

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17428

研究課題名（和文）インテグリン阻害剤を応用した新たな肝線維症治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic agents for liver fibrosis applying integrin inhibitors

研究代表者

則武 秀尚（NORITAKE, HIDENAO）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：10467235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：RGDインテグリンをCWHM12を用いて薬理的に阻害すると、インテグリンを介したOutside-in signalが抑制され、その結果として肝星細胞の活性が低下した。その機序としてはRGDインテグリンから続くFAK-AKT経路が阻害されることで細胞周期の静止、増殖の抑制、アポトーシスの誘導が関与していると考えられた。これらの結果はこれまでに動物実験で報告されている肝臓におけるCWHM12の抗線維化作用を裏付けるものである一方で、未解明であったCWHM12による肝星細胞への直接的な作用を明らかにしたものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的はこれまで解明されていない肝星細胞に対する直接的影響に着目し、RGDインテグリンを薬理的に阻害することにより、肝線維化が改善する機序を解明したうえでこれによる新たな肝線維症治療薬を開発することであった。この研究により得られた成果は有効な肝線維化治療薬が存在しない現状において、インテグリン阻害剤を応用して肝星細胞の活性化抑制機序に基づく新しい抗線維化治療薬の開発に繋がる学術的にも社会的にも極めて意義のある成果をもたらしたと考えられる。また従来は接着分子としての役割に注目され、主に抗腫瘍薬として研究されてきたRGDインテグリン阻害剤の新たな領域の開拓へも繋がる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Pharmacological inhibition of RGD integrin with CWHM12 suppressed integrin-mediated outside-in signals, decreasing hepatic stellate cell activity. The mechanism is considered involved in cell cycle arrest, proliferation inhibition, and apoptosis induction by blocking the FAK-AKT pathway that follows RGD integrin. While these results support the antifibrotic effect of CWHM12 in the liver reported in animal experiments, the unexplained direct effect of CWHM12 on hepatic stellate cells was clarified.

研究分野：消化器内科学

キーワード：インテグリン 肝星細胞 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

研修開始当初は、肝硬変症を含む肝線維症は根本的薬物治療が存在せず、終末像である肝不全のみならず、肝癌に代表される多くの合併症を来し患者の生命予後に直結する疾患であった。当時我が国における肝硬変患者数は50万人程度と推計され、肝硬変による死亡者数も年間1万7千人と報告されていた。肝硬変症の成因としてウイルス性肝炎が最多であるが、近年ではメタボリックシンドローム患者の増加に伴い非アルコール性脂肪性肝炎 (Non Alcoholic Steatohepatitis, NASH) による肝硬変が増加していた (2010年、肝硬変ガイドブック、日本消化器病学会編)。この傾向は本邦のみならず欧米でも同様であり、世界的にも対策が急務であった。肝硬変症に対する唯一の治療法は肝移植であるが、我が国の生体および脳死をあわせた肝移植実施数は年間400例程度と多くはなかった (2017年、日本肝移植研究会報告)。また肝移植治療に必要な費用も1000万円以上と非常に高額であり医療経済学的にも問題があった。従って特にNASHを背景とした肝硬変症を含む肝線維症に対して有効な薬物治療法の開発が強く望まれていた。なおこの点は今日においても同様であり、肝線維症に対する有効な薬物療法は未だ開発途中である。

インテグリンは様々な細胞表面に発現する接着分子で鎖と鎖からなる二量体である。その組み合わせによりヒトでは24種類のインテグリンが存在するが、NC Hendersonらはこのうちアルギニン (R)、グリシン (G)、アスパラギン酸 (D) 配列を認識するRGDインテグリンを薬理的に阻害することで、四塩化炭素投与により作成した肝硬変マウスにおいて線維化改善効果を認めたと報告した (2013年、Nat Med)。我々はコリン欠乏低メチオニン高脂肪飼料 (CDAHFD) より作成したNASHマウスモデルを作成し、同じRGDインテグリン阻害剤 (CWHM12) を投与することで、肝線維化の進行が抑制されるだけでなく、投与前と比べて線維化ステージが有意に改善することを見いだした。肝線維化の中心的役割を果たす肝星細胞 (Hepatic Stellate Cells, HSCs) を活性化させる因子のひとつであるTransforming Growth Factor (TGF- β) を、生理活性を持たない潜在型から活性型に変換するためにはRGDインテグリンが必要であるが、同薬剤によってこの過程が阻害されることでTGF- β シグナルが減弱し、HSCsの活性が抑制されることで線維化が改善すると考えている。また同様に脾臓においても、TGF- β シグナルの抑制を介してCWHM12が抗線維化作用を持つことが報告されており (2016年、Cell Mol Gastroenterol Hepatol)、同薬剤による抗線維化療法の肝臓に限らず様々な臓器へ応用できると考えていた。しかし残念ながら我々の実験では肝臓の炎症所見は増悪する傾向が見られたことから、同薬剤をNASHの線維化改善薬として臨床応用するためには克服すべき課題が残されていた。その為にも同薬剤がもつTGF- β の活性化阻害以外の薬理学的作用や肝臓におけるHSCs以外の細胞に与える影響について詳細に解明する必要がある。

