

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870501

研究課題名(和文) 多面的網羅解析による胆汁酸受容体FXRの肝発がん抑制作用の分子機序解析

研究課題名(英文) Multiple comparative analysis of FXR-inhibitory effect on liver carcinogenesis

研究代表者

松原 勤 (Matsubara, Tsutomu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20628698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝硬変から肝がんが誘発される分子機序の解明を最終目的として、まず胆汁酸受容体Farnesoid X receptor (FXR)の肝星細胞活性化抑制作用に基づいた分子機序解析を行った。肝臓を構成する細胞の中でも肝星細胞にFXRが高発現していることが分かった。主要胆汁酸の中でもリトコール酸(LCA)が、肝星細胞の活性化抑制を示した。合成FXR活性化物質の中でもGW4064も同様に肝星細胞の活性化抑制を示したが、オベチコール酸は肝星細胞の活性化抑制を示した。詳細な解析が必要であるが、以上の結果は、FXR活性化には複数の経路(形式)があると予想された。

研究成果の概要(英文)：In this study, a molecular analysis of Farnesoid X receptor (FXR)-inhibitory effects in HSC activation was performed, to unveil a molecular mechanism by which liver cirrhosis induces liver carcinogenesis. Hepatic stellate cells (HSCs) were found to express FXR more highly than the other liver component cells. Lithocholic acid showed suppression of human HSC activation among major bile acids (cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, ursodeoxycholic acid). A synthetic FXR activator GW4064 also showed the suppression of human HSC activation, but another synthetic FXR activator obeticholic acid did not. These results may suggest plural pathways (or forms) of the FXR activation, although a detailed study is required.

研究分野：肝臓病学

キーワード：FXR 肝星細胞 肝硬変 肝がん

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は、肝実質が活性化星細胞や筋線維芽細胞などの非実質細胞に置換されて I 型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス物質が蓄積した慢性的肝線維化で、年率 8% で発がんする。肝硬変・肝がんは、現在治療効果が得られにくい疾患であり、その新規治療法の開発が求められている。肝硬変・肝がんの背景肝疾患として現在 C 型肝炎が最も多いが、C 型肝炎ウイルス治療法の目覚ましい進展により C 型肝炎を背景とする肝硬変・肝がんは減少すると予想されている。その一方で、まだ分子病態が明確にされていない非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を背景肝疾患とする肝硬変・肝がんが増加している。また、本邦で糖尿病が増加しており、糖尿病併発肝がんの背景疾患の約 40% が NASH である。このようなことから、今後 NASH が主たる肝硬変・肝がんの背景肝疾患となると考えられている。NASH の分子病態は動物モデルや臨床検体を用いて盛んに解析されているものの、NASH から肝硬変・肝がんへの進展メカニズムは不明な点が多い。

事前研究で、NASH 病態モデルマウスで血清胆汁酸の増加が (NASH も含めた) 肝炎に共通する血清代謝産物変化であると気づいた。この事象は NASH 患者にも認められることが報告されている。胆汁酸は必須の内因性化合物であるものの、その過剰な肝蓄積は肝機能障害を引き起こす。胆汁酸受容体 Farnesoid X receptor (FXR) は、胆汁酸関連遺伝子発現を調節して細胞内胆汁酸レベルを調節する主要因子である。また、事前研究で肝線維化を伴って肝がんを自然発症する FXR 全身欠損マウスと違って、肝実質細胞特異的 FXR 欠損マウスでは肝がんが自然発症しないことを発見した。これらの知見は、非実質細胞の FXR が肝線維化を伴った肝発がんに抑制的に働いていることを示していた。しかし、その分子機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

