

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2021  
課題番号：19K20186  
研究課題名（和文）肝臓アデノシン動態を標的とした肝星細胞活性化制御によるNASH進行防遏方策の確立  
研究課題名（英文）Prevention of NASH progression by controlling HSC activation resulting from a deterioration of adenosine dynamics  
研究代表者  
山口 桃生（Yamaguchi, Momoka）  
静岡県立大学・薬学部・助教  
研究者番号：30804819  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）から線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎（NASH）への進展の際に、肝実質細胞でのアデノシン産生酵素や分解酵素などのアデノシン動態関連分子の発現が変動することで、細胞外アデノシン量が増加し、HSCの活性化を促進させる可能性が示された。本研究成果により、炎症時での肝臓内のアデノシン動態の変化がNASH進展のトリガー刺激となる可能性が示され、NASHの予防および治療法への応用に繋がること期待できる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満人口の増加に伴い、NAFLDの患者数は年々増加しているが、一部の患者では、さらに、NAFLDから予後不良なNASHへと進展する。NASHの予防・治療法はまだまだ確立しておらず、NAFLDからNASHへと進展する原因も不明である。本研究では、NASH進展の原因として肝臓内のアデノシン動態変化を見出した。本研究成果よりNASHの予防および治療法への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The results of this study showed that changes in expression levels of adenosine-related molecules in hepatocytes occur during progression from NAFLD to NASH, which results in an increase in extracellular adenosine level, thereby promoting the activation of hepatic stellate cells. These results suggest that a deterioration of adenosine dynamics in the liver during inflammation triggers the progression to NASH, which is expected to be a possible target for preventive and therapeutic strategies against NASH.

研究分野：肝線維化、薬理学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎（NASH） 肝星細胞 肝線維化 アデノシン受容体 アデノシン動態 肝実質細胞 Prostaglandin E2

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の患者数は年々増加しているが、一部の患者では、さらに、NAFLD から予後不良な非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと進展する。この進展は不可逆的であり、その予後不良を決定づける重要な因子は肝線維化である。興味深いことに、NASH へと進展する (肝線維化する) 患者は一部であり、進展しない (肝線維化しない) 患者も多く存在する。すなわち、NASH 進展にはトリガーとなる何らかのシグナルが存在し、それを同定することが NASH の予防・治療法への応用につながると考えられる。

肝星細胞 (HSC) は肝傷害時にコラーゲンを産生・分泌する活性型に形質転換することから、NASH 進展には HSC の活性化が必須である。炎症時には、HSC が活性化され線維化が進む。

申請者らは、炎症物質プロスタグランジン E2 (PGE2) により HSC は活性化されるが、アデノシン受容体を阻害した状態では、PGE2 はむしろ HSC の活性化を抑制するという大変興味深い結果を得た。すなわち、アデノシンの有無により、炎症物質 PGE2 の HSC 活性化に対する作用が反転することが考えられる。これまでの知見により、アデノシンが NAFLD から NASH への進展を決定付ける Key 分子であり、炎症時における肝臓内でのアデノシン動態の変化が NASH 進展のトリガー刺激となる、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究では、A) アデノシン受容体阻害が HSC 活性化に対する PGE2 の作用を反転させる機構、B) HSC 近傍細胞でのアデノシン動態が HSC 活性化に及ぼす影響、C) NASH 発症と肝臓内アデノシン動態変化との関係を検討することで仮説を証明し、NASH の予防法や治療法への応用につながる基盤的知見を得る。

## 3. 研究の方法

アデノシンが NAFLD から NASH への進展を決定付ける Key 分子であり、炎症時における肝臓内でのアデノシン動態の変化が NASH 進展のトリガー刺激となる、という仮説を証明するために、以下の検討を行った。

### **A) アデノシン受容体阻害が HSC 活性化に対する PGE2 の作用を反転させる機構**

アデノシン受容体 (A<sub>1-3</sub>) と PGE2 受容体 (EP<sub>1-4</sub>) に共通する下流シグナルとして、G<sub>s</sub> や G<sub>i</sub> を介した cAMP 経路が考えられる。そこで、アデニル酸シクラーゼ (AC) 阻害薬 ddAd および活性化薬 forskolin を用いて HSC の活性化に対する作用および細胞内 cAMP 量への影響を検討した。また、①静止型 HSC、②活性型 HSC、③アデノシン受容体阻害薬を処置した活性型 HSC、④PGE2 を処置した活性型 HSC および、⑤アデノシン受容体阻害薬と PGE2 を共処置した活性型 HSC より抽出した RNA を用いて、mRNA-seq による mRNA 発現網羅的解析をおこない、パスウェイ解析等で候補シグナルを見出した。

