

氏名	ありもと むつこ <b>有本 睦子</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第983号
学位授与の日付	令和3年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>肝線維症における肝星細胞活性化とメカノセンシング</b>
審査委員	(主査)准教授 吉村亮一 教授 伊藤雅信 教授 宮田清司

### 論文内容の要旨

本論文は、肝線維症における肝星細胞活性化とメカノセンシングについて、肝線維症の発症と進展のメカニズムの解明、および肝線維症に対する創薬という観点から述べたものである。

第1章では、本研究全体の背景と目的について述べている。線維性疾患(臓器線維症)は、慢性的な炎症状態に陥った臓器において、I型コラーゲンなどの膠原線維が過剰に蓄積し、臓器の機能不全および再生不能を来す疾患とされるが、その発症・進展機序の詳細は未だ不明な点が多い。肝線維症では、その原因の一つであるC型肝炎の95%以上が新しい抗ウイルス薬によって完治できるようになったものの、その一方で、肥満などによる代謝異常を原因とする非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)、および非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は近年増加傾向にあり、これらに対する根本的治療薬は現在のところない。

肝において線維化の原因となるコラーゲンを産生する主要な細胞は、肝星細胞(HSC)である。肝線維症治療薬の創薬標的として、HSCによるコラーゲン産生・分解および線維化を促進するTGF- $\beta$ の情報伝達系が注目されてきた。しかし近年、TGF- $\beta$ が必ずしもHSC活性化を誘導せず、細胞環境の「硬さ」という物理的性状がHSC活性化の重要な刺激のひとつとなることが知られるようになり、これまでの肝線維症の発症・進展メカニズムの概念が更新されてきた。初代培養HSCは、市販培養プレートを用いた培養で「自然活性化」してしまい制御不能とされていたため、初代培養HSCが研究に使われることは少なかった。一方で、HSCはTGF- $\beta$ によって活性化するという通念に従って樹立された株化細胞が広く用いられてきたため、TGF- $\beta$ 関連因子については広く研究されてきたが、それ以外の経路についての研究は比較的遅れていた。本申請論文では、細胞が「硬さ」を感知し伝達するメカノセンシング/トランスダクションが、HSC活性化および肝線維化発症・進展の重要な機序の一端であると位置づけ実験を行っている。そのために本実験では硬さ刺激によって活性化が誘導される初代培養HSCを用い、 $\alpha$ 平滑筋アクチン( $\alpha$ -SMA)およびI型コラーゲンの遺伝子発現量を測定し、HSC活性化の指標とした。

第2章では、硬さ誘発HSC活性化におけるメカノトランスダクションの関与と、肝線維症に対する創薬標的とすることの妥当性について、いくつかの阻害剤を用いることで検証している。ここではメカノトランスダクション・シグナル伝達に関与する重要な細胞構造である接着斑に着目した。がんの転移には接着斑を構成するインテグリンの関与が知られており、接着斑に関連す

る阻害剤はすでにかん治療薬として使われているものである。これらの抗がん剤の作用点、すなわち薬効メカニズムはメカノトランスダクション阻害であることから、硬さ誘発 HSC 活性化においてもその抑制効果が期待された。実際に細胞環境の硬さ刺激のみの培養では HSC の「自然活性化」を促し、活性化に TGF- $\beta$  シグナル伝達系が関与することが示された。また上述の接着斑関連分子の阻害剤は硬さ誘発 HSC 活性化に対して抑制効果を示したことから、これらのメカノトランスダクションを阻害する薬剤が肝線維症においても有効である可能性が示唆された。

第 3 章では、*in vitro* NAFLD/NASH モデル培養系の樹立と、この培養系におけるシグナル伝達経路阻害剤の効果について調査している。ここでは第 2 章とは異なって、初代培養 HSC をコラーゲンゲル上で培養して硬さ刺激を除去することにより HSC を静止状態に維持したまま培養を行う。その上で、メタボリックシンドロームなどの代謝異常の生体内を模した高グルコースあるいは高コハク酸の条件下で培養を行うことにより HSC 活性化を誘発し、*in vitro* NAFLD/NASH モデル培養系を確立した。この *in vitro* NAFLD/NASH モデル培養系において、原因である高グルコースあるいは高コハク酸を培養の途中から除去した条件（血糖降下薬などの作用を模した条件）、および高グルコースあるいは高コハク酸状態が継続する条件下のどちらでも、コハク酸受容体 GPR91 阻害剤および TGF- $\beta$  阻害剤が HSC 活性化阻害作用を有することを示した。以上より、コハク酸/GPR91 が関与するシグナルおよび TGF- $\beta$  シグナル伝達系が NAFLD/NASH 治療薬の創薬標的として有望である可能性が示された。

