



報道関係者各位

2023.10.11

東邦大学

FGF18 は肝星細胞の増殖を促進し、肝線維化を亢進させる ～ FGF18 は肝線維化の新たな治療標的 ～

東邦大学薬学部生化学教室の土屋勇一准教授と同医学部生化学講座の中野裕康教授の研究グループは、Fibroblast growth factor 18 (FGF18)と呼ばれる増殖因子が、肝星細胞の増殖を促進することで、肝臓の線維化を亢進させることを明らかにしました。また、ヒトの肝生検を用いた解析からも FGF18 の発現と肝臓の線維化が関連していることを明らかにしました。本成果は慢性肝炎に伴う肝線維化を制御する治療法を開発する上で、FGF18 が新たな治療標的となる可能性を示したものです。

この研究成果は 2023 年 10 月 9 日に科学誌「*Nature Communications*」に掲載されました。本研究は国立国際医療研究センター研究所 田中稔室長、東京理科大学 七野成之講師、松島綱治教授、西山千春教授、熊本大学 荒木喜美教授、兵庫医科大学 大村谷昌樹教授、順天堂大学 福原京子助教、池嶋健一教授、奥村康特任教授、八木田秀雄特任教授、京都大学 及川彰教授、東京大学定量生命科学研究所 宮島篤特任教授、星薬科大学 今村亨特任教授らとの共同研究によるものです。

◆ 発表者名

土屋 勇一（東邦大学薬学部生化学教室 准教授）

中野 裕康（東邦大学医学部生化学講座 教授）

◆ 発表のポイント

- 肝細胞で細胞死の亢進したマウスを利用して、肝線維化に関与する因子として FGF18 を同定しました。
- FGF18 を発現する細胞が肝細胞と肝星細胞であることを同定しました。
- FGF18 を肝細胞で特異的に欠損したマウスを樹立し、肝線維化誘導食を与えたところ肝線維化が減弱しました。
- FGF18 を肝細胞で過剰発現したマウス (*Fgf18* トランスジェニック (Tg) マウス) を樹立したところ、自然に肝線維化が誘導されました。

- *Fgf18* Tg マウス由来の間質細胞を用いた 1 細胞 RNA シークエンスの解析から、このマウスの肝臓では肝星細胞が増殖していることを見出しました。
- 野生型マウス由来の肝星細胞を FGF18 で刺激したところ、肝星細胞の細胞増殖を促進しました。
- ヒト肝生検のサンプルを解析したところ、肝臓における FGF18 の発現は、肝臓の線維化の指標である *COL1A1* や *ACTA2* の発現と相関していました。

◆ 発表概要

細胞死の亢進は肝臓の線維化と密接に関連していることが報告されています。そこで肝細胞で細胞死の亢進しているマウスに、肝臓に線維化を誘導する食事を投与することで、新たに肝臓の線維化に関与する遺伝子として FGF18 と呼ばれる増殖因子を同定しました。FGF18 を肝臓で欠損させると、肝臓の線維化が減弱し、逆に肝臓で過剰に発現させると肝臓の線維化が亢進することを見出しました。FGF18 を過剰に発現するマウスから間質細胞を採取して 1 細胞 RNA シークエンスを行ったところ、肝星細胞の細胞数が増加していることがわかりました。さらに初代培養の肝星細胞を FGF18 で刺激したところ、肝星細胞の細胞増殖を促進することを見出しました。またヒト肝生検サンプルを用いた解析から、FGF18 の遺伝子発現と肝臓における線維化の指標である *COL1A1* や *ACTA2* などの遺伝子の発現とが正に相関することを明らかにしました。本研究により、FGF18 は肝星細胞の細胞増殖を介して肝臓の線維化を促進していること、また FGF18 は肝線維化の新たな治療法を開発する上で標的となることが明らかとなりました。

◆ 発表内容

本研究の背景

肝臓の線維化は慢性の肝障害に伴い誘導されますが、従来その原因としては B 型や C 型肝炎ウイルス、アルコールの過剰摂取、薬剤あるいは自己免疫などと考えられていました。しかし近年アルコールを摂取しないにも関わらず、肥満や糖尿病などに伴い脂肪肝に罹患している人 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) が日本では 2 千万人を超え、そのうちの約 10 ~ 25% の人が nonalcoholic steatohepatitis (NASH) と呼ばれる肝炎に進展し、最終的には肝硬変や肝がんを発症することが注目されています。最新の名称の変更で、これらの疾患はそれぞれ metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) や metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) (注 1) と呼ばれるようになりました。肝臓の線維化はさまざまな原因で誘導されますが、肝臓の線維化がこれらの病気の長期予後を決定する因子であることから、その進行を遅らせる治療法や、それを改善する治療法が求められており、医療における喫緊の課題となっています。肝臓の線維化を促進あるいは誘導する因子としては、細胞死、酸化ストレス、脂肪毒性などが重要であることが指摘されていますが、そのメカニズムは完全に解明されている訳ではありません。肝