### **B) HSC 近傍細胞でのアデノシン動態が HSC 活性化に及ぼす影響**

コントロールマウスおよび NASH モデルマウスより単離した肝臓、初代培養肝実質細胞、肝星細胞を用いて、細胞ホモジネート中のアデノシン変換酵素、アデノシン代謝酵素などのアデノシン動態に関わる分子の発現量を測定し、NASH 病態におけるアデノシン動態を HSC 近傍で変化させている原因細胞の特定を行った。なお、NASH モデルとして a) 超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料給餌マウスと b) 高脂肪酸含有高脂肪食 GAN-diet 給餌マウスの 2 種類のモデルマウスを用いた。

### C) NASH における肝線維化発症と肝臓内アデノシン動態変化との関係

NASH モデルとして a) 超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料給餌マウスと b) 高脂肪酸含有高脂肪食 GAN-diet 給餌マウスの 2 種類のモデルマウスを用いているが、これらモデルマウスの給餌期間を調整し、肝線維化発症前後におけるアデノシン変換酵素、アデノシン代謝酵素などのアデノシン動態に関わる分子の発現量を測定し、NASH 発症とアデノシン動態変化の関係を検討した。

## 4. 研究成果

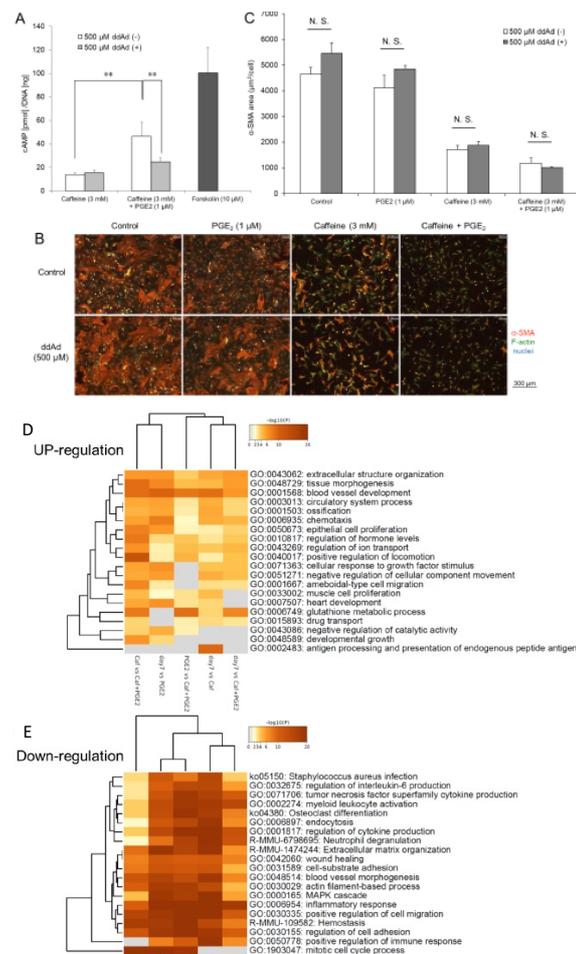
### A) アデノシン受容体阻害薬が HSC 活性化に対する PGE2 の作用を反転させる機構

アデノシン受容体阻害薬 caffeine 存在下における PGE2 による細胞内 cAMP 量の変化および HSC 活性化抑制作用に対する AC 阻害薬 ddAd の効果を検討した。ポジティブコントロールとして forskolin (10  $\mu$ M) を用いて細胞内 cAMP 量を ELISA により測定した。3 mM caffeine 存在下において、PGE2 (1  $\mu$ M) は細胞内 cAMP 量を有意に増加させ、その作用は AC 阻害薬である 500  $\mu$ M ddAd により有意に抑制された (Fig. A)。これにより、PGE2 は AC の活性化を介して細胞内 cAMP を上昇させることが示された。しかしながら、caffeine と PGE2 の単独あるいは併用処置による 1 細胞当たりの平滑筋型  $\alpha$  アクチン染色面積 (HSC 活性化の指標) の減少作用は ddAd (500  $\mu$ M) により解除されなかった (Fig. B, C)。すなわち、AC の阻害により cAMP 産生が抑制されている条件においても、caffeine と PGE2 の併用による HSC 活性化抑制作用は影響されないことから、この作用には cAMP は関与しないことが示唆された。

そこで、①静止型 HSC、②活性型 HSC、③アデノシン受容体阻害薬を処置した活性型 HSC、④PGE2 を処置した活性型 HSC および、⑤アデノシン受容体阻害薬と PGE2 を共処置した活性型 HSC より抽出した RNA を用いて、RNA-seq による mRNA 網羅的発現解析を用いた (Fig. D, F)。⑤の共処置群においてのみ発現変動する特徴的な遺伝子群を抽出し、パスウェイ解析を行うことで、“アデノシン受容体阻害が HSC 活性化に対する PGE2 の作用を反転させる機構”への関与が示唆される候補シグナルをいくつか見出した。(Yamaguchi M, et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 142, 111989, 2021)。

