

157. 非実質細胞 FXR に着目した肝発がんの分子機序解析

松原 勤

大阪市立大学 大学院医学研究科 機能細胞形態学

Key words : 胆汁酸, 細胞老化, 肝星細胞, FXR

緒言

肝硬変・肝がんは、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発展により C 型肝炎が根治され、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 による慢性的線維化、肝硬変・肝がんへの病態プロセスが増加すると考えられている。

筆者は NASH 分子病態の研究を行い、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^{1,2)}。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³⁾。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。筆者らは老年期に肝線維化を伴った肝がんが認められる FXR 全身欠損マウス⁴⁾と違って、肝実質細胞特異的 FXR 欠損マウスでは肝線維化や肝がんが認められないことを発見した (未発表)。加えて、FXR 発現は肝実質細胞よりも非実質細胞の方が高い。これらの知見は、非実質細胞の FXR が肝線維化を伴う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、その分子機序は不明な点が多い。FXR の機能に着目して NASH から慢性的線維化、そして肝硬変・肝がんへの微小環境変化を分子レベル解析することで、肝硬変・肝がんの新規治療法の開発に貢献できると考え、研究を開始した。

方法および結果

1. 肝臓内 FXR 発現分布の解析

FXR が肝臓分布を調べるために、C57B6 マウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流した後、一部を取りパーコルを用いた密度勾配遠心で細胞分画 A、残りをコラゲナーゼ、プロナーゼ、DNase 処置した後、ナイコデンツを用いた密度勾配遠心で細胞分画 B および細胞分画 C を得た (図 1A)。これら細胞分画から RNA を抽出し、cDNA を合成した。定量的 PCR にて肝細胞マーカー Albumin (ALB)、肝星細胞マーカー Cytoglobin (CYGB)、肝マクロファージマーカー EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (EMR1、F4/80 とも呼ばれている)、類洞内皮細胞マーカー Cluster of differentiation 31 (CD31、Platelet endothelial cell adhesion molecule-1: PECAM1 とも呼ばれている) の発現を調べると、細胞分画 A は ALB (肝細胞) が、細胞分画 B は CYGB (肝星細胞) が、細胞分画 C は EMR1 (肝マクロファージ) および CD31 (類洞内皮細胞) が主要であった (図 1B)。さらに、FXR および FXR 標的因子 small heterodimer partner (SHP) の発現を調べると、FXR は細胞分画 B で最も高く、肝星細胞に高発現しており、一方、FXR 標的因子 SHP は細胞分画 A で最も高く、肝細胞に高発現していると推定された (図 1C)。以上の結果より、非実質細胞の中でも、肝星細胞の機能が重要であると考えた。

