

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11589

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎に対する増殖因子を介した肝臓修復機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of growth factor-mediated repair mechanism toward non-alcoholic steatohepatitis and its application for therapeutic use

研究代表者

土屋 勇一 (TSUCHIYA, Yuichi)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：10307738

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)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は世界中で患者が増加している疾患である。NASHの症状のうち最も生命予後に影響を与えるのは肝線維化であるが、その発症メカニズムには不明な点が多く、治療薬の開発は遅れている。我々は独自に樹立したNASHモデルマウスを用いて解析を行い、線維芽細胞増殖因子の一つであるFGF18がNASH増悪時の肝線維化に関与することを見出した。さらに肝細胞特異的FGF18過剰発現マウスを作製したところ、通常飼育環境下において肝腫大と肝線維化が亢進した。したがってFGF18は肝線維化の鍵となる因子であり、抗肝線維化薬の治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化は様々な肝疾患で起こり生命予後に大きく影響するため、発症メカニズムの解明と治療薬の開発は急務である。肝線維化の病態モデル動物としては、マウスに四塩化炭素などを腹腔投与し炎症を誘発して線維化を誘導する実験系が頻用されるが、薬物の標的が炎症なのか線維化なのかを判別するのが困難である。本研究で作製した肝細胞特異的FGF18過剰発現マウスは炎症を介さずに直接線維化を誘導できることから、新たな病態モデル動物として肝線維化メカニズムの解明および治療薬のスクリーニングに利用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a disease with increasing prevalence worldwide. Among NASH symptoms, liver fibrosis has the greatest impact on life prognosis. We analyzed NASH model mice that we established independently, and found that FGF18, one member of the fibroblast growth factor (FGF) family, is involved in liver fibrosis during NASH exacerbation. Furthermore, we generated hepatocyte-specific FGF18 overexpressing mice, and these mice exerted spontaneous hepatomegaly and hepatic fibrosis under normal rearing conditions. Therefore, FGF18 plays a key role in liver fibrosis, suggesting that it may be a therapeutic target for anti-hepatic fibrosis drugs.

研究分野：生化学

キーワード：肝線維化 線維芽細胞増殖因子 非アルコール性脂肪肝炎

1. 研究開始当初の背景

組織の損傷が修復される際には、増殖因子の作用により細胞増殖が誘導されると同時に、一過性の線維化が生じて修復の足場を作ることが知られている。細胞増殖により失われた細胞が補充され、足場となった線維が分解されることで組織修復が完了する。一方で慢性炎症などにより組織の損傷が繰り返されると、線維が分解されないまま蓄積し、臓器の不可逆的な線維化を引き起こす。すなわち線維化は「諸刃の刃」であるといえる。

臓器の線維化の中でも肝線維化は、ウイルス性肝炎やアルコール性脂肪肝炎、非アルコール性脂肪肝炎などの慢性肝疾患により生じ、患者の予後に大きな影響を与えることが知られている。しかし肝線維化に対して承認された治療薬はまだなく、大きなアンメットメディカルニーズを抱えている。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでの研究から、細胞増殖誘導による肝修復と肝線維化の両方を制御する鍵となる分子として FGF18 を見出した。研究代表者らは FGF18 の機能解析を足掛かりとして、独自に作製した遺伝子改変マウスと様々な肝障害モデルを用いて多面的なアプローチを行い、「諸刃の刃」である線維化をコントロールして線維化治療へ応用することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞特異的 FGF18 欠損マウスを用いた非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルの解析

これまでに研究代表者らは、アポトーシス抑制タンパク質 c-FLIP を肝細胞特異的に欠損させたマウスにコリン欠乏エチオニン添加食(CDE)食を 28 日間投与すると、対照マウスに比べて NASH が増悪することを見出した。本研究では肝細胞特異的 FGF18 欠損マウス、および肝細胞特異的 c-FLIP/FGF18 二重欠損マウスを作製して、NASH における FGF18 の役割を検討した。

(2) 肝細胞特異的 FGF18 過剰発現マウスの作製と解析

研究代表者らは、マウス染色体 Rosa26 領域に、CAG プロモーター-LoxP-stop-LoxP-マウス *Fgf18* ORF を組み込んだトランスジェニックマウスを作製した。このマウスと肝細胞特異的 *Cre* リコンビナーゼ発現マウスを交配し肝細胞特異的 FGF18 過剰発現マウスを作製して解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肝細胞特異的 c-FLIP/FGF18 二重欠損マウスは、CDE28 日投与後の肝線維化が肝細胞特異的 c-FLIP 単独欠損マウスよりも軽減していた。したがって FGF18 は NASH 増悪時における肝線維化に関与することが明らかになった (図 1)。一方 FGF18 単独欠損マウスに CDE 投与を行った場合には、NASH は軽度であり線維化に影響は見られなかった。したがって肝細胞のアポトーシス亢進による NASH の増悪が、FGF18 による線維化誘導に重要な役割を果たすと推測された。