肝臓は実質細胞および星細胞、Kupffer 細胞、胆管上皮細胞、血管内皮細胞など複数の細胞で成り立っており、NASH の病態悪化に炎症性サイトカインを介した肝実質細胞、肝星細胞、Kupffer 細胞の細胞間ネットワークが寄与していると考えられている。肝疾患病態を捉えるためには、これら個々の細胞の性質ならびに細胞間相互作用を十分に理解する必要がある。近年、慢性肝炎に伴うコラーゲン産生細胞 (肝星細胞や筋線維芽細胞など) の持続的活性化が、肝細胞機能を低下させる要因であり、肝発がんに寄与することが示された。FXR は実質細胞のみならずコラーゲン産生細胞やマクロファージ系細胞といった非実質細胞にも高発現している事や肝実質細胞特異的 FXR 欠損

マウスは肝発がんを認められない事象を考慮すると、肝硬変の病態進展や肝発がんの分子シグナルに非実質細胞の FXR シグナルが抑制的に関与していると推定された。本研究は、FXR シグナルの肝発がん抑制作用の観点から、どの細胞種、どの遺伝子が肝発がんに重要であるかを示し、NASH 背景肝硬変、肝がんの分子病態の解明に挑戦することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞の分画

C57BL/6 マウスの門脈から平衡化溶液およびコラーゲン溶液を灌流した後、肝臓を摘出した。肝臓の一部を 45% パコル液で遠心分離にて肝細胞分画を得た。残りの肝臓をコラーゲン・プロナーゼ E・DNase I 溶液で処理し、8% ナイコデント溶液および 14% ナイコデント溶液で遠心分離して肝星細胞分画、それ以外の細胞分画を得た。

(2) 肝星細胞の単離

C57BL/6 マウスの門脈から平衡化溶液およびコラーゲン溶液、プロナーゼ E を灌流した後、肝臓を摘出した。肝臓をコラーゲン・プロナーゼ E・DNase I 溶液で処理し、8% ナイコデント溶液で遠心分離して肝星細胞を得た。

(3) 細胞培養

HHStcC 細胞は SteCM 培地で経過培養さ、化学物質添加時に DMAEM 培地で処理された。細胞播種 24 時間後に化学物質を添加し、48 時間後に遺伝子発現レベルを観察した。溶媒はジメチルスルホキシドを用い、最終濃度 0.1% で使用した。

(4) 遺伝子発現解析 (定量的 PCR)

細胞を Trizol で可溶化し、RNA 抽出キット Direct-Zol で RNA を抽出した。逆転写キット SuperScriptIII を用いて、抽出した RNA から cDNA を合成した。合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、遺伝子発現量と測定した。

(5) ウェスタンブロット

細胞を Sample バッファーで可溶化して、SDS-PAGE を行った。一般的な Wet 法にて PVDF に転写し、3% スキムミルク/TBST 溶液でブロッキングし、4°C 下で標的抗体と一晚反応させた。室温下で適切な HRP 付加抗体と反応させた後、イムノスターで発色させ、LAS4000 で検出した。発現量は GAPDH で補正された。

(6) レーザーダイセクション

凍結肝組織を薄切し、切り口が同じ面となるスライドの組を作製した。一方を Thy および α SMA 抗体で免疫染色し、他方でレーザー

ダイセクションを行い、Thy(+)/ α SMA(-)細胞(非活性型星細胞)ならびに Thy(+)/ α SMA(-)細胞(活性型星細胞)を単離した。

4. 研究成果

事前研究で、1 年齢の Fxr 全身欠損マウス (Fxr^{-/-})で肝発がん認められるのに対し、1 年齢の肝細胞特異的 Fxr 欠損マウス(Albumin Cre Fxrflox/flox)で肝発がんが認められないことから、肝細胞以外の FXR が肝発がん抑制に働いていると考え、図 1A に示す方法でマウス肝臓から肝細胞分画、肝星細胞分画、それ以外の細胞分画に分離し、定量的 PCR にて Fxr mRNA 発現量を比較すると、Fxr mRNA レベルは肝星細胞特異的に発現するサイトグロビン(Cygb)の発現が高い肝星細胞分画で最も高かった (図 1B)。次に、図 1C に示す方法で単離した肝星細胞の培養時間と Fxr 発現との関係をウェスタンブロットで解析した。培養直後では Fxr 発現が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認されたが (図 1D および 1E)、1 日目以降では Fxr 発現が確認されなかった。汎用されているヒト肝星細胞株 LX-2 細胞より生体の肝星細胞に近い表現型を示すヒト肝星細胞株 HHStcC 細胞を用いて、肝星細胞活性化物質 TGF- β 添加後の FXR mRNA レベルを観察すると著しく低下した (データ示さず)。マウス肝星細胞は培養すると自然活性化することを考慮すると、Fxr 発現の低下は活性化によると考えられた。