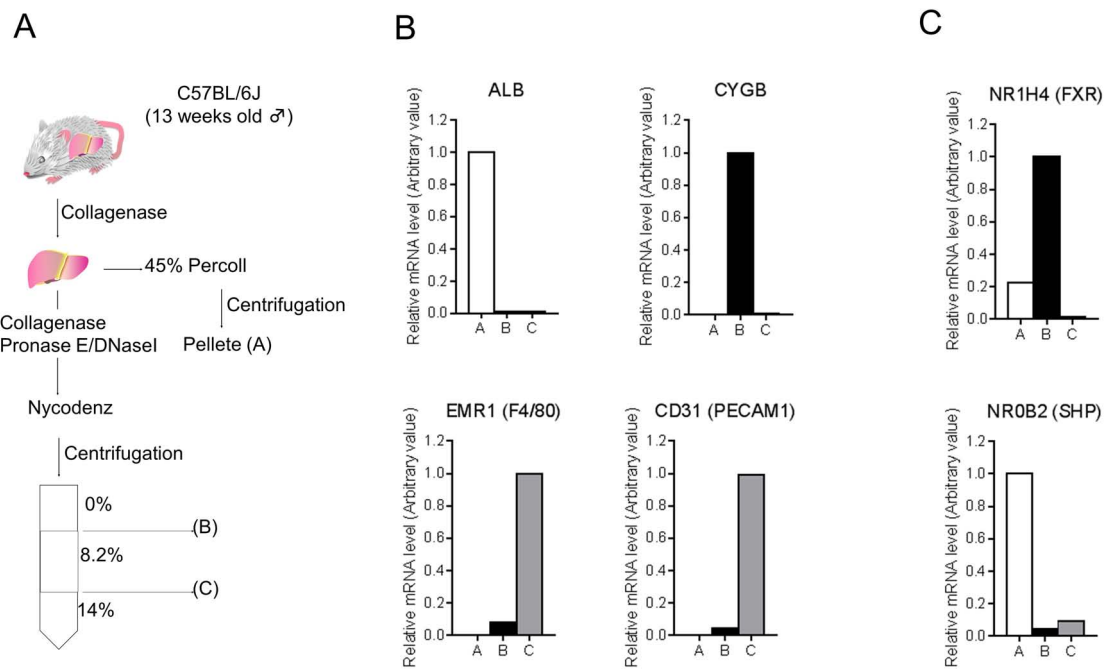


図 1. FXR の肝臓内分布

(A) パーコルとナイコデンツを用いた肝臓の細胞分画の単離方法。(B) 定量的 PCR を用いた各細胞腫マーカーの mRNA レベルの解析。(C) 定量的 PCR を用いた FXR および FXR 標的因子 SHP の mRNA レベルの解析。18S ribosomal RNA で標準化した後、最も発現量が高いものを 1 として表した。

2. 胆汁酸曝露による肝星細胞の表現型の変化

FXR は、内因性物質の中でも胆汁酸によって活性化されることが知られている。次に、ロットの異なる 2 つのヒト初代培養系肝星細胞 (HHStcC) 細胞に主要な胆汁酸、コール酸 (CA) およびケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA)、リトコール酸 (LCA)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA) を $100 \mu\text{M}$ で添加し、2 日後に細胞の形態変化を観察すると、HHStcC は、ロット 1 および 2 の両 LCA 添加群で、スフェロイド様の形態変化を示した (図 2A)。Alpha-Smooth muscle actin (*aSMA*) の発現減弱ならびに Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARg*) の発現増強は、肝星細胞の活性化抑制の一つの指標である。そこで、胆汁酸曝露後の *aSMA* および *PPARg* mRNA レベルを定量的 PCR にて解析すると、ロット 1 の LCA 添加群ならびにロット 2 の CDCA および LCA 添加群で、*aSMA* mRNA レベルの低下および *PPARg* mRNA レベルの上昇が観察された (図 2B、C)。