### B) HSC 近傍細胞でのアデノシン動態が HSC 活性化に及ぼす影響

2 種類の NASH モデルマウスを作製し、各マウスの肝臓より単離した肝実質細胞および HSC を用いて、アデノシン動態に関わる分子の発現量を測定した。その結果、NASH モデルマウスでは、肝臓においてアデノシン変換酵素、アデノシン代謝酵素の発現が変動していること、その発現変化が肝実質細胞に起因することが明らかとなった。また、マウス肝実質細胞株 AML-12 細胞に、



NASH 病態を模倣するため、高濃度のパルミチン酸 (200 mM) を処置したところ、アデノシン動態に関わる分子の発現が NASH モデルマウスの肝臓と同様に変動し、細胞外のアデノシン量が有意に増加した。これらの結果とアデノシン受容体阻害により HSC の活性化が抑制されるというこれまでの申請者らの知見を合わせると、NASH 病態時は、肝実質細胞においてアデノシン変換および代謝酵素の発現量の変動することで、細胞外アデノシン量が増加し、HSC を活性化させることが示唆された。

### **C) NASH における肝線維化発症と肝臓内アデノシン動態変化との関係**

NASH モデルマウスの給餌期間を調整し、肝線維化発症前後における肝臓内のアデノシン変換および代謝酵素などのアデノシン動態に関わる分子の発現量を測定し、肝線維化発症と肝臓内アデノシン動態変化の関係を検討した。その結果、アデノシン変換酵素の発現量上昇やアデノシン代謝酵素・輸送担体の発現量低下がみられ、肝線維化発症時にアデノシン動態が変化し、肝臓内でアデノシンが過剰に作用する可能性が示された。

本研究成果により、炎症時での肝臓内のアデノシン動態の変化が NASH 進展のトリガー刺激となる可能性が示され、NASH の予防および治療法への応用に繋がることを期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Furukawa Shohei, Yamaguchi Momoka, Ooka Akira, Kikuchi Haruhisa, Ishikawa Tomohisa, Saito Shinya	4. 巻 520
2. 論文標題 Differentiation-inducing factor-1 prevents hepatic stellate cell activation through inhibiting GSK3 inactivation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 140 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.117	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 山口桃生	4. 巻 45
2. 論文標題 肝星細胞	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 静岡実験動物研究会会報	6. 最初と最後の頁 34
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 -
1. 著者名 土肥直貴, 岩見恭介, 山口桃生, 齊藤真也, 石川智久	4. 巻 45
2. 論文標題 自律神経による肝星細胞の肝類洞血流調節機構の解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 静岡実験動物研究会会報	6. 最初と最後の頁 22
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 -
1. 著者名 大岡央, 古川翔平, 山口桃生, 齊藤真也, 石川智久	4. 巻 46
2. 論文標題 細胞性粘菌由来低分子化合物DIF-1は肝線維化責任細胞の活性化を抑制する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 静岡実験動物研究会会報	6. 最初と最後の頁 10 ~ 11
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 -

