

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書（平成 26 年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

研究分担者 仲谷 和記 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

研究課題：ヒドロキシラジカルの選択的除去による肝炎の治療および発がん予防に関する研究

研究要旨：肝星細胞はサイトグロビンなどの分子を発現することにより、肝小葉内でのフリーラジカル種の発生を制御する可能性が示唆されている。本研究では、肝組織内のヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）類を除去し、肝炎の治療および発がん予防を行う目的で、銅代謝異常により急性肝炎を発症し、次いで肝腫瘍を自然発症するヒトウイルソン病の疾患モデル動物である LEC ラットを用いた実験を行った。 $\cdot\text{OH}$ 類の選択的除去分子である水素分子を LEC ラットに投与したところ、中枢神経障害は抑制されたが、急性肝障害に対する抑制効果は認められず、また、肝腫瘍の発症予防効果も認められなかった。

A. 研究目的

肝星細胞は、サイトグロビンなどの分子を発現することにより、肝小葉内でのフリーラジカル種の発生を制御している可能性が示唆されている。フリーラジカル種には様々なものが含まれるが、組織における酸化ストレスの主たる原因となっているのはヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）類であり、この $\cdot\text{OH}$ を選択的に除去する物質として水素分子が注目されている。我々も、チオアセトアミド（TAA）投与によるラット肝障害モデルにおいて、水素分子の投与により肝組織内での脂質過酸化反応や TGF β 産生が抑制され、肝線維化が軽減することを報告した（第 29 回 分子病理学研究会、2010）。本研究は、ラットの自然発がんモデルを用いて水素分子による肝炎の治療効果と発がん予防効果を検討し、星細胞機能に対する

作用を含めた、水素分子の治療・予防効果の分子機構を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

銅代謝異常によって肝臓や脳をはじめとする複数の臓器に障害が発生する、ヒトウイルソン病の疾患モデル動物である Long-Evans cinnamon (LEC) ラットとその正常対照動物である Long-Evans agouti (LEA) ラットを用いて実験を行った。LEC ラット、LEA ラットとも高価であるため、それぞれを交配させて殖やし、実験に用いた。LEC ラット、LEA ラットをそれぞれ 2 群にわけ、飽和水素水（エコモ・インターナショナル社製アキュエラ・ブルーにて調製）と脱水素水（超音波洗浄機を用いるなどして、飽和水素水より水素分子を取り除いたも

の)を自由飲水させた。処置・臓器等採取は麻酔下にて行い、安楽死には炭酸ガスを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、「大阪市立大学動物実験管理規程」及び「大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会」の定める倫理規程に基づき実験計画を策定している。そして、「動物実験計画審査小委員会」の審査を合格した動物実験計画の一部として実施の承認を得ている。本研究の動物実験は、基本的に「大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会」の定める動物実験施設内で行っているが、所属研究室で行わなければならない場合に関しては、同委員会の承認を得た「動物実験室」で行っている。

C. 研究結果

LEC ラットは、肝臓に蓄積した銅から生じるフリーラジカル種(主に $\cdot\text{OH}$ 類)による肝細胞障害のため、生後4~6ヶ月齢(16~26週齢)で急性肝炎を発症し、雄では2~4割が、雌では約8割が死亡するとされる。そして生存した個体も慢性肝障害のために、生後1年~1年半(52~78週齢)の間で大部分が肝臓がんを発症すると報告されている。また、ヒトのウイルソン病と同様に脳に銅が蓄積し、ケージ交換などの軽度のストレス暴露によって痙攣発作をおこす。

実験計画段階では、飽和水素水投与によりLECラットの急性肝炎が予防もしくは軽

減され、死亡率が減少すると予想していたが、それに反して、雄雌ともに死亡率の減少が認められなかった。

本研究では、急性臓器障害や中枢神経障害による脱落例が多いことなどから、飼育総数50匹の雄LECラットのうち、78週齢に到達した飽和水素水投与群4匹と脱水素水投与群8匹を用いて肝腫瘍発生の予防効果の評価を行った。飽和水素水投与群の全例と脱水素水投与群の半数例に赤色調の肝腫瘍の発生を認め、組織切片を用いた病理学的検討により肝細胞がんと診断した。また、両群の全例に大小様々な大きさの白色調の肝腫瘍の発生を認めたが、病理学的検討により、良性の細胆管増生であると診断した。26週齢以降の脱水素水投与群にはしばしば痙攣発作が認められたが、飽和水素水投与群では痙攣発作が顕著に抑制された。

D. 考察

水素分子を用いた $\cdot\text{OH}$ 類の選択的除去によって、酸化ストレスから細胞・臓器を保護しようという試みは、2007年に日本医大の太田成男らの研究グループが報告(Ohsawa, Ohta, et al. Nature Med, 2007)して以来、様々な病態に対して研究が行われ、現在まで、数多くの学術的報告がなされてきている。我々もTAA反復投与によるラット肝障害モデルにおいて水素分子が肝線維化を抑制することを報告した。

本研究では、脱水素水投与群に比較して飽和水素水投与群において痙攣発作が著名に

抑制されていたことより、自由飲水による水素分子の投与によって中枢神経障害が軽減されることが示唆された。しかし残念ながら、LECラットの急性肝障害抑制効果と肝腫瘍予防効果は認められなかった。

水素分子の肝発がん抑制効果は、STAMマウスを用いた研究 (Kawai, et al. Hepatology, 2012) が報告されているが、我々が予備的に行った、部分肝切除術とジエチルニトロサミン投与を組み合わせた肝発がんモデルにおいては有意な抑制効果が認められなかった。以上から、現時点では水素分子投与による肝発がん予防は難しいと判断せざるを得ない。

今後は、本科学研究費補助金の研究計画に則り、サイトグロビン遺伝子改変マウスの微細形態学的解析を行う。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

平成26年度研究報告書

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

分担研究者 松原勤 大阪市立大学大学院医学研究科 講師

分担研究課題：抗線維化物質の探索と慢性肝炎が惹起する肝発がん分子機序解析

研究要旨：抗線維化物質の探索でヒト星細胞株 LX-2 細胞に *COL1A2* 遺伝子の発現変動を基盤とした脱線維化評価系を構築し、脱線維化候補化合物 10 種を選定した。さらに、2 種の化合物が初代培養ヒト星細胞株 HHSteC 細胞で用量依存的に α SMA 発現の減弱と CYGB 発現の増加を示し、抗線維化作用を示すと示唆された。一方、ヒト星細胞株 HHSteC 細胞の細胞老化が観察され、HHSteC 細胞は細胞老化で細胞収縮力が増加していた。さらに、細胞老化はサイトカインなどの分泌タンパクの遺伝子発現を上昇させており、星細胞の細胞老化は肝類洞の微小環境を変化させると考えられた。