インテグリンは単なる接着分子ではなく、細胞外から細胞内へのシグナル伝達 (Outside-in Signal Transduction) を担う役割も担っている。最近ではインテグリンの細胞内ドメインに結合するFAK (Focal Adhesion Kinase) がHSCsの活性化やアポトーシスに関係していることが報告され (2017年、Sci Rep)、インテグリンと細胞内シグナル伝達経路との関連が注目されていた。このことから我々はRGDインテグリン阻害剤がHSCsに対して直接的な影響を及ぼしている可能性は極めて高いと考えていた。したがって我々は、RGDインテグリン阻害剤が既知のTGF- β シグナル抑制作用以外にもHSCsに対する直接的作用により、複合的にHSCsの活性を制御し抗線維化作用を発揮するという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は「RGDインテグリンを薬理的に阻害することにより、肝線維化が改善する機序を解明し、これによる新たな肝線維症治療薬を開発する」ことである。

本研究の学術的独創性は、これまで解明されていないHSCsに対する直接的影響や肝臓におけるHSCs以外の細胞を介した抗線維化作用に着目し、細胞株およびNASHモデルマウスを使ってRGDインテグリン阻害剤の新たな作用機序を明らかにすることで、全く新しい抗線維化治療薬の開発に挑む点である。有効な肝線維化治療薬が存在しない現状において、インテグリン阻害剤を応用した肝線維化治療薬に関するこの研究は、学術的にも社会的にも極めて意義のある成果をもたらすと考えられる。また従来は接着分子としての役割に注目され、主に抗腫瘍薬として研究されてきたRGDインテグリン阻害剤の新たな領域の開拓へも繋がる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

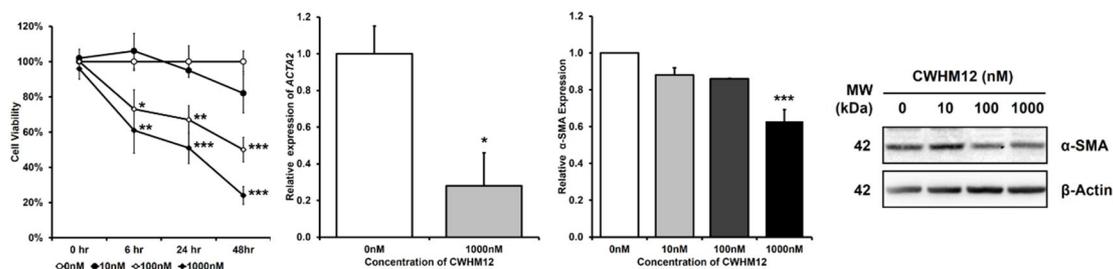
不死化したヒト肝星細胞 (HSCs) であるLX2細胞 (Merck Milliporeより購入) を1%抗生物質、GlutaMAX、2%ウシ胎児血清 (FBS) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。これらの細胞にRGD-binding integrinの阻害性合成分子であるCWHM-12 (Cayman Chemical) を0 nM (コントロール群)、10 nM、100 nM、1 μ Mで添加して以下の実験を行った。細胞生存率はMTSアッセイによって評価した。蛋白発現量は特異的抗体を使用して、ウェスタンブロッティング法で評価した。ローディングコントロールは α -アクチンとした。遺伝子発現量は全細胞RNAを単

離し、定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法で評価した。PCR プライマーは Primer Bank のシーケンスに基づいて Life Technologies によって合成し、ハウスキーピングコントロール遺伝子である ribosomal protein L13a (RPL13A) を用いて、比較閾値サイクル法により解析した。細胞周期解析とアポトーシスの検出はフローサイトメトリーで解析した。データは両側独立学生徒の t 検定または分散分析 (ANOVA) によって分析し、 p 値 < 0.05 を統計的に有意であるとした。すべての統計分析は、IBM SPSS Statistics バージョン 21 を使用した。