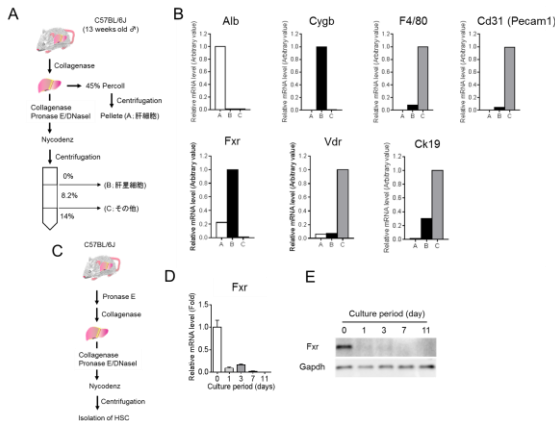


図 1 FXR の発現分布

HHStcC 細胞を用いて、定量的 PCR 解析で FXR 活性化物質による遺伝子発現変化を調べた。まず、FXR は胆汁酸受容体であることから GW4064 に加えて、主要胆汁酸、コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、リトコール酸 (LCA)、ウルソデオキシコール酸を添加した。LCA は α SMA 発現を抑制し、PPAR γ 発現を上昇した (図 2A)。一方、他の胆汁酸は、 α SMA や PPAR γ の発現を変化させなかった (図 2A)。興味深いことに、LCA は細胞老化で遺伝子発現が上昇する IL-8 や CXCL1 の発現を上昇させた (図 2A)。次に、特異的 FXR 活性化剤 GW4064 では、 α SMA の発現を抑制し、PPAR γ の発現を上昇して、

容量依存的な効果を示した (図 2B)。また、LCA と同様に、IL-8 や CXCL1 の発現を上昇させた。しかし、オベチコール酸では、このような変化を示さなかった (図 2C)。胆汁酸に構造が似た類似胆汁酸 X~Z についても同様の実験を行った。類似胆汁酸 X のみ LCA と同様に α SMA 発現を抑制し、PPAR γ 発現を上昇し、IL-8 および CXCL1 発現を上昇させた (図 2D)。