A. 研究目的

肝硬変は、肝実質が活性化した星細胞 (HSC) や筋線維芽細胞(MFB)などの非実質細胞で置換されて細胞外マトリックス物質が蓄積した状態であり、年率8%で発がんする。

近年、線維化反応の主体をなす活性化 HSC が隣接する肝細胞機能を低下させる要因であり、サイトカインや活性酸素の持続産生により微小環境を攪乱し肝発がんに寄与することが示された。従って、活性化 HSC を生理的状态へ戻し類縁する MFB 機能を制御することで、脱線維化を促し、肝細胞機能の復元ならびに発がん抑制が達成される。

即ち肝硬変の肝機能改善と発がん予防は密接に関係しており、両者を達成する治療とは肝臓を脱線維化させ、残存成熟肝細胞を再生させて発がん要因を排除する方法論となる。本研究は、新規肝硬変・肝がん治療薬の開発に貢献するために、(1) 脱線維化物質を探索し、(2) 肝

硬変・肝発がんにおける持続的 HSC 活性化(細胞老化)の影響をセクレトームの視点から解析する。

B. 研究方法

(1) 抗線維化化合物の探索

脱線維化薬の候補化合物を効率よく選定するために、ヒト星細胞株 LX-2 細胞に *COL1A2* 遺伝子の発現変動を基盤とした脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を構築する。この脱線維化評価系を用いて大阪大学産学連携化合物ライブラリーから抗線維化化合物の候補を選定する。さらに、LX-2 細胞より肝星細胞の表現型を示すヒト初代培養星細胞株 HHSteC 細胞を用いて、その候補化合物が α SMA 発現を抑制し、CYGB 発現を上昇させることを定量的 PCR で確認する。以上の実験で、動物モデルを用いた抗線維化能を評価する候補化合物を選出する。

(2) 慢性肝炎が惹起する肝発がん分子機序解析
星細胞の持続的活性化は細胞老化に至ると推定される。そこで、ヒト初代培養星細胞株 HHSteC細胞を増殖能が低下するまで培養し、HHSteC細胞を老化させる。正常HHSteC細胞と老化HHSteC細胞の細胞収縮力や遺伝子発現を比較して老化HHSteC細胞の特徴を調べる。特に、分泌タンパクの遺伝子発現に着目し、星細胞の細胞老化が肝硬変や肝がんの病態進行に寄与しうるかを検証する。

C. 研究結果

(1) 抗線維化化合物の探索

COL1A2 遺伝子プロモーター2kbの下流に赤蛍光タンパク *mCherry* 遺伝子を導入した LX-2細胞を構築した (図 1A)。この評価系では *mCherry* の蛍光シグナルは細胞数依存的な増加を示し (図 1B)、星細胞の活性化を抑制する ScienCell 社サプリメント(S+)を添加すると *mCherry* 蛍光シグナルが低下した (図 1C)。以上より、この評価系がハイスループットスクリーニングに適用できると判断し、この評価系を用いて 1920 化合物について抗線維化能を検討した。その結果、10 化合物がサプリメントと同等の *mCherry* 蛍光シグナルを低下させた (図 1D)。さらに、HHSteC 細胞における α SMA と CYGB の遺伝子発現変化を観察すると、化合物 2 と化合物 6 は、 α SMA 発現を容量依存的に抑制させ、CYGB 発現を容量依存的に亢進させた (図 1E)。

(2) 慢性肝炎が惹起する肝発がん分子機序解析

HHSteC細胞を18~22回継代すると倍加時間が低下し (図2A)、継代回数20回あたりから細胞形態が大きな紡錘形を示した (図2B)。この

ときのテロメアシグナルおよび細胞老化関連 β ガラクトシダーゼ活性 (SA- β Gal) を観察すると、テロメアシグナルが低下し (図2C)、SA- β Gal陽性細胞数が顕著に増加していた。また、継代回数が増加するにつれて倍加時間 (図3A) やSA- β Gal陽性細胞数 (図3B) は増加した。細胞収縮力は、倍加時間やSA- β Gal陽性細胞数の顕著な変化が認められる以前から増強していた (図3C)。さらに、これら細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイで調べると、図3Dに示すような遺伝子の発現が観察された。

D. 考察

今年度の抗線維化化合物の探索研究で、*in vitro*評価系で1920化合物中2化合物 (化合物2と6) が抗線維化作用を示した。しかし、分子機序は不明なままである。今後、構造相関性など分子機序を明確にする研究が必要である。現在、特許申請・医薬品開発に向けて詳細な*in vitro* POCおよび*in vivo* POCのデータを採取している。

今年度の研究で、HHSteC細胞を持続培養すると細胞老化に陥り、CCL2やIL17など慢性炎症に関係する遺伝子発現の上昇していた。今後、それら因子の寄与を明らかにするため、肝細胞など周りの細胞に対する影響を観察し、微小環境変化の分子機序解析が必要となる。現在、定量的PCRやウエスタンブロットで確認実験を行っている。

