

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24614003

研究課題名(和文) ビタミンE類似化合物のアノイクス誘導機構の解明と肝硬変薬物療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of anoikis induction by vitamin E-analogous compound and application to the pharmacotherapy for hepatic cirrhosis.

研究代表者

山口 典子 (Yamaguchi, Noriko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90251553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓星細胞は病理的条件下で活性化され、線維性の分子を多量に合成することから肝線維化さらには肝硬変において重要な役割を果たすと考えられている。ビタミンEと化学構造が類似しているトコールは活性化肝臓星細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することを報告してきた。この作用は細胞の基質からの脱着を契機とするアノイクス誘導であり、本研究によって細胞脱着は焦点接着キナーゼの分解を伴い、脱着にはプロテアーゼが関与していることが明らかにされた。またトコールは肝臓星細胞において線維形成コラーゲンの合成を低下させ、コラーゲン分解酵素の発現を増大させるように遺伝子発現を変化させていることも明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：In pathological conditions, hepatic stellate cells (HSCs) are activated and play crucial roles in liver fibrosis and hepatic cirrhosis. We reported that tocol, a vitamin E-analogous compound, strongly inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of activated HSCs. Significant cell detachment was observed in tocol-treated HSCs, and apoptosis was mainly observed in floating cells. Therefore, it is considered that tocol induced anoikis, a specific type of apoptosis. In this study, the fragmentation of focal adhesion kinase was observed in tocol-treated cells, and protease inhibitors attenuated the cell detachment. Gene expression variation analysis showed that tocol elicited decreased expression of fibrillar collagens and increased expression of matrix metalloproteinases, which degrade extracellular matrix proteins.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：肝硬変 肝臓星細胞 アノイクス コラーゲン MMP

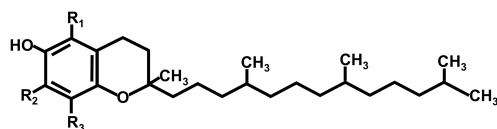
1. 研究開始当初の背景

従来慢性肝疾患は主としてウイルスが原因であったが、近年メタボリックシンドロームをベースに非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者が増加し、国内では約150万人程度と推定されている。NASHの予後すなわち肝硬変、肝癌への進行は肝臓の線維化の重症度が鍵を握っている。

肝臓の線維化の責任細胞として肝硬変の予防や治療の標的細胞と考えられているのは、肝臓静脈洞に存在する肝臓星細胞(HSC)である。HSCはまた体内ビタミンAの約80%をレチニルエステルで貯蔵し、生体のビタミンA恒常性維持を担う細胞でもある。HSCは、正常状態では細胞質内にビタミンAを含む脂質滴を有する細胞であるが、炎症などの病態時には活性酸素やサイトカインにより活性化され、脂質滴を失い筋線維芽細胞様に形態が変化して、コラーゲンを始めとする線維性マトリックス成分を多量に合成する細胞に変化することが知られている。

ビタミンEはNASH治療に有効であるという幾つかの報告があり、最近NASH患者(80例)にビタミンEの効果を検討したプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験(96週間)の結果が報告されたが¹⁾、ビタミンEは有意に肝臓組織病変を改善するという結果であった。従って私達は、肝線維化の抑制にビタミンAとEが有効であると考え、HSCに対する作用を研究して来た。

ビタミンEのうち4種の化合物(α, β, γ, δ-トコフェロール)とトコール(トコフェロールのクロマンノン環のメチル基を欠いた化合物)のHSC増殖に対する作用を検討したところ、α-トコフェロール(Toc)とトコールが著明な増殖抑制活性を示した。またこの増殖抑制活性は星細胞セルラインにおいても観察されたが、肝実質細胞またはそのセルラインの増殖には影響がなかった²⁾。トコールはむしろ肝実質細胞の増殖を促進する傾向を示した。またα-Tocとトコールの増殖抑制作用は、接着細胞が基質から脱着することによりアポトーシスが誘導される、いわゆるアノキスに由来するものであることを報告した。



	R ₁	R ₂	R ₃
α-Tocopherol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β-Tocopherol	CH ₃	H	CH ₃
γ-Tocopherol	H	CH ₃	CH ₃
δ-Tocopherol	H	H	CH ₃
Tocot	H	H	H

