet derived growth factor (PDGF) の刺激を受けることにより活性化肝星細胞となり、細胞外マトリックスを産生することで肝線維化に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。

申請者はこれまでに、ヒト肝星細胞である LX-2 に Piezo1 チャンネルが機能発現することを見出し、本研究では肝星細胞における Piezo1 の機能解析を目的として、研究を行った。

肝星細胞において Piezo1 チャンネルが細胞機能に及ぼす影響を検討することは、肝線維化の新たな機序を解明することにつながると期待でき、新たな肝線維化治療薬開発につながることを期待される。さらに、Piezo1 チャンネルはまだその存在や機能があまり明らかとなっていない機械刺激受容チャンネルである。本研究により肝における Piezo1 チャンネルの機能についての新たな知見が得られると考えられ、今後 Piezo1 チャンネルの機能解析についての研究に大きな貢献を遂げると考えた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト肝星細胞株 (LX-2) は Millipore より入手した。LX-2 は、D-MEM (Sigma) に非働化した 2%FBS、ペニシリン G (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を加え (D-MEM/FBS2%)、5% CO₂ 存在下 37 $^{\circ}$ C で培養した。

(2) RNA 抽出、逆転写反応および RT-PCR 法

培養細胞から AGPC 法により total RNA を抽出し、OD₂₆₀ から total RNA 濃度を計算した。次に ABI 社の逆転写反応プロトコルに従い、逆転写酵素とランダムヘキサマー (dN₆) を用いて cDNA を合成した。

PCR 増幅装置として Gene Amp 2720 (ABI)、Taq DNA polymerase として KAPATaq Extra (日本ジェネティクス株式会社) を用いた。基本プログラム 1) 前熱変性反応 (95 $^{\circ}$ C, 2 分間) 2) 熱変性反応 (95 $^{\circ}$ C, 15 秒間) 3) アニーリング反応 (55 $^{\circ}$ C, 15 秒間) 4) 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 30 秒間) (2), 3), 4) はサイクル反応) 5) 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C, 1 分間) で行った。総反応液量を 20 μ L にして RT-PCR を行った。

PCR 産物の分画は、1.5% アガロースゲル電気泳動を用いて行い、臭化エチジウム染色した後、FAS3000 (TOYOBO) を用いて可視化した。実験は 2 つ以上の cDNA サンプルを用いて行い、標的 mRNA の増減を評価した。

定量的 RT-PCR 法は PCR 検出定量システム (Thermal Cycler Dice Real Time System, TAKARA Bio) を用いて行った。Syber Green アッセイ法を用いて、サイクル毎の蛍光強度を測定した。測定した蛍光強度とあらかじめ作成した検量線から求めた傾きから、各 mRNA 発現量を求めた。また内部標準として β -actin を使用した。

(3) 細胞内 Ca²⁺濃度測定法

細胞内 Ca²⁺濃度変化の測定は、高速冷却 CCD カメラ蛍光画像解析システム ARGUS/HiSCa (浜松ホトニクス株式会社) を用いて Ca²⁺蛍光変化を観察した。蛍光指示薬には 10 μ M fura2-AM を用いた。測定用チャンバーに細胞をセットした後、fura2-AM を加え、30 分間静置して fura2-AM を細胞内に取り込ませた。その後、HEPES 溶液 (組成 (mM): 137 NaCl, 5.4 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 14 glucose, 10 HEPES, pH 7.4 (with NaOH)) で灌流し、過剰な色素を洗浄した後、測定を開始した。実験はすべて室温 (25 \pm 1 $^{\circ}$ C) で行った。細胞内の色素を励起波長 340 nm および 380 nm の光で励起させ、放出された 510 nm の蛍光をカメラで取得し、蛍光強度比 (F₃₄₀/F₃₈₀) として解析した。

(4) 細胞増殖測定法 (WST-1 法)

LX-2 を 24-well プレートに 2×10^4 cells/well の濃度で播種し、24 時間培養した後に各種薬物を添加した。48 時間培養した後、WST-1 試薬 (Roche) を添加し、1 時間後に生じたホルマザンの吸光度 (450 nm/620 nm) を SparkControl (TECAN) にて測定した。

(5) ゼラチンザイモグラフィ法

LX-2 を 12 well plate に播種し、各種薬物を添加して 24 時間培養した後、FBS 0% の D-MEM に培地交換した。その後 48 時間培養し、培養上清を回収した。回収した培養上清を、ゼラチンを含む 8% アクリルアミドゲルで POWER DRIVE (BIO CRAFT) を用いて定電圧 150 V で分離した。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを、洗浄溶液 (組成: 2.5% Triton, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) で 2 回洗浄し、インキュベーション溶液 (組成: 1% Triton, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 5 mM CaCl_2 , 1 μM ZnCl_2) で 37、24 時間酵素反応させた。その後 coomassie Blue 染色を行い、Matrix metalloproteinase (MMP) 活性の変化を確認した。