E. 結論

臨床応用には詳細な研究が必要であるが、本研究は、抗線維化物質を発見し、細胞老化が慢性炎症を促進し微小環境を変化させる因子を

示唆した。

E. 研究発表

今回の研究内容についてはなし

F. 知的財産権の出願

今回の研究内容についてはなし

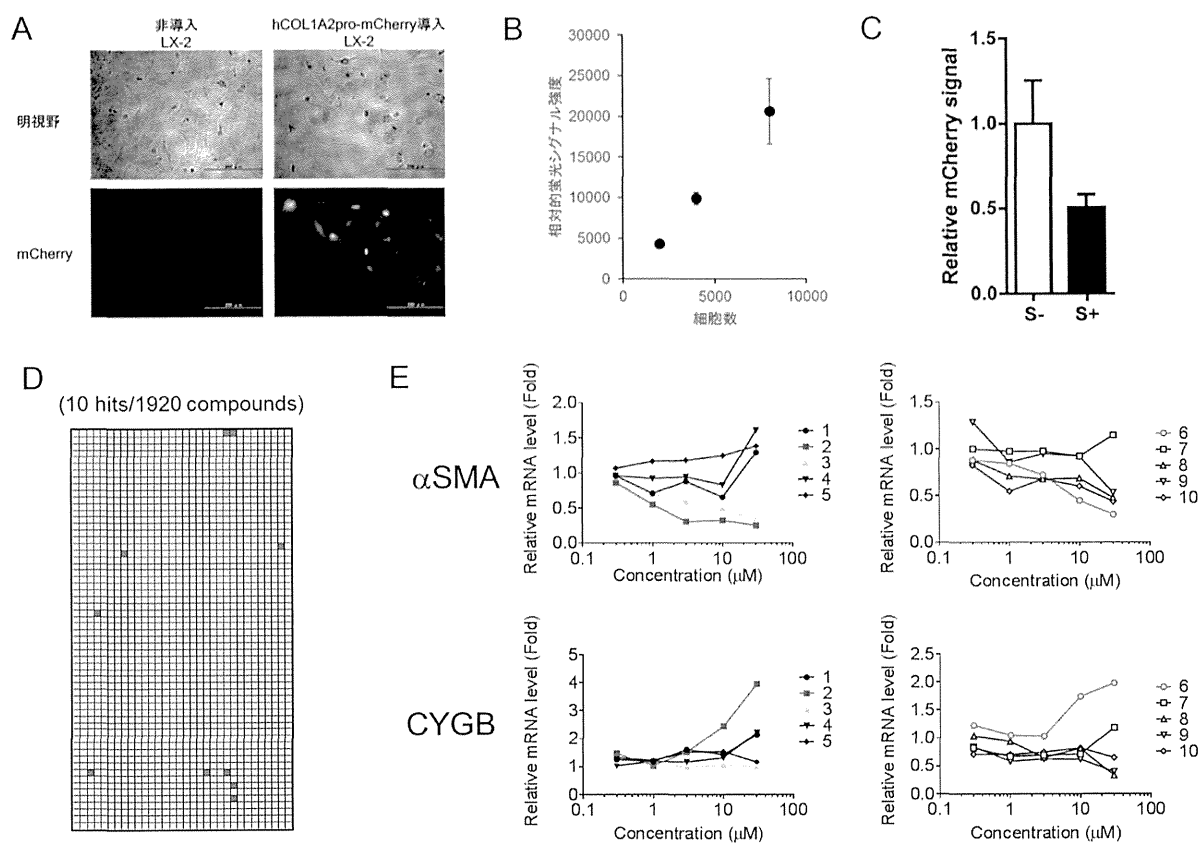


図 1 抗線維化評価系の構築と化合物スクリーニング

A 抗線維化評価系の mCherry シグナル

B 抗線維化評価系の mCherry シグナルと細胞数の相関性

C 抗線維化評価系におけるサプリメントの影響

D 化合物スクリーニングとヒット化合物

E 候補化合物添後の HHStcC 細胞における α SMA と CYGB 発現変化

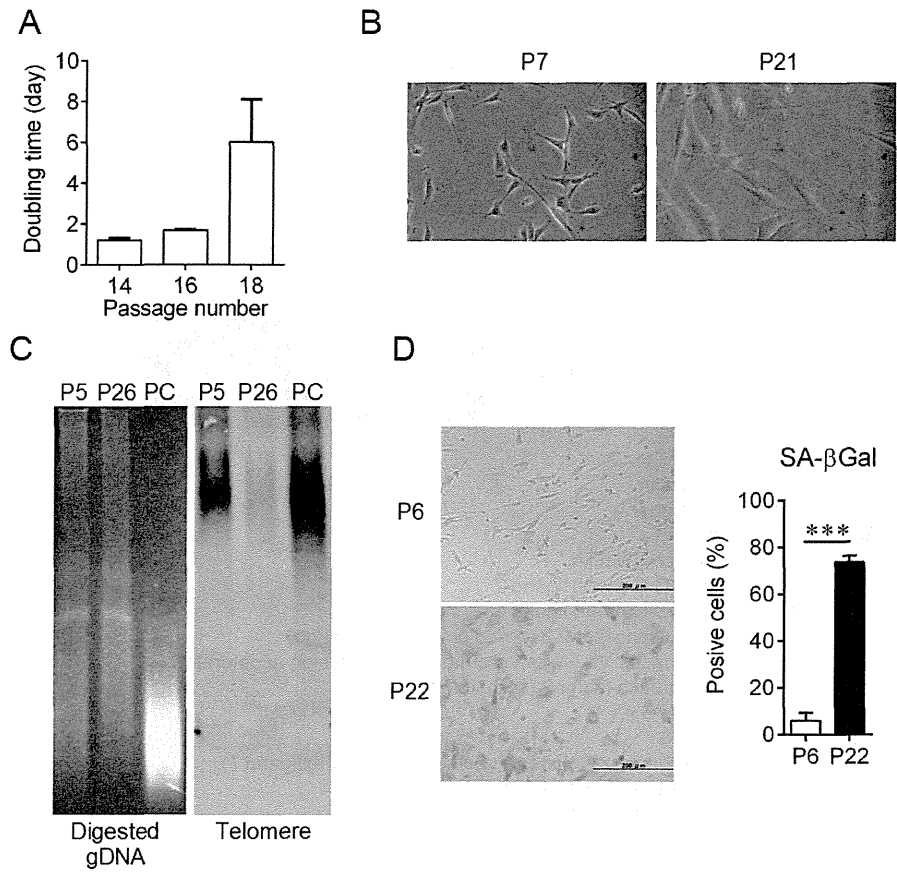


図 2 星細胞の細胞老化モデルの構築

A ヒト初代培養星細胞株 HHSteC 細胞の倍加時間と継代回数

B 老化における HHSteC 細胞の形態変化

C 老化における HHSteC 細胞のテロメア長の変化

D 老化における HHSteC 細胞の老化関連 β ガラクトシダーゼ活性の変化

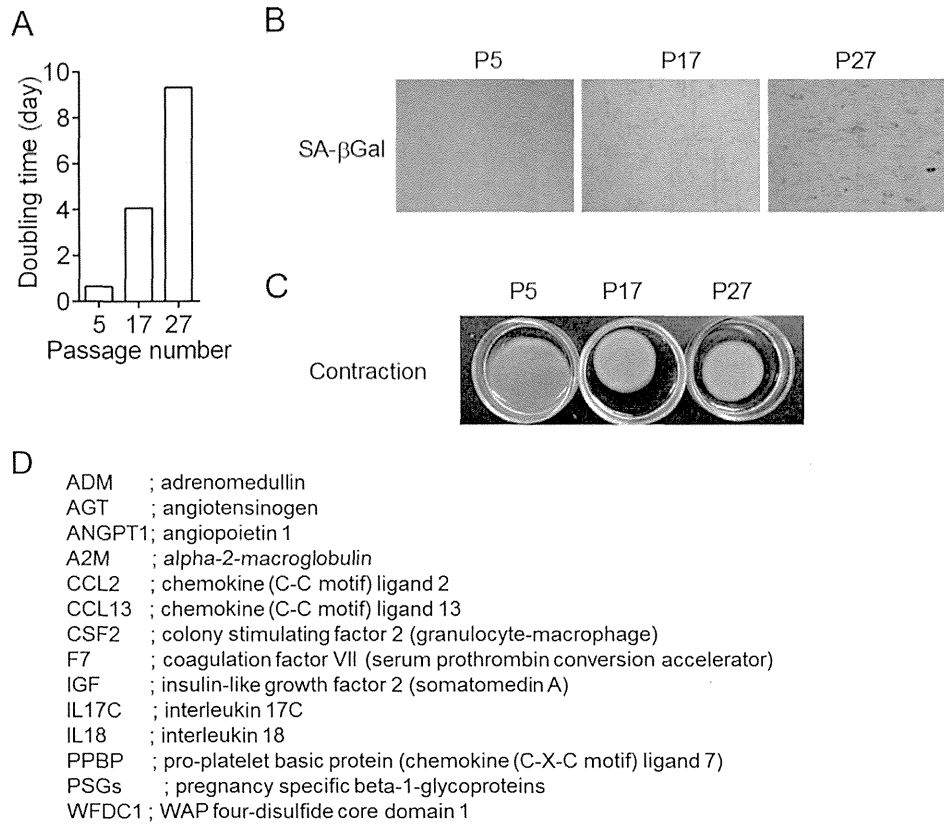


図 3 星細胞の細胞老化と表現型の変化

A HHStEC 細胞の倍加時間と継代回数

B 細胞老化における HHStEC 細胞の老化関連 β ガラクトシダーゼ活性の変化

C 細胞老化における HHStEC 細胞の細胞収縮力の変化

D HHStEC 細胞の細胞老化によって発現上昇した分泌タンパク遺伝子

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究報告書（平成26年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

分担研究課題：ヒト肝星細胞におけるサイトグロビン遺伝子発現調節機構の分子解析

分担研究者 松原三佐子 大阪市立大学大学院医学研究科 特任助教

研究要旨：本研究は、サイトグロビン（CYGB）発現誘導の分子機序を明らかにすることを目的とする。市販されている培養液とそれに附属するサプリメントが星細胞の活性化を抑制することを見だし、含有物質の一つとして fibroblast growth factor 2 (FGF2) を明らかにした。FGF2 は ERK1/2 シグナルを介して α -SMA 発現を抑制し、JNK シグナルで CYGB 発現を亢進していると推定された。今後、詳細な分子機序を明らかにしていく予定である。

A. 研究目的

慢性肝炎から肝硬変に至る過程には活性化星細胞 (HSC) や筋線維芽細胞 (MFB) などの非実質細胞から産生される I 型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス物質の蓄積が関与し、肝線維化は更に発癌の母地となると考えられている。近年、マウスモデルを中心とした研究により肝線維化に関する主要細胞は肝星細胞であることが明らかになった。

HSC は肝臓の炎症、線維化に中心的な役割を果たしている。肝障害により HSC は活性化し肝細胞の産生に必要な hepatocyte growth factor (HGF) を分泌し肝産生を促す一方、transforming growth factor- β (TGF- β) や platelet-derived growth (PDGF) などのサイトカインによりコラーゲンを産生し、自身も筋線維芽細胞様の形態を呈し (=活性化) 増殖し、肝実質の置換により線維化が誘発される。活性化 HSC は α -smooth muscle action (α -SMA), Collagen (COL1A2, COL1A1), PDGFR などを発現しコラーゲン合成促進と細胞の収

縮機能を亢進する。この活性化 HSC の筋線維芽細胞様の転換は可逆的変化と予想され、近年、脱活性化の機序解明の研究が盛んに行われている。核内受容体遺伝子である PPAR γ は静止期の HSC で発現し線維化抑制作用を有するため脱活性化に関わるとされるが、その役割は明確にされていない。

本研究室で発見された Cytoglobin (CYGB) は肝臓では HSC でのみで発現し、抗酸化機能を持ち、HSC の非活性化維持に重要なタンパク質であることが予測される。そのため、本研究では CYGB の線維化に関わるメカニズムの解析を展開し、新規肝硬変治療となりうる CYGB 誘導因子の探索および HSC 脱活性化の分子機序の解明を目的とする。