ビタミンE(トコフェロール)とトコールの化学構造式

2. 研究の目的

(1)トコールはHSCの増殖を抑制しアノキス誘導作用を示すが、肝実質細胞に対してはそれらの作用は認められ

なかった。従ってトコールは肝線維症の治療薬候補となりうる可能性が示唆された。本研究は、トコールのHSCに対するアノキス誘導作用の反応機構を明らかにし、反応に関与する分子を同定することにより、肝線維症治療の新しいターゲット分子の探索に繋げることを目的とした。特にアノキス誘導作用が細胞特異的であることに着目し、誘導機構の解明を行うこととした。

(2)マウスにおける肝線維症、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデル動物を作成する。トコールの*in vivo*における線維化抑制作用を検証すると同時に、安全性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞の脱着アッセイ

細胞はラットHSCラインであるHSC-T6³⁾とCFSC-2G⁴⁾を用いた。サブコンフルエントの細胞に50 μMないしは100 μMのトコールを作用させ培養後、MTTアッセイにて接着生細胞数を評価し、脱着率を求めた。

(2)Focal adhesion kinase (FAK)の分解

細胞をトコールにて処理した後、プロテアーゼインヒビターを添加したRIPAバッファーにて細胞溶解液を調製し、ウエスタンブロットにてFAKの分解を評価した。

(3)アポトーシスの検出

上述の細胞溶解液を用い、ウエスタンブロットにてPARP(Poly ADP ribose polymerase)の分解産物を検出した。

(4)プロテアーゼインヒビターによる細胞脱着並びにFAK分解の阻害

細胞脱着及びFAKの分解に対するプロテアーゼの関与を検証するために、種々のプロテアーゼインヒビターを用いた。用いたインヒビターはZ-VAD-FMK, MG132, Chloroquine, O-Phenanthroline, Aprotinin, Batimastat(BB-94), E-64d, Pepstatin Aである。

(5)細胞外マトリックスによる細胞脱着阻害

ブタ腱及び皮膚由来I型コラーゲン、基底膜マトリックスGelatinを培養皿にコートし、細胞脱着に対する阻害作用を検討した。

(6)遺伝子の発現変動

CFSC-2Gに50 μMトコールを作用させ、トータルRNAを調製した。ラット全遺伝子型DNAチップを用い、遺伝子の発現変動を解析した。

(7)Matrix Metalloproteinase(MMP)の検出

MMP-2はゼラチンゼイモグラフィーにて、MMP-3, MMP-13は抗体を用いたウエスタンブロットにて検出した。

(8)マウスにおける肝線維症、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)モデル動物の作成

C57BL/6マウスをHigh Fat Diet 32(HFD32)で飼育し、

streptozotocin 投与により糖尿病を誘発させることにより NASH モデル動物の作成を試みた⁵⁾。マウスの肝臓組織標本から脂肪肝、肝線維化を評価し、脾臓組織標本のインスリン抗体を用いた免疫染色により、細胞の破壊程度を評価した。

4. 研究成果

(1) アノキス誘導の検証

CFSC-2G 及び HSC-T6 にトコールを作用させる際に、広域スペクトルのカスパーゼインヒビター、Z-VAD-FMK を共存させ、アポトーシス誘導阻害により細胞の脱着が抑制される可能性を検討した。その結果細胞の脱着は抑制されず、アポトーシスによる細胞死の結果、細胞が脱着しているのではないことが示された。また、低濃度のトコールを作用させ、接着細胞と浮遊細胞各々の細胞溶融液について、PARP の分解物を検出したところ、浮遊細胞画分に顕著な分解産物を認めた。従ってアポトーシスは細胞脱着を契機として誘導されており、トコールはアノキスを誘導していることが確認された。

(2) FAK の分解とプロテアーゼインヒビターによる阻害
細胞が基質から脱着するためには、接着装置の分解が考えられるが、その構成分子である FAK の分解がトコールの作用により促進されている可能性を検討した。ウエスタンブロットの結果、明らかな分解産物の増加が認められた。さらに CFSC-2G において Aprotinin と Pepstatin A は部分的に FAK の分解を抑制したことから、細胞内での FAK 分解の可能性が示唆された。