(6) 蛍光顕微鏡を用いた Piezo1 の細胞内局在解析

LX-2 をガラスボトムディッシュに播種し、5 ng/ml TGF- β を添加して 24 時間培養した後、4% パラホルムアルデヒド溶液にて 30 分間固定した。PBS で洗浄した後、0.2% Triton X-100 (Wako)、1% 正常ヤギ血清 (Sigma)、1:200 に希釈した抗 Piezo1 ウサギ抗体 (NBP1-78537, NOVUS BIOLOGICALS) を含む PBS 中で 4、24 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、Alexa488 標識抗ウサギ IgG・ヤギ抗体 (Invitrogen) を含む PBS 中で室温、1 時間インキュベートした。PBS で洗浄した後、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (LSM800, Carl Zeiss) で観察した。画像観察には、63 倍または 100 倍の油浸対物レンズを用いた。

4. 研究成果

(1) LX-2 における Piezo1 の機能発現

LX-2 における Piezo1 および Piezo2 の mRNA 発現を RT-PCR 法により確認したところ、Piezo1、Piezo2 共に mRNA 発現が確認できた。

また、LX-2 に Piezo1 活性化薬である Yoda-1 を作用させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定したところ、Yoda-1 添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇した。また、その作用は非選択的カチオンチャネル阻害薬である gadolinium (Gd^{3+}) や Ruthenium Red 添加により抑制されたことから、Yoda-1 添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用は、Piezo1 を介する細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入であると考えられた。

(2) Yoda-1 が LX-2 の細胞増殖に及ぼす影響

LX-2 に Yoda-1 を添加し、細胞増殖に及ぼす影響を WST-1 法により検討した。その結果、Yoda-1 は LX-2 の細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

(3) LX-2 における TGF- β 添加による各種 mRNA 発現量変化

LX-2 に 5 ng/ml の TGF- β を 24 時間作用させ、collagen 1a1、collagen 1a2、Piezo1、Piezo2 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により検討した。その結果、TGF- β 添加により、collagen 1a1 および collagen 1a2 の mRNA 発現量が上昇していることが明らかとなった。また、TGF- β 刺激により Piezo1、Piezo2 の mRNA 発現量は変化しなかった。

(4) LX-2 における TGF- β 添加による MMP 活性変化

LX-2 に 5 ng/ml の TGF- β を 24 時間作用させ、MMP2 および MMP9 の酵素活性をゼラチンザイモグラフィ法により検討した。その結果、TGF- β により MMP9 の酵素活性が増大していることが明らかとなった。

LX-2 を TGF- β 刺激することにより collagen1a1、1a2 の mRNA 発現が上昇したこと、MMP9 の酵素活性が増大していたことより、LX-2 に TGF- β を作用させることにより、LX-2 が活性化し、線維化を起こしていることが考えられた。

(5) Piezo1 が TGF- β による肝星細胞の活性化に及ぼす影響

LX-2 に 5 ng/ml TGF- β および Yoda-1 を作用させ、collagen 1a1 および collagen1a2 の mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。また、MMP9 の mRNA 発現および酵素活性に及ぼす影響を検討した。その結果、Yoda-1 が TGF- β による肝星細胞の活性化に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆される結果を得ることができた。

今後、得られた結果が Piezo1 を介する作用であるのか検討を行う必要がある。

(6) LX-2 における Piezo1 の細胞内局在

LX-2 における Piezo1 の細胞内局在を、免疫細胞染色法を用いて検討した。その結果、Piezo1 は主に核に局在することが明らかとなった。

(7) LX-2 において TGF- β が Piezo1 の細胞内局在に及ぼす影響

LX-2 に 5 ng/ml TGF- β を 24 時間作用させ、Piezo1 の細胞内局在の変化を検討した。その結果、TGF- β を作用させることにより、Piezo1 の細胞内局在は大きく変化しなかった。

(8) 活性化肝星細胞における収縮能の測定

LX-2 に 5 ng/ml TGF- β を 24 時間作用させ、Yoda-1 を作用させることによる細胞形態の変化を顕微鏡にて観察した。その結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することにより、細胞形態が変化し、収縮を起こしていることが明かとなった。

今後、細胞形態の変化が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によってのみ引き起こされるのか、Piezo1 活性化によりその他の作用も生じているのか、詳細に検討する予定である。

(9) まとめ

今回の検討により、肝星細胞の活性化における Piezo1 の機能について様々な知見を得ることができた。今後、さらに詳細な検討を行うことにより、Piezo1 が肝線維化に及ぼす影響を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki T, Muraki Y, Hatano N, Suzuki H, Muraki K.	4. 巻 19(5)
2. 論文標題 PIEZ01 Channel Is a Potential Regulator of Synovial Sarcoma Cell-Viability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19051452	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 -

1. 著者名 Yoneda M, Suzuki H, Hatano N, Nakano S, Muraki Y, Miyazawa K, Goto S, Muraki K.	4. 巻 20(19)
2. 論文標題 PIEZ01 and TRPV4, Which Are Distinct Mechano-Sensors in the Osteoblastic MC3T3-E1 Cells, Modify Cell-Proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 4960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20194960	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知学院大学薬学部 薬効解析学研究室ホームページ http://www.phar.agu.ac.jp/lab/cell_pharm/cellpharmacol.html

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