

研究区分	教員特別研究推進 独創・先進的研究
------	-------------------

研究テーマ	肝星細胞脱活性化を誘発する細胞内分子を標的とする肝線維化治療に向けた基盤研究				
研究組織	代 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	山口 桃生
	研究分担者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	大岡 央
		所属・職名	薬学部・教授	氏名	石川 智久
		所属・職名	薬学部・教授	氏名	濱島 義隆
		所属・職名	薬学部・准教授	氏名	稲井 誠
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	山下 賢二
	発 表 者	所属・職名	薬学部・助教	氏名	山口 桃生

講演題目
肝星細胞脱活性化を誘発する細胞内分子を標的とする肝線維化治療に向けた基盤研究
研究の目的、成果及び今後の展望
近年急増している代謝異常関連脂肪肝炎（MASH、NASHより改称）の発症および予後不良には肝線維化が深く関与するが、その有効な予防・治療法は存在しない。肝臓のディッセ腔に位置する肝星細胞（HSC）は、肝傷害時に活性化され、コラーゲンを産生・分泌する筋線維芽細胞様の活性型HSCへと形質転換する。そのため、HSCの活性化抑制は肝線維化の予防につながると考えられている。一方、現状では進行した肝線維化の治療は不可能だが、静止型HSCがコラーゲンなどの細胞外基質を分解する酵素matrix metalloproteinaseを分泌することから、活性型HSCを静止型へと脱活性化できれば、肝線維化も治療可能であると期待されている。 我々は最近、細胞性粘菌の分化誘導因子differentiation-inducing factor-1（DIF-1）が、Wnt/β-catenin経路の抑制を介しHSCの活性化を抑制する一方で、Wnt/β-catenin経路とは異なる経路を介して活性型HSCを静止型HSC様にも脱活性化させるという大変興味深い結果を得た。そこで、我々は、DIF-1のHSC脱活性化作用を担う分子、すなわち肝線維化治療標的候補分子を同定することにより、HSC脱活性化機構の全容を解明し、肝線維化治療薬開発の基盤となる知見の提案を目指した。 化合物データベースChEMBLを用いた<i>in silico</i>解析により10種のタンパク質、また、ビオチン標識DIF-1を用いたショットガンプロテオミクスにより4種のタンパク質をDIF-1の標的分子候補として見出した。その中でも、TGF-β1シグナル伝達経路の主要な転写因子であるSMADに着目した。検討には、LX-2細胞を用いた。SMADの転写活性を評価するために、デュアルレポーターアッセイを採用した。プラスミド（pSBE4-LucおよびpRL-TK）の導入と同時にTGF-β1（5 ng/mL）を処置してHSCを活性化させた。24時間後に再度TGF-β1を処置しHSCの活性化を誘導し続け、DIF-1およびDIF-1構造類似体14種を10 μMで処置した。24時間後にルシフェリンの発光量を測定することで、DIF-1およびその構造類似体がSMADの転写活性に及ぼす影響を評価した。DIF-1およびDIF-1と同様の脱活性化作用を有する構造類似active体8種は、TGF-β1刺激により増加した発光量を減少させた。一方、脱活性化作用を有さない6種の構造類似inactive体は、1種を除いてSMADの転写活性を抑制しなかった。これは、DIF-1 類似体のHSC 脱活性化作用の結果とほぼ関連していたことから、DIF1のHSC脱活性化作用には、SMADの転写活性の抑制が関与することが示唆された。一方、SMADの転写活性を抑制しても脱活性化が誘導されなかった化合物の結果より、HSCの脱活性化にはSMADの転写活性抑制以外の経路も関わる可能性も考えられた。 精度の高い標的タンパク質の選定のために、ネガティブコントロールとして脱活性化作用を有さないビオチン標識 DIF-1 構造類似 inactive 体（Bio-InA）を作製した。今後は、Bio-InA を用いて検討を進める。