B. 研究方法（計画）

細胞培養

LX-2 (ATCC 社) および HHS α C 細胞 (ScienCell 社) という 2 種類のヒト肝星細胞から樹立された細胞株を用いた。LX-2 は

2%FBS 含有 DMEM 培地、HHSteC は同社推奨の 2%FBS 含有 SteCM 培養液に付属サプリメント (S) を添加し培養を行なった (Fig. 1)。

ウエスタンブロッティング

60 mm プレートに細胞 5×10^5 cells/well を播種し、約 24 時間培養した後、サプリメント無添加 SteCM 培地に交換しサプリメント (x100) および FGF2 を添加した。FGF2 は 0, 8, 24, 48, 72 時間および 0.5, 1, 2, 4 ng/ml 濃度の FGF2 添加後に RIPA バッファーを用いて細胞ライセート 100 μ l に調整した。また、MAPK と AKT 阻害剤実験では、IC50 を参考とし、MEK (U1026) 20 μ M, JNK (Sp600125) 180 nM, p38 (SB20358) 64 nM、AKT (Triciribine) 260 nM を最終濃度として細胞に添加した。細胞ライセート 20 μ g に 5 x Loading Buffer (+B-ME) を添加し、95°C で 5 分間熱処理後、SDS-PAGE を行った。一次抗体 Anti-Human α -SMA (Clone 1A4, mouse, DAKO) と Anti-Human CYGB (Rabbit, in house), Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), Anti-SAPK/JNK, Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Rabbit, CST) を使用し、rabbit anti-mouse IgG (DAKO), goat anti-rabbit IgG (DAKO) HRP 二次抗体で反応させたのち、ECL を用いて検出した。タンパク質のローディングコントロールとして GAPDH を使用した。

蛍光免疫染色

4 well チャンバースライドに HHSteC 細胞 2×10^4 cells/well を播種し、約 24 時間培養した後、サプリメント無添加 SteCM 培地に交換しサプリメントおよび FGF2 (4 ng/ml) を添加、

72 時間後に 4% paraformaldehyde/PBST で固定した。ウエスタンブロッティングで使用した抗 α -SMA および抗 CYGB 一次抗体を 1 時間反応後 PBST 溶液で洗浄する。二次抗体には AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、AlexaFour 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) を使用した。DAPI で核染色し、蛍光顕微鏡 (BZ-8000, Keyence, Osaka, Japan) 下で観察を行った。

C. 研究結果

LX-2 と HHSteC を各々の推奨培養液の条件下で培養し細胞間の CYGB および α -SMA の発現量を比較した。結果、サプリメントを処理した HHSteC でのみ CYGB の発現が認められ (Fig. 2a)、また、HHSteC ではサプリメント添加により α -SMA 発現が減弱し、CYGB 発現の増強が見られた (Fig. 2b)。サプリメントの含有物である FGF2, IGF1, BSA および insulin から CYGB の発現誘導因子を探索するため各々の組み合わせを添加後、タンパク質を回収、ウエスタンブロッティング法を行った。その結果、FGF2 を含むすべての組み合わせによりサプリメント添加同様、HHSteC で CYGB の発現の増強と α -SMA の減少を認めた (Fig. 2c)。そこでサプリメント中の CYGB 発現誘導因子は FGF2 であると考え、サプリメントに FGF2 中和抗体を添加し、48 時間後の HHSteC の形態および CYGB と α -SMA タンパク質の発現量の観察を行った。サプリメント添加に FGF2 中和抗体を加えた細胞はサプリメント無添加同様の形態転換と CYGB 減少および α -SMA 増加が確認された (Fig. 3a)。さらに、FGF2 は、CYGB 発現量