(3) プロテアーゼインヒビターによる細胞脱着の阻害
細胞内の分解系と細胞脱着の関連性を検討するために、プロテアソームとリソソームのインヒビターである MG132, chloroquine を用い、細胞内での分解系を阻害したところ、両インヒビター共若干の細胞脱着抑制が観察された。また、トコールを作用させた CFSC-2G においては、Aprotinin, Batimastat (BB-94), E-64d, Pepstatin A いずれも部分的に細胞脱着を抑制したが、HSC-T6 においては、E-64d のみが抑制傾向を示した。従って細胞外における接着装置や基質(細胞外マトリックス)の分解も、細胞脱着に寄与していることが考えられた。

o-Phenanthroline は金属のキレーターであることから、Metalloproteinase を阻害することが知られており、細胞外マトリックス分解酵素を強く阻害する。細胞脱着に対する影響を検討したところ、HSC-T6 と CFSC-2G いずれの細胞においても、顕著に細胞脱着を抑制した。従ってトコールによるアノキス誘導には、MMP が関与していることが強く示唆された。

(4) トコールの作用による CFSC-2G の遺伝子発現変動
ジーンチップ解析を用い、発現遺伝子の変動を解析した結果、MMP-3, 10, 13 に顕著な発現の増大が認められた(表1)。またマトリックス分解酵素である A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) にも明らかな発現増加が認められ、一方 MMP や ADAM の内因性インヒビターである Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) は発現が減少していた(表2)。

表1. MMP 遺伝子の発現変動

Gene	LOG2[ratio Tocol/Control]
MMP-2(Gelatinase)	- 0.12
MMP-3(Stromelysin-1)	2.49
MMP-10(Stromelysin-2)	3.75
MMP-11(Stromelysin-3)	- 2.03
MMP-13(Collagenase-3)	5.33
MMP-14(MT1-MMP)	- 0.69

表2. ADAM 及び TIMP 遺伝子の発現変動

Gene	LOG2[ratio Tocol/Control]
ADAM-1a	1.17
ADAM-4	1.80
ADAM-17	1.09
ADAMTS	2.30
TIMP-1	- 1.19
TIMP-2	- 0.68
TIMP-3	- 0.90

ADAMTS: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif

細胞外マトリックス構成成分で線維を形成するタイプのコラーゲン、I 型と III 型コラーゲンの発現は顕著に減少し、一方基底膜を構成する IV 型コラーゲンの発現はほとんど変化していなかった(表3)。

表3. コラーゲン遺伝子の発現変動

Gene	LOG2[ratio Tocol/Control]
Col1a1	- 2.10
Col1a2	- 1.43
Col3a1	- 1.40
Col4a1	0.83
Col4a2	0.45
Col4a3	1.32

他のマトリックス構成分子である Fibronectin の発現に変動は認められず、基底膜構成分子である Laminin や Nidogen の発現は減少していた。

すなわち、トコールは細胞に作用し、細胞外マトリックスの分解促進と共に、線維性のコラーゲン分子の合成を低下

させ、細胞の基質からの脱着を誘導していると考えられる。さらに、この遺伝子発現を制御する作用は、HSCのアノキス誘導と共に肝線維化の治療にも有用であると推測される。

(5) MMPの検出

MMPは分泌タンパク質であることから、細胞培養上清を用い、MMP-2をゼラチンザイモグラフィでMMP-13をウエスタンブロットにて検出、半定量を試みた。MMP-2は大部分が活性体であり、MMP-2活性にはトコールの作用による変動は認められなかった。これは、MMP-2遺伝子発現に変化が認められなかった現象と一致している結果であった。MMP-13は齧歯類のMMP-1、すなわちコラゲナーゼとして機能している酵素である。MMP-13は細胞培養上清にタンパク質として確認され、トコールの作用により酵素量は増加している傾向が認められた。しかし、遺伝子発現量の著しい増大とタンパク質量の増加は比例していなかった。