最後に、以上のメカノトランスダクションを創薬標的とすることの妥当性の検証、*in vitro* NAFLD/NASH モデルの構築、*in vitro* NAFLD/NASH モデルにおける阻害剤の評価結果をまとめ、本研究の意義について述べている。また既に承認されている薬剤を他の用途に用いるいわゆるドラッグ・リポジショニングの考え方に基づく研究は、創薬開発における安全性評価や薬物動態評価、新規の臨床試験などに必要な時間とコストを省くことができ、薬剤を早期に治療に用いることができるメリットがあると述べている。

## 論文審査の結果の要旨

臓器線維症の治療は現代医学の重要な課題のひとつであるが、その発症および進展の機序については不明な点が多く、根本的な治療法も確立していない。臓器線維症の発症と進展において線維性細胞外基質であるコラーゲンは極めて重要な働きを持つ。申請者は、肝線維症においてコラーゲンを産生する主要な細胞である肝星細胞（HSC）の活性化とその抑制に焦点を当て、創薬開発の観点から研究を行った。

論文の前半では、HSC 活性化の要因として細胞の生育環境の「硬さ」に着目し、環境の硬さを細胞に伝達するメカノトランスダクションに関わる細胞構造である接着斑関連分子の情報伝達阻害により、生体内と比較して非常に「硬い」プラスチックプレート上で培養された HSC の「自然活性化」（硬さ誘発 HSC 活性化）を抑制できるかどうかを評価した。その結果、インテグリンをはじめとする複数の接着斑関連分子の阻害剤が、硬さ誘発 HSC 活性化を抑制することを明らかにした。評価に用いられた阻害薬は抗がん剤として知られているが、肝線維症においても治療効果が期待できることが示唆された。

論文の後半では、前述の HSC の「自然活性化」に関わる細胞環境の「硬さ」を排除した実験条

件で、高グルコース、または高コハク酸がそれぞれ単独で HSC 活性化を惹起しうることを示し、*in vitro* 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) /非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) のモデル培養系を確立した。この培養系を用い、いくつかの条件下でコハク酸受容体 (GPR91) 阻害剤および形質転換増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 阻害剤が HSC 活性化を抑制することを示した。この結果は、コハク酸/GPR91 が関与するシグナルおよび TGF- $\beta$  シグナルが NAFLD/NASH 治療薬の創薬標的の候補として高い可能性を有することを示唆する。

本研究課題は、申請者の製薬企業研究者の経歴が反映された学術的および社会的背景に裏付けされたものであり、その意義と独創性は高い。先行研究は十分に検討され、研究課題の位置づけが明確であり、研究方法も適切であった。また結論を導く過程が明確かつ論理的であり十分妥当な結論を導いていた。論文の体裁は妥当であり、適切な引用が行われていた。

以上の研究は、申請者が筆頭著者で、査読制度のある国際的科学雑誌に掲載済みである、以下の二編の論文を基礎としている。(下記論文にある Mutsuko Sakai は、申請者 有本睦子と同一人である。)

- 1) Mutsuko Sakai, Ryoichi Yoshimura. Mechanotransduction-targeting Drugs Attenuate Stiffness-induced Hepatic Stellate Cell Activation *in vitro*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 44(3):416-421, 2021. DOI: 10.1248/bpb.b20-00815.
- 2) Mutsuko Sakai, Takaaki Sumiyoshi, Takuma Aoyama, Kenji Urayama, Ryoichi Yoshimura. GPR91 antagonist and TGF- $\beta$  inhibitor suppressed collagen production of high glucose and succinate induced HSC activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 530(2):362-366, 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.07.141.