を時間依存的かつ濃度依存的に増加させ、一方 α -SMA発現量を添加時間依存的かつ濃度依存的に減少させた(Fig. 3b)。蛍光免疫染色でも72時間でCYGB減少および α -SMA増加が確認された(Fig. 3c)。

FGF2によるCYGBの発現誘導活性を担うシグナル因子を明らかにするため、サプリメントおよびFGF2添加後、1時間でリン酸化JNKとERKタンパク質の上昇が観察された(Fig. 4a)さらに、FGF2存在下でERK, JNK, p38およびAKTの阻害剤を処理し、其々の発現パターンを比較したところ、サプリメントによるCYGB発現上昇はJNK阻害剤で抑制され、一方、 α -SMA発現低下はERK阻害剤で抑制されることが分かった(Fig. 4b)。また、FGF2にERKおよびJNK阻害剤を処理した細胞を48時間後に回収し、タンパク質の発現量を比較した結果、FGF2による α -SMAの発現減少はERK阻害剤の濃度依存的に抑制され、FGF2によるCYGBの発現増加はJNK阻害剤の濃度依存的に抑えられることがわかった(Fig. 4c)。これらの結果により、サプリメント中のFGF2がERKシグナルを介し、 α -SMAの発現を減弱させ、JNKシグナルを介しCYGBの発現を亢進させることが明らかとなった。

次に、LX-2とHHSteCのCYGBタンパク質の発現を比較したところ、LX-2ではCYGBの発現が認められなかった。DNAメチル化解析を行った結果、CYGBの転写開始領域で高頻度にメチル化が起こっていることがわかった。LX-2では

高メチル化によりHHSteCに比べ著しくCYGBの発現が低下していると考えられた(Fig. 5)。

D. 考察

サプリメントの含有物からCYGB発現誘導因子としてFGF2見出し、さらにJNKシグナルを介したFGF2の伝達経路を明らかにした。今後、その下流である転写因子を探索し、より詳細な遺伝子発現調節機構の解明を試みる。

今後、線維化に関わる肝星細胞の脱活性化の分子機序をより理解し、その上で安全性を担保とした新規肝硬変治療薬の開発へ発展させる。

E. 研究発表

論文発表

今回の研究内容についてはなし

学会・研究会発表

大石敦子、松原三佐子、松原 勤、吉里勝利、池田一雄、河田則文 ヒト肝星細胞におけるサイトグロビン遺伝子発現調節機能の分子機序 第28回肝類洞壁細胞研究会学術集会 平成26年12月13・14日 アークホテル岡山

F. 知的財産権の出願

特願 2015-77604

Figure 3.

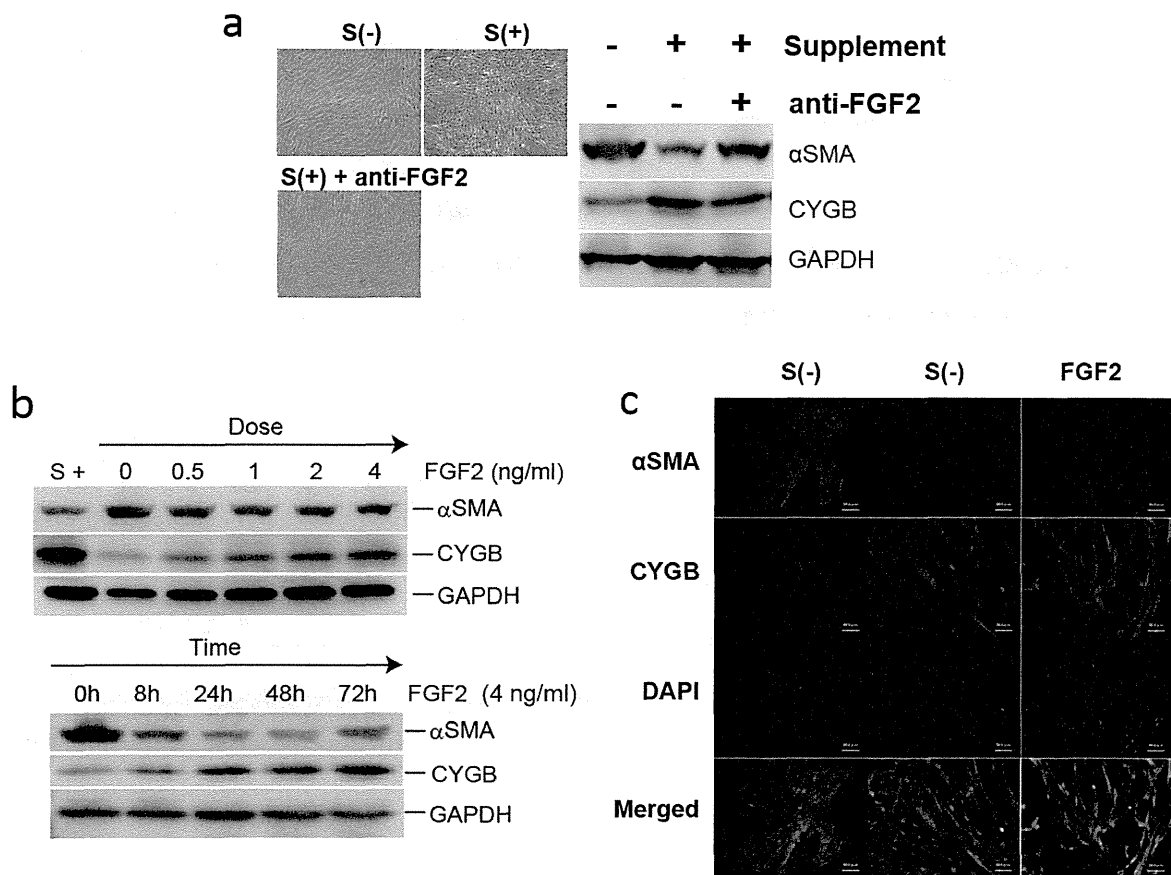


図3の説明

サプリメント中のCYGB発現誘導因子はFGF2であると考え、サプリメントにFGF2中和抗体を添加し、48時間後のHHStcCの形態およびCYGBと α -SMAタンパク質の発現量の観察を行った。サプリメント添加にFGF2中和抗体を加えた細胞はサプリメント無添加同様の形態転換とCYGB減少および α -SMA増加が確認された (Fig. 3a)。さらに、FGF2は、CYGB発現量を時間依存的かつ濃度依存的に増加させ、一方 α -SMA発現量を添加時間依存的かつ濃度依存的に減少させた (Fig. 3b)。蛍光免疫染色でも72時間でCYGB減少および α -SMA増加が確認された (Fig. 3c)。

Figure 4.