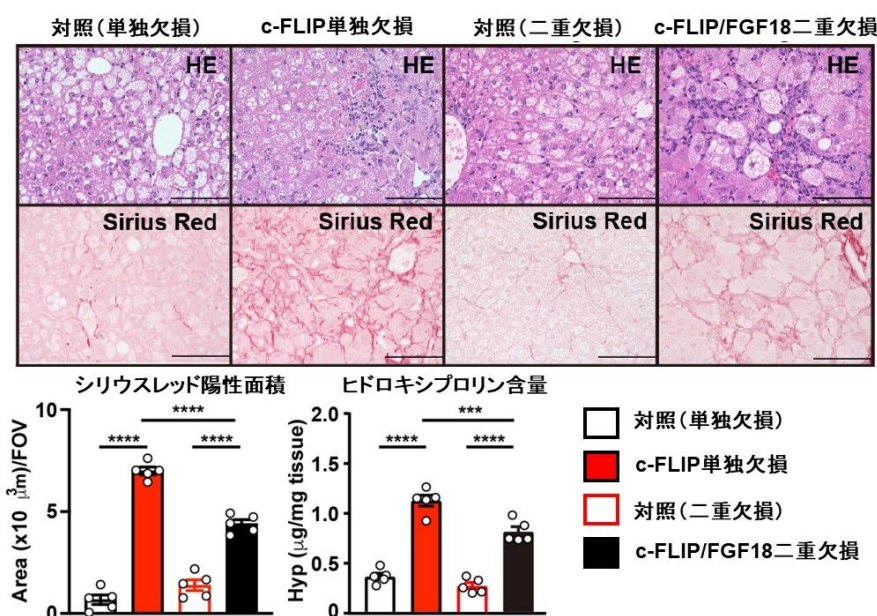
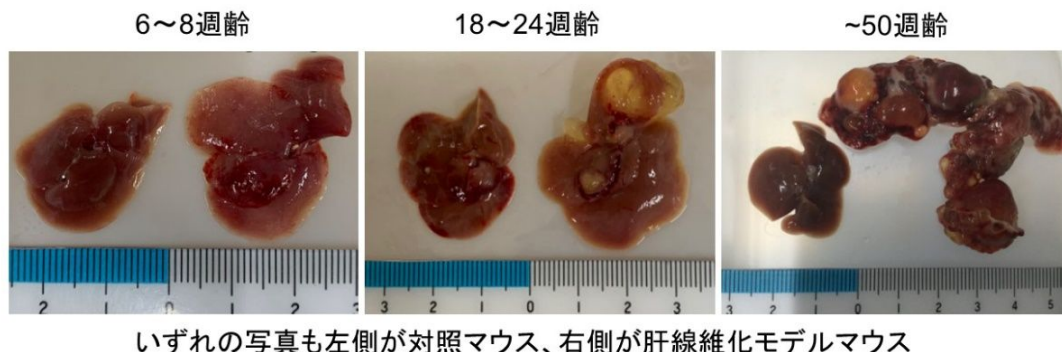


図 1 NASH 増悪肝臓における FGF18 欠損の効果

cFLIP/FGF18 二重欠損マウスは cFLIP 単独欠損マウスに比べて、線維化の指標であるシリウスレッド陽性面積およびヒドロキシプロリン含量が低下した。

(2)肝臓における FGF18 の役割を解明するため、胎児期から肝細胞特異的に FGF18 を過剰発現するマウス(肝線維化モデルマウス)を作製した。このマウスは通常飼育環境下で肝腫大と肝線維化が亢進し、週令を経ると肝嚢胞を自然発生することが明らかになった(図2)。



いずれの写真も左側が対照マウス、右側が肝線維化モデルマウス

図2 肝線維化モデルマウス肝臓の加齢による変化

若齢では肝線維化モデルマウス肝臓は対照マウス肝に比べ約 1.5 倍の肝腫大を示す(左)。8 週齢以降から肝嚢胞が生じ始め(中)、加齢とともに発達していく(右)。

組織解析の結果および一細胞 RNA シーケンス解析(scRNA-seq)の結果から、肝線維化モデルマウスマウス肝臓では全体的に細胞増殖が亢進しており、特に星細胞が増加していた。In vitro 解析の結果から、FGF18 は肝細胞ではなく星細胞の増殖を直接誘導することが判明した。しかし肝線維化モデルマウス肝臓では肝細胞も増殖していたことから、in vivo では星細胞が産生する何らかの因子が肝細胞に作用し増殖を誘導していると推測された。