(6) 細胞外マトリックスによる細胞脱着阻害

CFSC-2Gの遺伝子発現変動解析の結果、線維形成コラーゲンであるI型コラーゲンの発現が50%以上低下していたことから、培養皿に予めコラーゲンをコートしておき、細胞脱着に対する影響を検討した。ブタ腱由来及び皮膚由来のI型コラーゲンは顕著な細胞脱着阻害を示したが、基底膜マトリックスによる影響は認められなかった。HSCは間葉系細胞であり、一方肝実質細胞は上皮細胞であることから、細胞が異なる基質に接着することが、要因の一つと考えられた。

(7) マウスにおけるNASHモデル動物の作成

マウスに6週間高脂肪食を負荷し、streptozotocin投与を連続3回行ってNASHモデル動物の作成を試みた。対照群に比して顕著な体重増加が認められ、組織標本からは、明らかな脂肪肝が観察された。脂肪滴は特に中心静脈周囲の肝実質細胞の細胞質に認められたが、四塩化炭素で誘導されるような線維の蓄積は認められなかった。膵臓のインスリン免疫組織学的検索では、明らかな細胞の退縮が認められた。線維形成コラーゲン、I型、III型、V型コラーゲン、並びに基底膜コラーゲン(IV型)の分布及び発現について免疫組織学的検討を行ったところ、対照群と比較して明らかな差異は認められなかった。また活性化HSCのマーカーである α -smooth muscle actinの染色性の増加及び肝臓組織への炎症細胞の浸潤も認められなかったことから、脂肪肝の作成には成功したが、NASHモデルの作成には至らなかったと判断された。高脂肪食の組成、streptozotocin投与の時期⁶⁾についての検討が必要であると推察される。

引用文献

Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, et al.

Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*, **362**, 2010, 1675-1685

Yamaguchi N, Mezaki Y, Miura M, et al. Antiproliferative and proapoptotic effects of tocopherol and tocol on activated hepatic stellate cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, **57**, 2011, 317-325

Vogel S, Piantedosi R, Frank J, et al. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* **41**, 2000, 882-893

Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P, et al. Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol*, **146**, 1995, 1508-20

Lo L, McLennan SV, Williams PF, et al. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, **55**, 2011, 435-444

Fujii M, Shibazki Y, Wakamatsu K, et al. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* **46**, 2013, 141-152

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

Hebiguchi T, Mezaki Y, Morii M, Yoshikawa K, et al. Massive bowel resection upregulates the intestinal mRNA expression levels of cellular retinol-binding protein II and apolipoprotein A-IV and alters the intestinal vitamin A status in rats. *Int J Mol Med*, 査読有、**35**, 2015, 724-30

Tanabe Y, Shiota A, Kouroku-Murakami Y, Mezaki Y, et al. Spatial and temporal expression of RA70/Scap2 in the developing neural tube. *Neurosci Lett*, 査読有、**576**, 2014, 1-5

Mezaki Y, Morii M, Hebiguchi T, Yoshikawa K, Yamaguchi N, et al. Differential increases in the expression of intermediate filament proteins and concomitant morphological changes of transdifferentiating rat hepatic stellate cells observed in vitro. *Acta Histochem Cytochem*, 査読有、**46**, 2013, 137-43

Senoo H, Mezaki Y, Morii M, et al. Uptake and storage of vitamin A as lipid droplets in the cytoplasm of cells in the lamina propria mucosae of the rat

intestine. Cell Biol Int, 査読有、37, 2013, 1171-80
Mezaki Y, Morii M, Hebiguchi T, Yoshikawa K
Yamaguchi N, et al. The role of retinoic acid receptors
in activated hepatic stellate cells. Med Hypotheses,
査読有、81, 2013, 222-4

Tanabe Y, Fujita E, Hayashi YK, Mezaki Y, et al.
Synaptic adhesion molecules in Cadm family at the
neuromuscular junction. Cell Biol Int, 査読有、37, 2013,
731-6

Shimada H, Nambu-Niibori A, Wilson-Morifuji M,
Mezaki Y, et al. Epiplakin modifies the motility of the
HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of 3-D
cell clusters. J Dermatol, 査読有、40, 2013, 249-58

Senoo H, Imai K, Mezaki Y, et al. Accumulation of
vitamin A in the hepatic stellate cell of arctic top
predators. Anat Rec (Hoboken), 査読有、295, 2012,
1660-8