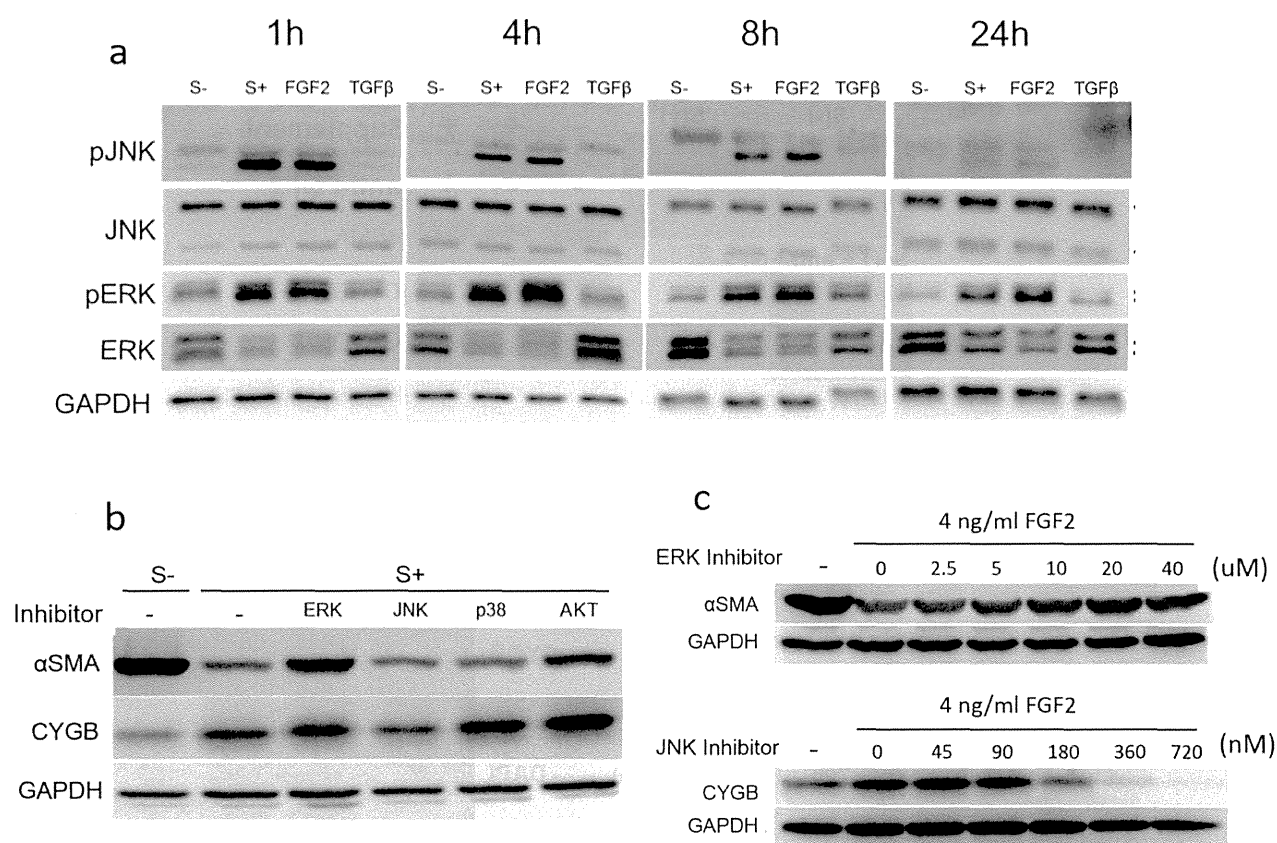


図4の説明

FGF2によるCYGBの発現誘導活性を担うシグナル因子を検討した。サプリメントおよびFGF2添加後、1時間でリン酸化JNKとERKタンパク質の上昇が観察された (Fig. 4a) さらに、FGF2存在下でERK, JNK, p38およびAKTの阻害剤を処理し、其々の発現パターンを比較したところ、サプリメントによるCYGB発現上昇はJNK阻害剤で抑制され、一方、α-SMA発現低下はERK阻害剤で抑制されることが分かった (Fig. 4b)。また、FGF2にERKおよびJNK阻害剤を処理した細胞を48時間後に回収し、タンパク質の発現量を比較した結果、FGF2によるα-SMAの発現減少はERK阻害剤の濃度依存的に抑制され、FGF2によるCYGBの発現増加はJNK阻害剤の濃度依存的に抑えられることがわかった (Fig. 4c)。これらの結果により、サプリメント中のFGF2がERKシグナルを介し、α-SMAの発現を減弱させ、JNKシグナルを介しCYGBの発現を亢進させることが明らかとなった。

Figure 5.

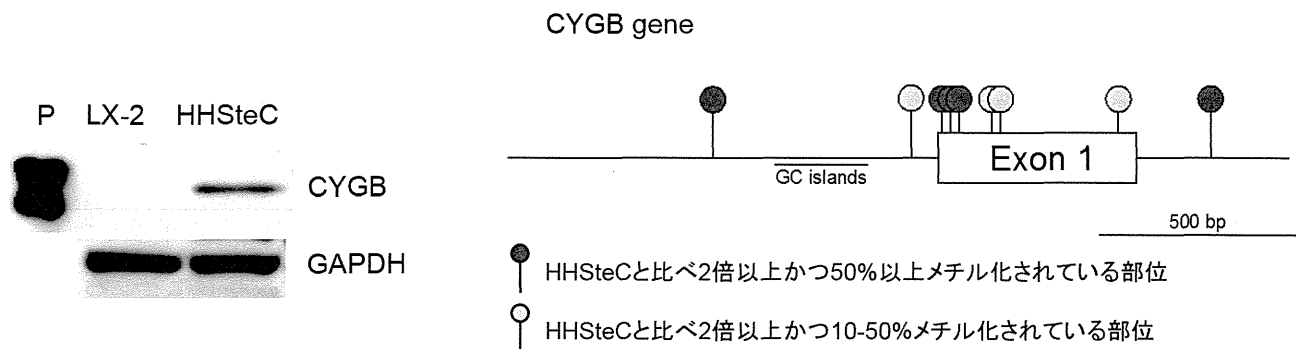


図5の説明

LX-2とHHStcCのCYGBタンパク質の発現を比較したところ、LX-2ではCYGBの発現が認められなかった。DNAメチル化解析を行った結果、CYGBの転写開始領域で高頻度にメチル化が起こっていることがわかった。LX-2では高メチル化によりHHStcCに比べ著しくCYGBの発現が低下していると考えられた。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