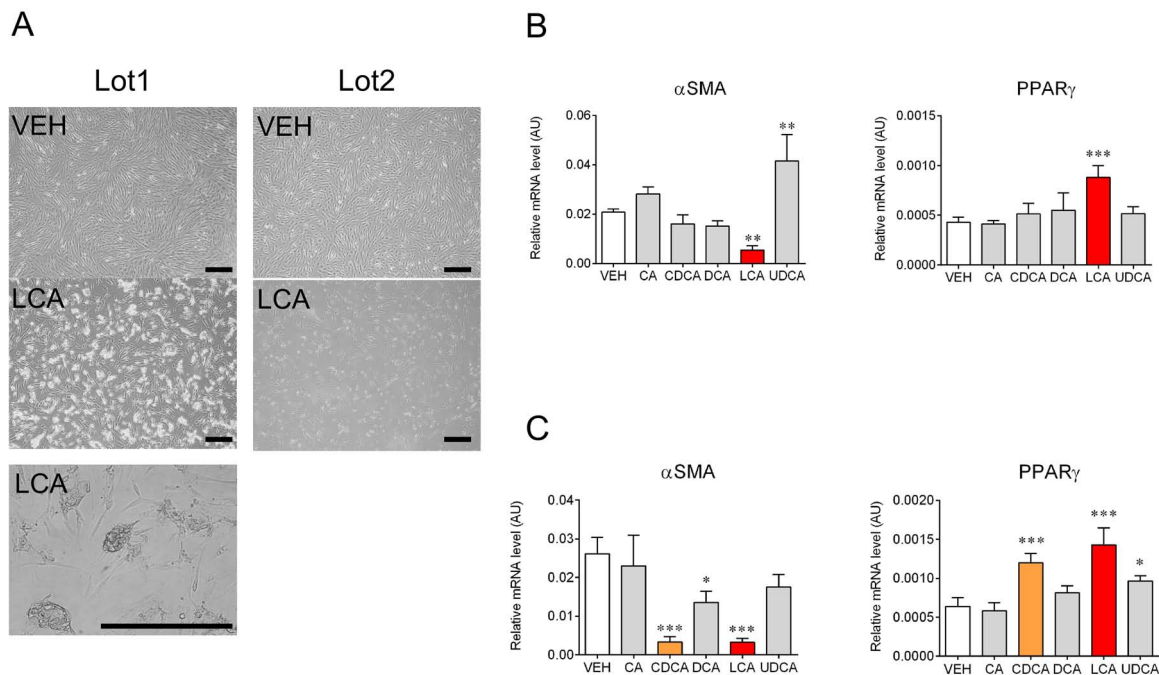


図2. 胆汁酸曝露による形態変化および遺伝子発現変化

(A) LCA 曝露後の HHStEC の形態変化。Scale bar: 200 μ m。定量的 PCR を用いた HHStEC-Lot1 (B) ならびに HHStEC-Lot2 (C) における *aSMA* および *PPAR γ* mRNA レベルの解析。18S ribosomal RNA で標準化した。統計学的有意差は one-way ANOVA に基づいた Dunnett 検定で評価された。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

3. 肝星細胞の遺伝子発現変化における胆汁酸曝露と細胞老化の類似性

HHStEC は、3日間置きの継代で60日間以上連続培養すると、老化細胞の性質を示した(継代老化型:P)。また、HHStEC 細胞は、20 Gy の X 線照射した後、3日間置きを2回することで、老化細胞の性質を示した(X線老化型:X)。ロット1およびロット2のHHStECに継代老化型およびX線老化型の老化星細胞モデルを樹立し、計4モデルの遺伝子発現を定量的PCRで解析し、3モデル以上で変化した場合を老化星細胞の表現型と判断した。その結果、Interleukin 8 (*IL-8*) および Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (*CXCL1*) mRNA レベルの著しい上昇が認められ、興味深いことに、*aSMA* mRNA レベルの低下が観察された(図3A、B)。そこで、胆汁酸添加群の *IL-8* および *CXCL1* mRNA レベルを定量的PCRで解析するとLCA添加群のみならずロット1および2の両方で、*IL-8* および *CXCL1* mRNA レベルの上昇が認められた(図4A、B)。