1. 著者名 Dohi Naoki, Yamaguchi Momoka, Hase Reina, Suzuki Ryosuke, Wakabayashi Yumeto, Nishiyama Ryota, Saito Shin-ya, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Quantitative real-time measurement of endothelin-1-induced contraction in single non-activated hepatic stellate cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0255656	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 Yamaguchi Momoka, Dohi Naoki, Ooka Akira, Saito Shin-ya, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 142
2. 論文標題 Caffeine-induced inversion of prostaglandin E2 effects on hepatic stellate cell activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111989 ~ 111989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.111989	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 Yamaguchi Momoka, Ohbayashi Saya, Ooka Akira, Yamashita Hinako, Motohashi Nanami, Kaneko Yukiko K., Kimura Toshihide, Saito Shin-ya, Ishikawa Tomohisa	4. 巻 600
2. 論文標題 Harmine suppresses collagen production in hepatic stellate cells by inhibiting DYRK1B	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 136 ~ 141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.02.054	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24件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Naoki Dohi, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 The alternation of adenosine-related genes likely progress HSC activation in inflammatory condition.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土肥直貴、山口桃生、長谷怜奈、鈴木良輔、若林夢人、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 ET-1による静止型肝星細胞の収縮に関わる分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土肥直貴、山口桃生、長谷怜奈、鈴木良輔、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 自律神経による肝臓の血流調節において肝星細胞が責任細胞となる可能性
3. 学会等名 第143回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Momoka Yamaguchi, Tomoya Morishita, Syn-Ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Caffeine induces the reversion of activated hepatic stellate cells via antagonizing adenosine receptors.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oooka Akira, Momoka Yamaguchi, Shohei Furukawa, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 The activation of mouse hepatic stellate cells is suppressed by DIF-1, a morphogen produced by cellular slime molds.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Dohi, Kyosuke Iwami, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Liver blood flow is regulated by hepatic stellate cells and sympathetic nerve in the sinusoid.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoki Dohi, Kyosuke Iwami, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Are hepatic stellate cells involved in the regulation of liver blood flow by the sympathetic nerve?
3. 学会等名 50th NIPS international symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Momoka Yamaguchi, Oooka Akira, Shohei Furukawa, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 The possibility of DIF-1 as a therapeutic agent for liver fibrosis by controlling the transdifferentiation of hepatic stellate cells.
3. 学会等名 50th NIPS international symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Dohi, Kyosuke Iwami, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Liver blood flow is regulated by hepatic stellate cells in response to the sympathetic neurotransmitter noradrenaline
3. 学会等名 1st Khon Kaen University and University of Shizuoka Joint Symposium on Medical and Pharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Ooka, Shohei Furukawa, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Effect of the morphogen DIF-1 on the transdifferentiation of hepatic stellate cells: Towards the development of a novel therapeutic agent for liver fibrosis
3. 学会等名 1st Khon Kaen University and University of Shizuoka Joint Symposium on Medical and Pharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡央、古川翔平、山口桃生、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来化合物DIF-1の肝星細胞に及ぼす影響とそのメカニズム解析
3. 学会等名 第8回食品薬学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡央、古川翔平、山口桃生、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来低分子化合物DIF-1は肝線維化責任細胞の活性化を抑制する
3. 学会等名 静岡実験動物研究会 令和元年度大会 第47回研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoki Dohi, Kyosuke Iwami, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Hepatic stellate cells contract and regulate sinusoidal blood flow in response to the sympathetic neurotransmitter, noradrenaline
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oooka Akira, Shohei Furukawa, Momoka Yamaguchi, Shin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 Diffrentiation-inducing factor-1, derived Dictyostelium discoideum, suppresses the activation of hepatic stellate cells from mice via inhibition of GSK3 phosphorylation
3. 学会等名 JSH International Liver Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡央、古川翔平、山口桃生、齊藤真也、石川智久
2. 発表標題 肝線維化責任細胞HSCの形質転換に対する細胞性粘菌由来化合物DIF-1の作用機序解析
3. 学会等名 第21回応用薬理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡央、古川翔平、山口桃生、齊藤真也、菊地晴久、石川智久
2. 発表標題 肝星細胞に対する細胞性粘菌由来化合物DIF-1の作用解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土肥直貴, 岩見恭介, 山口桃生, 齊藤真也, 石川智
2. 発表標題 肝星細胞は交感神経刺激により収縮し肝類洞血流を調節する
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡央、古川翔平、山口桃生、齊藤真也、菊地晴久、石川智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来化合物DIF-1の肝線維化責任細胞HSCに対する作用の解析
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡 央、山口 桃生、大林 彩、山下 日菜子、本橋 南菜実、金子 雪子、木村 俊秀、齊藤 真也、石川 智久
2. 発表標題 肝線維化責任細胞HSCのコラーゲン産生に対するharmineの作用およびその機序の解析
3. 学会等名 第144回薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本橋 南菜実、大岡 央、山口 桃生、齊藤 真也、石川 智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来化合物DIF-1の肝線維化責任細胞HSCに対する脱活性化作用の解析および肝線維化モデルマウスに対する抗線維化作用の検証
3. 学会等名 第144回薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本橋南菜実、大岡央、山口桃生、齊藤真也、濱島義隆、石川智久
2. 発表標題 細胞性粘菌由来低分子化合物 DIF-1 は肝線維化責任細胞 HSC の活性化を制御し抗線維化作用を示す
3. 学会等名 次世代を担う若手のための創薬・医療薬理シンポジウム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋亮汰、山口桃生、森野純鈴、本橋南菜実、大岡央、石川智久
2. 発表標題 肝障害ex vivoモデルを用いた肝疾患治療薬スクリーニング
3. 学会等名 静岡実験動物研究会 令和2-3年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Ooka, Nanami Motohashi, Momoka Yamaguchi, Sin-ya Saito, Tomohisa Ishikawa
2. 発表標題 DIF-1, a differentiation-inducing factor from cellular slime mold, regulates transdifferentiation of hepatic stellate cells and ameliorates liver fibrosis
3. 学会等名 The 26th Shizuoka Forum on Health and Longevity
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岡 央、本橋 南奈実、山口 桃生、齊藤 真也、石川 智久
2. 発表標題 肝星細胞の形質転換を制御する低分子化合物DIF-1の肝線維化治療薬としての可能性
3. 学会等名 日本薬学会第142回年会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------