平成26年度研究報告書

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

研究分担者 Le Thuy 大阪市立大学大学院医学研究科 特任助教

分担研究課題：サイトグロビンの発がんへの寄与の in vivo 解析

研究要旨：サイトグロビン (cytoglobin, Cygb) は研究グループでラット肝星細胞から単離した哺乳類第4番目のグロビンである。Cygb^{-/-}マウスに diethylnitrosamine (DEN) を投与したところ、マウス肝組織はサイトカインの上昇、高度の線維化を伴って易発がん性を示すことを報告し、Cygb が肝の炎症・線維化と発がんに深く関与することを報告してきた。本研究では、ヒトの非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルとして汎用されるコリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA) マウスモデルを用いて、1) NASH 病態形成への Cygb の関与をモデルで明らかにする、2) Cygb 欠損による炎症反応増幅のメカニズムを明らかにする、3) Cygb の肝内酸化ストレス応答への関与を明らかにする、ことで星細胞に発現する Cygb の肝臓における線維化や炎症反応への関与について in vivo で明らかにする。

A. 研究目的

我々の研究グループではラット肝星細胞に発現する蛋白質を 2D-PAGE とマスマスペクトロメトリーを用いて網羅的解析した結果 (Hepatology 2000;32:268)、21 kDa の蛋白質を同定し、その遺伝子を *stap* (stellate cell activation associated protein) と報告した (J Biol Chem 2001;276:25318, Accession number NM_130744)。本蛋白質のアミノ酸配列はミオグロビン (myoglobin, Mb) と約 30% の相同性があり、細胞質内に存在するため、現在ではサイトグロビン (cytoglobin, Cygb) と呼ばれている。リコンビナント Cygb を作製して結晶化し、その3次元立体構造を決定したところ、8つのヘリックス構造からなり、1分子のヘムを含有することが判り、Mb、ヘモグロビン

(Hb)、ニューログロビン (Ngb) に次いで哺乳類4番目のグロビンであると判明した (J Mol Biol 2004;339:873; Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:671)。最近では哺乳類第5番目のグロビンとしてアンドログロビンも同定されている (Mol Biol Evol 2012;29:1105)。Cygb は静止期の星細胞にも発現し、星細胞の活性化とともに誘導を受けること、また、チオアセトアミドによる肝線維化モデルでは肝組織における Cygb 発現が増加することを観察した (J Biol Chem 2001;276:25318)。一方、ラット全身の免疫染色により Cygb は肝星細胞に高発現するのみでなく、膵臓、消化管や腎臓など内蔵諸臓器に存在する pericyte (ビタミンA貯蔵細胞) にも発現することを見出してきた (Lab Invest 2004;84:91)。

Cygb は Mb に非常に類似した解離定数を保ちながら酸素、一酸化窒素(NO)や一酸化炭素(CO)などのガス分子と結合して生体内ガスのリザーバーとなること (Biochemistry 2003;42:5133) や、Cygb がペルオキシダーゼ活性で過酸化水素 (H₂O₂) を分解 (J Biol Chem 2001;276: 25318) して細胞内酸化ストレス代謝を調節すること、その NO ジオキシゲナーゼ活性により NO が亜硝酸塩への代謝に関わることが報告された (J Biol Chem 2010;285:23850)。しかしながら、Cygb がどのように肝病態へ関わるのかについては依然として不明な点が多い。

このようなこれまでの研究を背景として、我々は Cygb の生体内における役割を明らかにする目的で Cygb ノックアウトマウス (Cygb^{-/-}) を作製した。Cygb^{-/-}マウス自体は正常に生まれたが、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) を投与すると、Cygb^{-/-}は野生型に比較して増強した肝線維化反応を伴いながら易発がん性を呈すること、さらに、その過程に酸化ストレスの亢進状態が関与することを報告した (Am J Pathol 2011;179:1050)。即ち、Cygb の欠損は、DEN 処理下の肝臓において炎症・酸化ストレス・線維化反応を有意に増強させていた。

上記の肝がん誘発物質 DEN を用いた Cygb^{-/-}マウスで得られた炎症・酸化ストレス・線維化反応、さらには易発がん性に関する知見をよりヒトの肝病態に近いモデルを用いながら詳細に検討するために、本研究では、1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態形成、特に、炎症・酸化ストレス・線維化反応、への Cygb の関与をマウスモデルで明らかにする、2) 星細胞

における Cygb 発現の意義を肝細胞との相互作用の観点から検証する、ことを目的とする。

B. 研究方法

平成 26 年度は野生型ならびに Cygb^{-/-}マウスにヒトの病態に似たマウス NASH モデルを作製し、Cygb 欠損による肝臓の組織変化ならびに分子変動を詳細に検討した。

(1)マウス NASH モデル：マウス NASH モデルとしてコリン欠乏アミノ酸置換食 (choline-deficient L-amino acid-defined diet, CDAA) を用いた。コントロールとしてはコリンを含有する choline-sufficient L-amino acid-defined diet (CSAA) 投与群を作製した。各種染色 (HE 染色、シリウスレッド染色、免疫染色) にて炎症反応や線維化反応などのマウス肝組織の変化、浸潤炎症細胞の同定を行うと同時に、肝における分子変動を種々のアレイ (cDNA array、microRNA アレイ、サイトカインアレイ、活性酸素アレイ) などで解析した。

(a)組織学的検討：予備的な実験で当方の研究室でマウスに NASH が誘導できるか、また、Cygb^{-/-}マウスが CDAA 投与に致死的でないかを 8 週間投与で検討した。HE 染色で野生型と Cygb^{-/-}マウス伴に脂肪肝を生じることが確認できた。この段階で炎症細胞浸潤は Cygb^{-/-}マウスで増強していること、シリウスレッド染色でコラーゲンの沈着が亢進していることを確認した。この結果を受けて、浸潤細胞のサブセットをより詳細に検討する。

(b)炎症に関わる分子群の変動：上記の予備的検討により Cygb^{-/-}マウスでは CDAA 投与により炎症や線維化反応が増強する NASH が形成さ

れると推測されたためこのメカニズムを詳細に検討するために、以下の項目を調べた。

①炎症性サイトカインの発現プロファイル：炎症反応に主要な役割りを果たすサイトカインとしてinterleukin (IL)-1, 6, 8, 18、tumor necrosis factor α 、transforming growth factor β (TGF β) やケモカイン (Ccl-2, 3, 4, 5, Cxcl-1, 2) の発現を野生型ならびにCygb^{-/-}マウスで調べた。

②線維化関連遺伝子：NASH では線維化が惹起されることが特徴である。そのため、以下の分子変動についてRT-PCRやimmunoblotで検討を加えた。Collagen 1 α 1, collagen III, fibronectin, transforming growth factor β , connective tissue growth factor, tissue inhibitor of matrix proteinase 1, 2, matrix metalloproteinase 2, 9, 13 など。星細胞活性化との関連で α -smooth muscle actin や desmin 発現も観察する。