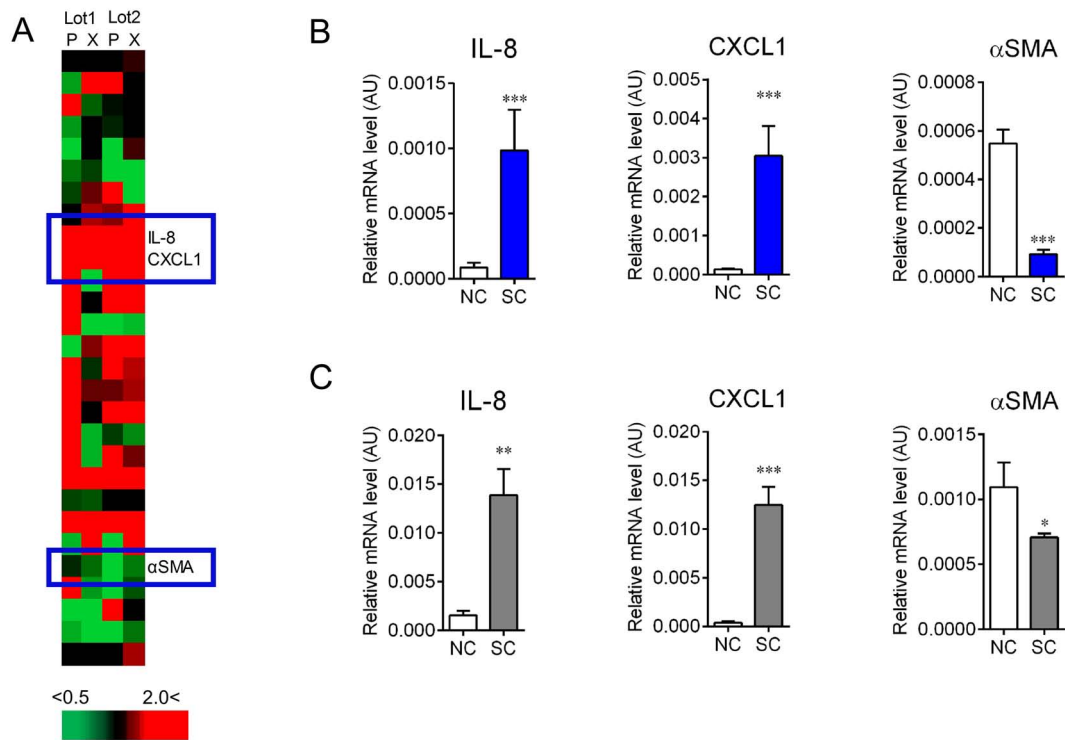


図3. 細胞老化による遺伝子発現変化

(A) 細胞老化における HHStC の遺伝子発現変化のヒートマップ。遺伝子名は *IL-8*、および *CXCL1*、*αSMA* のみ表記した。P: 継代老化, X: X線老化。定量的 PCR を用いた継代老化型 HHStC (B) ならびに X線老化型 HHStC (C) における遺伝子発現解析。18S ribosomal RNA で標準化した。統計学的有意差は両側 t 検定で評価された。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

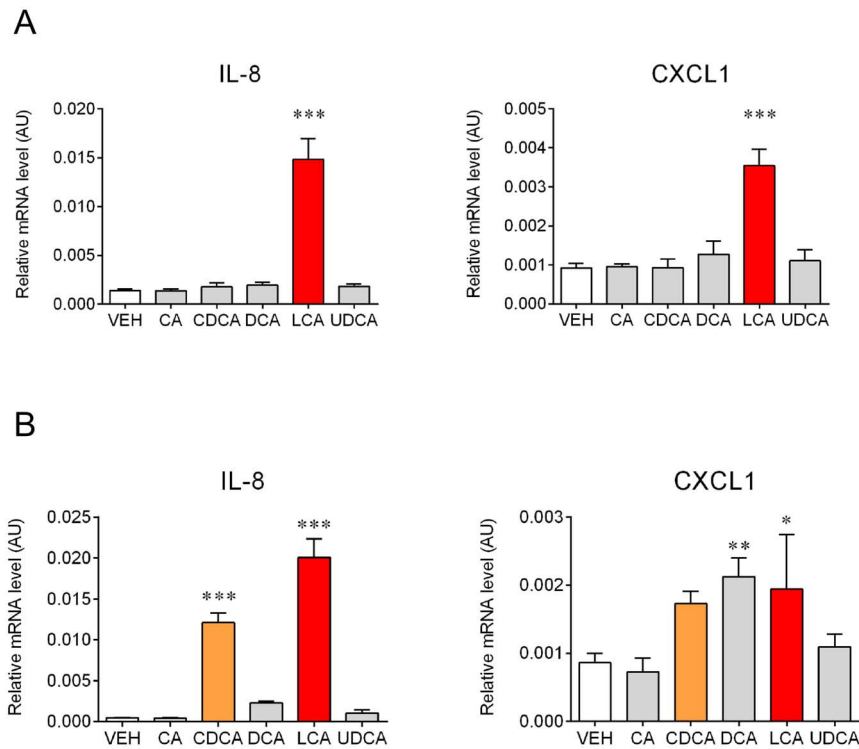


図4. 胆汁酸曝露による老化関連因子の発現変化

定量的PCRを用いたHHStC-Lot1 (A) ならびにHHStC-Lot2 (B) における *IL-8* および *CXCL1* mRNA レベルの解析。18S ribosomal RNA で標準化した。統計学的有意差は one-way ANOVA に基づいたDunnnett 検定で評価された。*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