[学会発表] (計18件)

山口典子 他「ビタミンE類縁化合物、トコロールは肝
臓星細胞に対して線維形成コラーゲン合成を低下させ、ア
ノイクスを誘導する」第38回日本分子生物学会年会、第
88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日~12
月4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴形成に
おける Perilipin 2/ADRP、Perilipin 3/TIP47 の関与」第
38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合
同大会、2015年12月1日~12月4日、神戸ポートアイラ
ンド(神戸市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴形成に
おけるADRP、TIP47の関与」シンポジウム 肝臓
代謝機構を理解するための多面的アプローチ 第120回日
本解剖学会総会・全国学術集会(第92回日本生理学会大
会との合同大会)2015年3月21日~3月23日、神戸国際
会議場(神戸市)

山口典子「コラーゲン分解物の生理活性」第23回アジ
ア栄養科学ワークショップ 招待講演、2014年11月29
日、中村学園大学(福岡市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴」第66回
日本細胞生物学会大会、2014年6月11日~6月13日、奈
良県新公会堂、東大寺総合文化センター(奈良市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴」第119
回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27日~3
月29日、自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

目崎喜弘 他「活性化肝臓星細胞における中間径フィ
ラメントの役割」日本解剖学会総会・全国学術集会、2014

年3月27日~3月29日、自治医科大学キャンパス(栃木
県下野市)

Yoshikawa K et al. "Involvement of perilipin2/ADRP
and perilipin3/TIP47 in the formation of vitamin
A-storing lipid droplets in hepatic stellate cells" 17th
International Symposium on Cells of the Hepatic
Sinusoid, 9.23-25, 2013, Osaka International
Convention Center (Osaka)

Mezaki Y et al. "Differential increases in the
expression of intermediate filament proteins in
transdifferentiating rat hepatic stellate cells" 17th
International Symposium on Cells of the Hepatic
Sinusoid, 9.23-25, 2013, Osaka International
Convention Center (Osaka)

山口典子 他「ビタミンE類縁化合物、トコロールの肝
臓星細胞に対するアノイクス誘導」第86回日本生化学会
大会、2013年9月11日~13日、パシフィコ横浜(横浜
市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴形成に
おける Perilipin 3/TIP47 の関与」第65回日本細胞生物
学会大会、2013年6月19日~21日、ウインクあいち(名
古屋市)

目崎喜弘 他「肝臓星細胞(ビタミンA貯蔵細胞)の
活性化における中間径フィラメントの発現量と局在の変
化」日本ビタミン学会第65回大会、2013年5月17日~18
日、一橋大学・一橋講堂(東京)

目崎喜弘 他「ヤツメウナギのビタミンA貯蔵に関与
する細胞内レチノール結合タンパク質のリガンド認識機
構の解明」第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013
年3月28日~30日、サンポートホール高松・かがわ国際
会議場(香川県高松市)

山口典子 他「肝臓星細胞に対するビタミンE類縁化
合物、トコロールのアノイクス誘導」第118回日本解剖学
会総会・全国学術集会、2013年3月28日~30日、サンポ
ートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴」第118
回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月28日~
30日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川
県高松市)

Yamaguchi N et al. "Induction of Anoikis by Tocol
in Rat Hepatic Stellate cells" The 35th Annual Meeting
of the Molecular Biology Society of Japan, Dec. 11-Dec.
14, 2012 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡(福岡市)

吉川 究 他「肝臓星細胞のビタミンA脂質滴」第2
6回肝臓洞壁細胞研究会、2012年11月17日~18日、ANA

クラウンプラザホテル(山口県宇部市)

Yoshikawa K et al. "Perilipin 2/ADRP and perilipin 3/TIP47 are involved in the formation of vitamin A-storing lipid droplets in hepatic stellate cells" Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists and The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, May 28 - May 31, 2012, Kobe International Conference Center and The Kobe Chamber of Commerce and Industry (Kobe)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口典子 (YAMAGUCHI Noriko)

秋田大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90251553

(2) 研究分担者

吉川 究 (YOSHIKAWA Kiwamu)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90400481

目崎喜弘 (MEZAKI Yoshihiro)

東京慈恵会医科大学医学部・講師

研究者番号：40431621