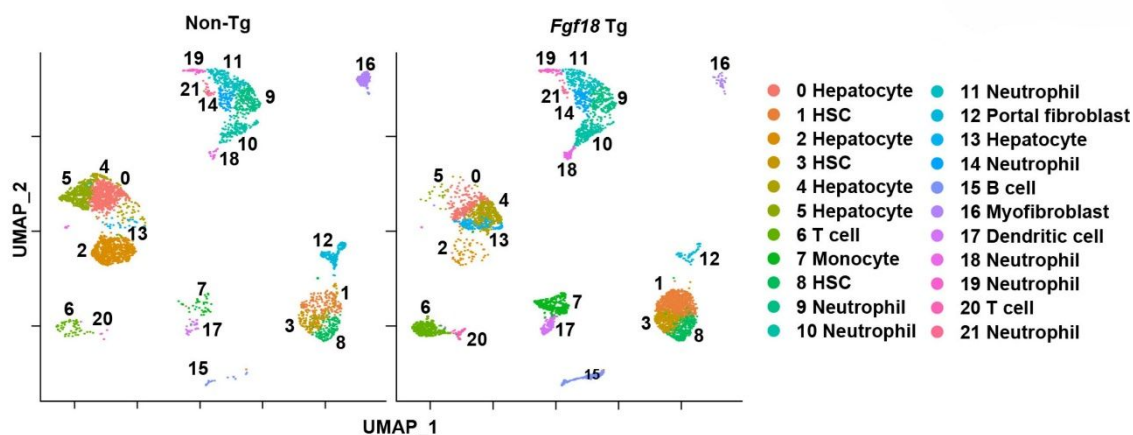


図3 肝線維化モデルマウス肝臓の一細胞 RNA シーケンス解析(scRNA-seq)

肝線維化モデルマウス(*Fgf18* Tg)の肝臓では、クラスター1/3/8 に属する星細胞(HSC)の割合が、対照マウス(Non-Tg)と比較して増加している。

ここまでの成果は英文原著論文として投稿し、現在 revision 中である(Tsuchiya *et al.*, *Nat. Commun.* Under revision)。また肝線維化モデルマウスについて特許を出願した(特開 2023-31064)。

これ以外の研究成果として、NASH の血清バイオマーカーとしての FGF18 の有用性を検討するため、東邦大学医療センター大森病院消化器内科と共同で臨床研究を行っている。しかし研究の過程で、解析に用いた市販 FGF18 ELISA キットの特異性に疑問が生じた。現在は国内外との共同研究により、FGF18 特異的モノクローナル抗体を複数樹立して、高感度 ELISA キットを独自に開発し研究を継続している。

< 引用文献 >

Tsuchiya Y, Kobayashi K, Seki T, ...Tanaka M, Nakano H (27人中筆頭著者). Fibroblast growth factor 18 activates hepatic stellate cells that lead to liver fibrosis. *Nat Commun*, under revision.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakabayashi Osamu, Takahashi Hiroataka, Moriwaki Kenta, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohtake Fumiaki, Murai Shin, Tsuchiya Yuichi, Koyahara Yuki, Saeki Yasushi, Yoshida Yukiko, Yamazaki Soh, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya, Nakano Hiroyasu	4. 巻 4
2. 論文標題 MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01603-y	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中林修、高橋宏隆、村井晋、大竹史明、駒澤幸子、土屋勇一、佐伯泰、吉田雪子、山崎創、徳永文稔、森脇健太、澤崎達也、中野裕康
2. 発表標題 cFLIPのユビキチン化による新たなアポトーシス抑制機構の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林謙太、土屋勇一、関崇生、駒澤幸子、西山千春、三上哲夫、今村亨、田中稔、中野裕康
2. 発表標題 FGF18はNASH における肝線維化に関与する
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋勇一、小林謙太、関崇生、駒澤幸子、西山千春、三上哲夫、今村亨、田中稔、中野裕康
2. 発表標題 肝細胞特異的cFLIP欠損はチオアセトアミド投与による慢性肝障害と肝線維化を亢進させる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋勇一
2. 発表標題 細胞死促進マウスを用いた肝線維化誘導因子の同定
3. 学会等名 第2回細胞死コロキウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋勇一、小林謙太、関崇生、仁科隆史、駒澤幸子、山崎創、三上哲夫、西山千春、中野裕康
2. 発表標題 FGF18は肝星細胞を活性化して肝線維化を誘導する
3. 学会等名 第18回東邦大学5学部合同学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋勇一、関崇生、田中稔、中野裕康
2. 発表標題 FGF18は肝星細胞を活性化して肝線維化を誘導する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋勇一、関崇生、中野裕康、田中稔、高橋良哉
2. 発表標題 加齢による嚢胞形成と線維化
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 肝線維化モデルマウス	発明者 中野裕康、土屋勇一	権利者 学校法人東邦大 学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2023-31064	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------