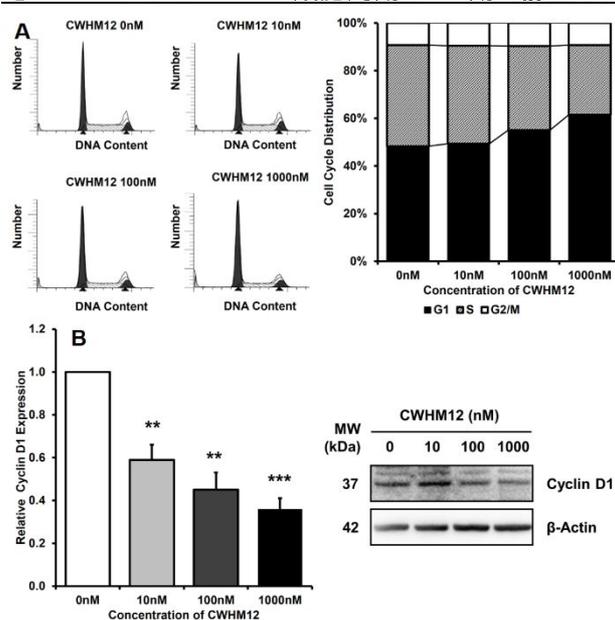
4. 研究成果

【CWHM12 により HSCs の生存率と活性化は抑制された】

HSCs に CWHM12 を上記の濃度で投与して 48 時間まで観察したところ、生存率は時間依存性かつ濃度依存性に低下した。特に 100nM と 1 μ M では投与 6 時間から有意な低下を認めた。また HSCs の細胞活性の指標として ACTA2 ならびに SMA (smooth muscle actin) の発現量を評価したところ、いずれも CWHM12 により発現量が有意に低下した。この結果から CWHM12 は HSCs の生存率を低下させ、活性を抑制することが考えられた。なお我々はこれまでに NASH モデルマウスに CWHM12 を投与した際の肝臓において ACTA2 ならびに α SMA の発現量が低下することを報告しているが、今回得られた結果はこれに矛盾せず、*in vivo* で観察された結果を裏付けるものである。



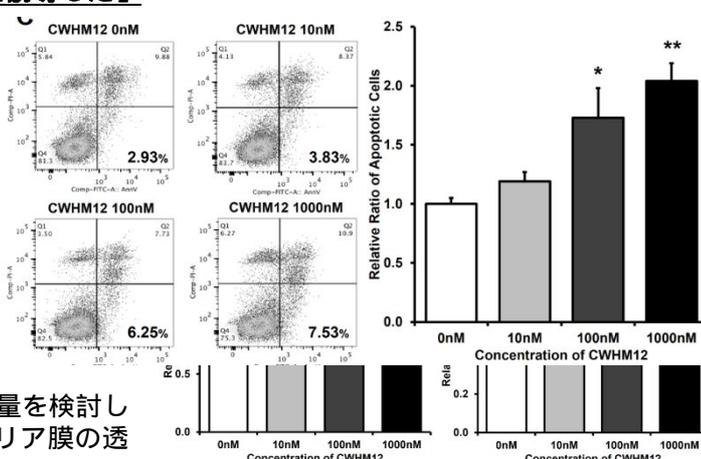
【CWHM12 により HSCs の細胞周期は G1 期で静止した】



HSCs に CWHM12 を上記の濃度で投与して、PI (propidium iodide) の取り込みから細胞周期を解析したところ、CWHM12 の濃度依存性に細胞分裂の前の DNA の合成準備期である G1 期にある細胞割合が増加し、分裂期である G2/M 期の細胞割合が減少した (左図 A)。また細胞周期において G1 期から DNA 複製期である S 期への移行に必要な Cyclin D1 の遺伝子発現量ならびに蛋白発現量を検証したところ、同様に CWHM12 の濃度依存性にいずれも発現量が有意に低下していることが明らかとなった (左図 B)。これらの結果から CWHM12 により HSCs の細胞周期は G1 期で静止したと考えられた。一般に細胞は、細胞周期に沿って成長と分裂を繰り返すことで増殖するため、細胞周期が静止することは、細胞増殖が抑制されている可能性を示唆するものであり、CWHM12 が HSCs の増殖を抑制すると考えられた。