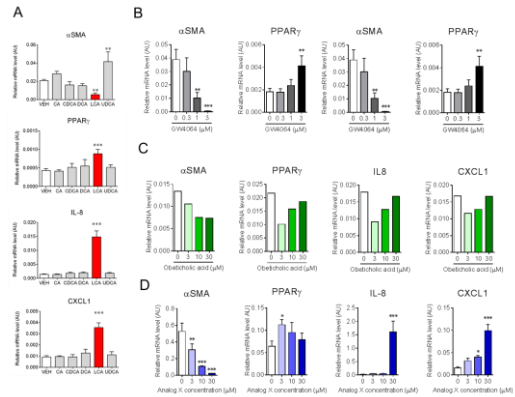


図 2 FXR 活性化物質と遺伝子発現変化

米国国立衛生研究所の Frank Gonzalez 博士の協力を得て、交配させることにより Fxr^{-/-} (全身欠損)、Albumin Cre Fxr^{flox/flox} (肝細胞特異的欠損)、Lys Cre Fxr^{flox/flox} (マクロファージ系細胞特異的欠損)、COL1A1 Cre Fxr^{flox/flox} (コラーゲン産生細胞特異的欠損)の系統が構築できた。これらのマウスにチオアセトアミド (TAA) の投与量を 50 mg/kg 体重から 400 mg/kg 体重へと増量するエスカレーション投与することによって肝硬変モデルマウスを構築した。すべての系統において、TAA 投与で誘発される肝障害の程度 (HE 染色) ならびに線維形成 (Sirius Red 染色) に野生型と欠損型で差が得られなかった。他の施設同様に大阪市立大学医学部動物施設でも 1.5 年齢の Fxr^{-/-}で肝がんの自然発症が観察されたが、Albumin Cre Fxr^{flox/flox} ならびに Lys Cre Fxr^{flox/flox} 系統の欠損型で肝がんの自然発症は観察されなかった。引き続き、COL1A1 Cre Fxr^{flox/flox} 系統の欠損型で肝がんが自然発症するか観察中である。

脂肪肝炎背景肝がん患者 (非 B 型、非 C 型) を解析する予定であったが、十分な検体数が得られなかったため、C 型肝炎背景肝がん患者を解析することによって、肝発がん関連因子を探索することにした。レーザーキャノン顕微鏡で C 型肝炎背景肝がん患者の凍結肝組織から Thy(+)/ α SMA(-)細胞(非活性型星細胞)ならびに Thy(+)/ α SMA(-)細胞(活性型星細胞)を単離し、マイクロアレイ解析を行った。現在、定量的 PCR にて遺伝子発現を確認している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Teranishi Y, Matsubara T, et al. (共筆頭著者、他 6 名、2 番目) Involvement of hepatic stellate cell cytoglobin in acute hepatocyte damage through the regulation of CYP2E1-mediated xenobiotic metabolism. *Lab Invest* (2015) 95(5):515-24. (査読有)
DOI:10.1038/labinvest.2015.29.
- ② Tanaka N, Matsubara T, et al. (他 7 名、3 番目) Adipocyte-specific disruption of fat-specific protein 27 causes hepatosteatosis and insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *J Biol Chem* (2015) 290(5):3092-3105. (査読有)
DOI:10.1074/jbc.M114.605980.
- ③ Tanaka N, Matsubara T, et al. (他 5 名、4 番目) Role of white adipose lipolysis in the development of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1841(11):1596-1607. (査読有)
DOI:10.1016/j.bbaliip.2014.08.015.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 松原勤、肝星細胞の細胞老化に伴う遺伝子発現変化、第 24 回肝細胞研究会、2017.
- ② 松原勤、ヒト老化肝星細胞の遺伝子発現解析、第 30 回肝類洞壁細胞研究会、2016.
- ③ 松原勤、肝星細胞の遺伝子発現における胆汁酸の影響、第 23 回肝細胞研究会、2016.
- ④ Tsutomu Matsubara、Inhibitory effect of bile acids on hepatic stellate cell activation、ISCHS 2015、2015.
- ⑤ Tsutomu Matsubara、Characterization of senescence-associated hepatic stellate cells using human primary culture cells、ISCHS 2015、2015.
- ⑥ 松原勤、肝星細胞によるサイトグロビンの発現に対する酸素分圧と基底膜成分の影響、第 41 回日本肝臓学会西部会、2015.
- ⑦ 松原勤、抗線維化 in vitro 評価系の構築と抗線維化物質の探索、第 41 回日本肝臓学会西部会、2015.
- ⑧ 松原勤、肝星細胞正常性維持へのサイトグロビン (Cytoglobin) の関与、第 22 回肝細胞研究会、2015.
- ⑨ 松原勤、アセトアミノフェン誘発肝障害における小胞体ストレス応答の役割、第 28 回肝類洞壁細胞研究会、2014.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原勤 (MATSUBARA, Tsutomu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20628698

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

池田一雄 (IKEDA, Kazuo)
河田則文 (KAWADA, Norifumi)
寺西優雅 (TERANISHI, Yuga)
小田桐直志 (ODAGIRI, Naoshi)