



Arg-Gly-Asp-binding integrins activate hepatic stellate cells via the hippo signaling pathway

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2024-03-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 木次, 健介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000129

博士（医学）木次 健介

論文題目

Arg-Gly-Asp-binding integrins activate hepatic stellate cells via the hippo signaling pathway

（RGD 結合インテグリンは Hippo 経路を介して肝星細胞を活性化する）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

慢性肝疾患は進行に伴い肝線維化を生じ、終末像である肝硬変に至ると肝不全や肝細胞がんの併発により、致命的な経過を辿り得る。肝星細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生することで、肝線維化の進展過程において重要な役割を果たしており、肝線維化における重要な治療標的として研究が行われている。肝星細胞のアポトーシス誘導や細胞増殖抑制など、様々な機序による肝星細胞の活性化抑制が研究されているが、細胞外マトリックスの受容体であるインテグリンも肝星細胞の増殖や分化に関与しており、肝線維化の進展において重要な役割を果たしていると考えられている。インテグリンは結合するリガンドにより分類されるが、この中でリガンドの Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を認識する RGD 結合インテグリンは肝星細胞に発現しており、肝線維化の進展過程で重要な transforming growth factor- β (TGF- β) の活性化に関与している。申請者らは以前に非アルコール性脂肪肝炎モデルマウスにおいて、RGD 結合インテグリン阻害薬の投与により、肝線維化が改善することを報告したが、詳細な機序については不明であった。Hippo 経路は器官のサイズを制御するシグナル経路であり、Hippo 経路の抑制は細胞増殖の亢進により発がんに関与することが知られていたが、近年では肝星細胞の活性化に関与することが報告されている。しかし、インテグリンと Hippo 経路の関係については報告が少なく、不明な点が多い。今回、申請者は RGD 結合インテグリン阻害薬による肝星細胞の活性化抑制機序における Hippo 経路の関与について検討した。

〔材料ならびに方法〕

ヒト肝星細胞株である LX-2 と TWNT-1、RGD 結合インテグリン阻害薬である CWHM12 を使用し、CWHM12 による肝星細胞に対する細胞生存と細胞毒性、細胞増殖、活性化抑制に関する影響について評価した。また、CWHM12 による Hippo 経路への影響について、qRT-PCR、western blotting、免疫蛍光染色により評価した。さらに RGD 結合インテグリンの中で CWHM12 が主に阻害する α インテグリンの遺伝子発現を siRNA によりノックダウンし、同様の解析を行った。シグナル解析において focal adhesion kinase (FAK) 活性化薬である ZINC40099027、FAK 阻害薬である PF573228、TGF- β 1 を使用した。

〔結果〕

CWHM12 の投与により、肝星細胞の細胞生存率の低下、死細胞数の増加、細胞増殖と活性化抑制が認められた。死細胞数の増加はアネキシン V 結合細胞数の増加と Western blotting によるカスパーゼ 3 の活性化により、CWHM12 による肝星細胞のアポトーシス誘導によると考えられた。これらの結果を踏まえ、細胞増殖抑制とアポトーシス誘導に関与する Hippo 経路について検討した。CWHM12 の投与により、Hippo 経路の主要なエフェクターである Yes-associated protein (YAP) のリン酸化に伴う分解亢進、YAP の核外移行亢進、YAP の標的遺伝子の発現低下を認めた。また、siRNA により肝星細胞における αv インテグリンのノックダウンを行ったところ、CWHM12 と同様に Hippo 経路の亢進を認め、RGD 結合インテグリン阻害と Hippo 経路亢進の関連を支持する結果が得られた。さらに RGD 結合インテグリンと Hippo 経路の関与について、TGF- β や FAK の活性化薬、阻害薬を用いて詳細な解析を行った。CWHM12 に TGF- β を併用すると、CWHM12 による肝星細胞の活性化抑制とともに Hippo 経路の亢進についても減弱を認めた。さらにインテグリンの細胞内シグナルにおいて重要な役割を果たしている FAK の阻害薬である PF を投与すると、CWHM12 と同様に Hippo 経路の亢進を認めた。一方で FAK の活性化薬である ZINC を CWHM12 に併用すると、CWHM12 による Hippo 経路の亢進は減弱を認めた。さらに CWHM12 と PF を用いてシグナル解析を行うと、FAK-Src-phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)-AKT シグナル軸の抑制を認めた。

[考察]

RGD 結合インテグリン阻害薬による線維化改善効果は肝臓のみならず腎臓や肺などの臓器でも報告されているが、マウスモデルによる *in vivo* の研究が中心であり、*in vitro* の研究はほとんど存在しなかった。また、既報では RGD 結合インテグリン阻害薬による線維化改善機序として TGF- β の活性化抑制が考えられているが、その他の機序については十分に検討されてこなかった。また、Hippo 経路は肝星細胞の研究において近年注目されているものの、肝星細胞の活性化における役割については不明な点が多く、特に RGD 結合インテグリンと Hippo 経路の関係についてはほとんど検討されてこなかった。本研究では RGD 結合インテグリン阻害薬による肝星細胞の活性化抑制において、TGF- β の活性化抑制のみならず、Hippo 経路の亢進が関与していることが示唆された。さらに FAK 活性化薬と阻害薬の使用により、RGD 結合インテグリン阻害薬による Hippo 経路の亢進において、FAK-Src-PI3K-PDK1-AKT シグナル軸の抑制が重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究は肝星細胞における RGD 結合インテグリンと Hippo 経路の役割について、新たな知見を与える重要な報告であると考ええる。

[結論]

RGD 結合インテグリンは Hippo 経路を介して肝星細胞を活性化することが示唆された。RGD 結合インテグリンは肝線維化における重要な治療標的の一つと考えられる。