③酸化ストレス関連遺伝子：Cygb は Mb などの他のグロビンと同様、ガスキャリアーとして機能すると同時に活性酸素ラジカル種のスカベンジャーにもなり得る。このため、Cygb 欠損により各種抗酸化・活性酸素代謝酵素群が変動する可能性がある。PCR アレイを用いて網羅的に解析を行い、どの分子変動が顕著になるかを見極め、NASH 病態における Cygb 関与の解明に繋げる。同時に、NO や CO の代謝にも変動が生じる可能性があるため、nitric oxide synthetases (NOSs) や hemeoxygenases (HO-1, 2) の発現も解析した。

④初代培養星細胞を用いた検討：野生型マウスならびに Cygb^{-/-}マウスから星細胞を分離培養し、性質の違いについて遺伝子発現の相違か

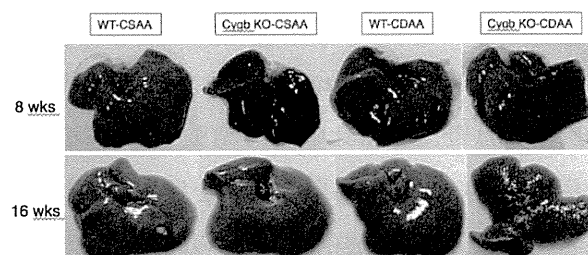
ら検討した。

⑤抗酸化剤投与による病態の改善効果の検討：Cygb の欠損は酸化ストレスの増強を招き、それに基づく炎症や DNA 損傷が生じると推測される。従って、抗酸化剤である N-アセチルシステインを投与することで病態の改善効果が見られるかどうかについて検討を加えた。

C. 研究結果

(1) CDAA モデルにおける Cygb の関与
野生型ならびに Cygb^{-/-}マウスに CDAA あるいは CSAA を与えてヒトの NASH に近いモデル動物を作製した。

CDAA 投与後 16 週間までの観察では野生型に比較して Cygb^{-/-}マウスで炎症ならびに線維化反応の増強が観察された。32 週間まで観察を継続したところ、



上の図に示すように、Cygb^{-/-}マウスでは肝臓が萎縮しており高度の線維化が生じていると同時に、100%のマウスで腫瘍形成が確認された。興味深い事に、腫瘍形成に抵抗性であるメスマウスでも同様の結果であった。以上から、Cygb^{-/-}マウスは CDAA モデルにおいても易発がん性を呈することが改めて確認された。組織学的に CDAA 投与 Cygb^{-/-}マウスでは肝線維化反応やマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が増強した。星細胞活性化のマーカーである α SMA 発現も増強していた。

Cygb^{-/-}マウス肝では CDAA 投与後、IL-1, IL-6,

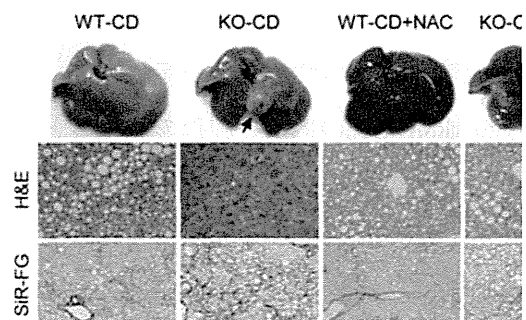
TNF α やケモカイン (Ccl-2, Ccl-3, Ccl-4) mRNA 発現が上昇していた。また、細胞周期関連遺伝子である Cyclin D1, cJun, cFos mRNA 発現も上昇し、関連する細胞内シグナル伝達経路である p-ERK, p-AKT, Cyclin D1 の活性化や蛋白発現が増加していた。さらに興味深い事に Cygb^{-/-} マウス肝では DHE 染色が陽性で活性酸素(O₂⁻) が組織で高発現していること、nitric oxide synthase や heme oxygenase-1 のようなフリーラジカル産生系が up-regulate されていること、また、活性酸素系である myeloperoxidase の過剰発現があることが判明した。即ち、Cygb^{-/-} マウス肝ではラジカル反応が強く生じている事が示され、Cygb の存在が肝臓を生理的状況を維持するのに不可欠である事が示された。解析の結果、myeloperoxidase 陽性の細胞は浸潤した好中球であることや肝臓内では抗酸化ストレス物質が減弱することが示された。

(2) CDAА モデルにおける浸潤マクロファージの関与

先述したように、Cygb^{-/-} マウス肝にはマクロファージが多数浸潤しているため、これらの細胞が肝炎症反応を就職している可能性が高い。このためマクロファージを枯渇させた状況では炎症反応がどのようになるかを検討した。マクロファージの枯渇はリポソーム化したクロドロネートを用いて行なった。即ち、リポソーム化クロドロネートを予め投与した野生型ならびに Cygb^{-/-} マウスを CDAА 食で 8 週間飼育したところ、炎症細胞浸潤が激減したと同時に線維化反応も生じなかった。mRNA 発現では、IL-1, IL-6, TNF α , Ccl-2, Ccl-3, Ccl-4 の全てにおいてその発現が低下していた。以上のことか

ら、Cygb^{-/-} により誘導されるマクロファージの浸潤が重要であることが示唆された。

(3) 星細胞の機能における Cygb 存在の意義
Cygb は静止期の星細胞にも発現が見られるため、Cygb の有無により星細胞機能に差が生じるかどうかについて、野生型ならびに Cygb^{-/-} マウス肝臓から初代培養星細胞を分離してその機能比較を行った。その結果、Cygb^{-/-} マウス由来の星細胞では活性酸素産生が亢進していることが判明した。また、Cygb^{-/-} マウス由来の星細胞では、IL-1, TNF α , IL-6, Cxcl-1, Cxcl-2, Cxcl-7, Ccl-2, Ccl-3, Ccl-4 の mRNA 発現が有意に増強していた。 α SMA, Colla1, Timp-1 の mRNA 発現も増強した。また、野生型マウスから分離した星細胞を siCygb 処理して Cygb を発現低下させると、Cygb^{-/-} マウス肝から分離した星細胞と同じフェノタイプを示した。以上のことから、Cygb^{-/-} マウス由来の星細胞はプライミングを受けており、易刺激性であることが判明した。



(4) CDAА モデルにおける抗酸化剤投与の効果
Cygb の欠損は酸化ストレスの増強を招き、それに基づく炎症や DNA 損傷が生じると推測される。従って、抗酸化剤である N-アセチルシステインを投与することで病態の改善効果が見られるかどうかについて検討した。N-アセチルシステインは 0.1 mmol/L の濃度を自由飲水で投与した。その結果、N-アセチルシステイン