4. FXR 活性化と細胞老化の関連性

最後にFXR アゴニストGW4064 添加でも同様な遺伝子変化が観察されるか検討した。期待されたとおり、*aSMA* mRNA レベルの低下および *PPARg* mRNA レベルの上昇が認められ、*IL-8* および *CXCL1* mRNA レベルの著しい上昇が観察された (図5)。

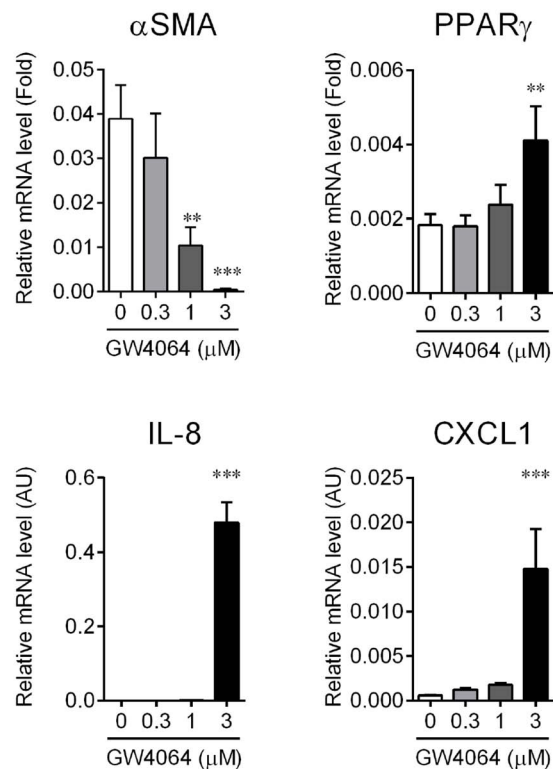


図5. FXR 活性化剤 GW4064 による遺伝子発現変化

定量的 PCR を用いた HHStcC-Lot1 における *aSMA* および *PPARg*, *IL-8*, *CXCL1* mRNA レベルの解析。18S ribosomal RNA で標準化した。統計学的有意差は one-way ANOVA に基づいた Dunnett 検定で評価された。
*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

考 察

本研究で、胆汁酸、特に LCA は、肝星細胞の遺伝子発現を活性化抑制へ向かわせるのに加えて、細胞老化様に変化させることが示唆された。肝星細胞の細胞老化は、肝発がんを促進すると報告と肝発がんを抑制する報告が不明な点が多い。現在、肝星細胞特異的 FXR 欠損マウスを構築しており、LCA が肝星細胞を細胞老化様に変化させる分子機序を FXR 依存性および非依存性の両視点から解析している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪市立大学大学院医学研究科機能細胞形態学池田一雄ならびに米国国立衛生研究所国立がん研究所 Frank J Gonzelz である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matsubara T, Tanaka N, Patterson AD, Cho JY, Krausz KW, Gonzalez FJ. Lithocholic acid disrupts phospholipid and sphingolipid homeostasis leading to cholestasis in mice. *Hepatology*. 2011 Apr;53(4):1282-93. doi: 10.1002/hep.24193. PMID: 21480330
- 2) Matsubara T, Tanaka N, Krausz KW, Manna SK, Kang DW, Anderson ER, Luecke H, Patterson AD, Shah YM, Gonzalez FJ. Metabolomics identifies an inflammatory cascade involved in dioxin- and diet-induced steatohepatitis. *Cell Metab*. 2012 Nov 7;16(5):634-44. doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.006. PMID: 23140643

- 3) Kalhan SC, Guo L, Edmison J, Dasarathy S, McCullough AJ, Hanson RW, Milburn M. Plasma metabolomic profile in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2011 Mar;60(3):404-13. doi: 10.1016/j.metabol.2010.03.006. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20423748
- 4) Kim I, Morimura K, Shah Y, Yang Q, Ward JM, Gonzalez FJ. Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis*. 2007 May;28(5):940-6. Epub 2006 Dec 20. PMID: 17183066