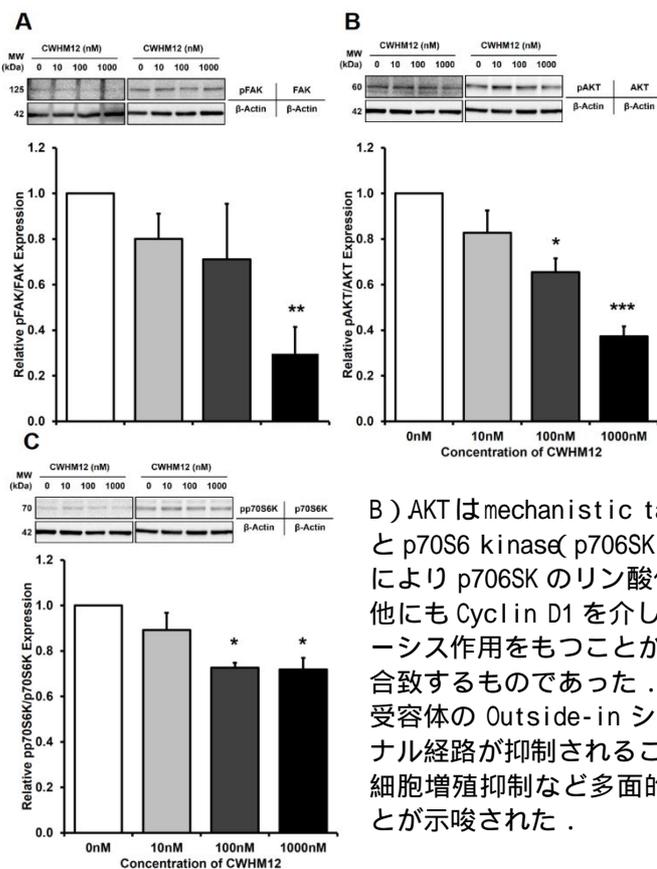
【CWHM12 は HSCs のアポトーシスを誘導した】

HSCs に CWHM12 を上記の濃度で投与して、アネキシン と PI で細胞染色をした後にフローサイトメトリーでの取り込みから細胞周期を解析した。アポトーシス初期の指標とされるアネキシン陽性かつ PI 陰性を示す細胞の割合を検討したところ、対照群に比べて CWHM12 の濃度が上昇するに従い、アポトーシス細胞の割合も濃度依存性に増加した (右図)。またアポトーシスの誘導に関連する蛋白として p53 と BCL-2 の発現量を検討した。アポトーシスにはミトコンドリア膜の透



過性調節に関連する内因性経路と、細胞死受容体を介する外因性経路が知られているが、B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) は前者に関連し抗アポトーシス作用、p53 は内因性および外因性に与しアポトーシス誘導作用を持つとされる。CWHM12 投与により HSCs における p53 蛋白発現が濃度依存的に増加し、Bcl-2 蛋白発現が低下したことから、フローサイトメトリーの結果と同様にアポトーシスが誘導されたと考えられた。今回の実験では HSCs のみの培養系実験であり、この作用は内因性経路によると考えられた。我々はこれまでに CWHM12 が投与された NASH モデルマウス肝において HSCs のアポトーシスを報告しているが、今回の実験結果はそれを裏付けるものである。

【CWHM12 により HSCs の RGD インテグリン受容体を介した Outside-in シグナルが阻害された】



RGD-binding インテグリン受容体は細胞外マトリックス (ECM) の RGD 配列と結合することにより細胞内へシグナルを伝達と考えられている (Outside-in シグナル)。そこで我々は CWHM12 の投与によりもたらされる Outside-in シグナルの変化を検証した。FAK は RGD インテグリン受容体の細胞内ドメインに結合する非受容体型タンパク質チロシンキナーゼであり、リン酸化により活性化されるが、CWHM12 を投与することで FAK のリン酸化が抑制された (左図 A)。またその下流に位置する AKT のリン酸化も CWHM12 の濃度依存的に低下した (左図

B) AKT は mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) と p70S6 kinase (p70S6K) を介して翻訳を制御しているが、CWHM12 により p70S6K のリン酸化も低下していた (左図 C)。AKT は他にも Cyclin D1 を介した細胞増殖作用、p53 を介して抗アポトーシス作用をもつことが知られているが、いずれも上述の結果に合致するものであった。即ち、CWHM12 により RGD インテグリン受容体の Outside-in シグナルを介して HSCs では FAK-AKT シグナル経路が抑制されることで、アポトーシス誘導、細胞周期静止、細胞増殖抑制など多面的に細胞生存率の低下がもたらされることが示唆された。

【総括】

CWHM12 で RGD インテグリンを介したシグナル伝達を阻害すると、HSCs の活性が低下し、細胞数が減少した。その機序としては、CWHM12 によって RGD インテグリンを介した Outside-in シグナルおよびその下流に位置する FAK-AKT 経路が阻害されることで細胞周期静止、増殖抑制、アポトーシス誘導が関与していると考えられた。これらの結果はこれまでに動物実験で報告されている肝臓における CWHM12 の抗線維化作用を裏付けるものである一方で、未解明であった CWHM12 による HSCs への直接的な作用を明らかにしたものである。この結果は RGD インテグリン阻害作用による HSCs の活性化抑制、増殖抑制、細胞死誘導といった多面的な作用に着目した新たな肝線維化改善治療薬の開発へ繋がる成果であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hidenao Noritake
2. 発表標題 An inhibitor of RGD binding integrins attenuates the integrin-activated FAK-AKT pathway in activated hepatic stellate cells
3. 学会等名 The Liver Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------