臓は肝細胞以外にも、クッパー細胞、肝星細胞（注 2）、類洞内皮細胞などのさまざまな細胞から構成されていますが、中でも肝星細胞は肝障害により活性化し、筋線維芽細胞へと分化することから、肝臓の線維化において中心的な役割を果たす細胞の 1 つです。

本研究の成果

研究グループはこれまでの研究から cFLIP（注 3）と呼ばれる細胞死を阻害する遺伝子を欠損させたマウスでは、肝細胞がアポトーシス（計画的な細胞死）を起こしやすくなっているという現象を見出していました。肝臓の線維化はアポトーシスと密接に結びついていることから、この遺伝子改変マウスに線維化を誘導するために、コリン欠乏食エチオニン添加水(CDE)食（注 4）を投与したところ、通常のマウスと比較して、劇的に肝臓の線維化が進行することを見出しました。そこで線維化の促進に関係する遺伝子を同定するために RNA シークエンス（注 5）を行い、肝臓の線維化の亢進とともにさまざまな線維化に関与する遺伝子の発現が上昇していました。研究グループはこれらの遺伝子群のうち、これまで肝臓の線維化に関与することが報告されていなかった FGF18（注 6）という遺伝子に注目しました。まず FGF18 は通常の食餌で飼育されたマウスでは肝臓でほとんど発現しておらず、肝線維化を誘導するような食事を投与することで上昇すること、さらに肝細胞死亢進マウスに CDE 食を与えることで顕著に上昇することがわかりました。FGF18 を発現している細胞を同定するために改良型の *in situ hybridization* である RNA スコープ（注 7）という手法を行い、FGF18 を発現している細胞は肝細胞と肝星細胞であることを明らかにしました。

FGF18 の線維化への役割を調べるために、肝細胞で *Fgf18* 遺伝子を欠損したマウスを作製し、CDE 食を投与したところ、肝細胞死が亢進している条件では、肝臓の線維化が減弱していました。そこで今度は逆に FGF18 を肝臓で過剰に発現するマウス（*Fgf18* トランスジェニックマウス、*Fgf18* Tg マウス）を樹立したところ、肝線維化を自然に発症することが明らかになりました（図 1）。そのメカニズムを明らかにするために、肝臓の間質細胞に焦点を絞り 1 細胞 RNA シークエンス（注 5）を行いました。その結果 *Lrat* 陽性の比較的静止期にある肝星細胞が増加していることが明らかとなりました（図 2）。さらに細胞間のコミュニケーションを推測するツールを用いて解析したところ、FGF18 は FGF 受容体の中でも FGFR2 を介して肝星細胞にシグナルを導入している可能性が示唆されました。そこで野生型マウスから調製した肝星細胞を用いて、FGF18 刺激を加えて線維化マーカーの発現上昇の有無を検討しました。すると予想外なことに肝星細胞を FGF18 で刺激しても TGFβ1（注 8）刺激で起こるような *Colla2* および *Acta2*（注 9）などの肝線維化マーカー遺伝子の発現誘導は起こりませんでした（図 3a）。このことは FGF18 は TGFβ とは異なる作用で肝線維化を引き起こしていることを示唆しています。その後の解析から FGF18 は肝星細胞に細胞増殖を誘導すること、さらに細胞増殖に関与する遺伝子である *Cyclin d1*（*Ccnd1*）（注 10）の発現を誘導することを明らかにしました（図 3b, c）。これらの結果から、

FGF18 は肝星細胞の増殖を誘導する一方で、肝星細胞がさらに活性化するためには、異なる因子であると考えられました。

また FGF18 による肝臓の線維化誘導がヒトの肝疾患でも見られる現象なのかを検討するために、様々なヒト肝疾患患者の肝生検サンプルを用いて遺伝子発現解析を行いました。その結果肝臓での *FGF18* の発現と *COL1A1* や *ACTA2* (注 9) などの線維化マーカーに正の相関が認められたことから、FGF18 はヒトにおいても肝臓の線維化に関与している可能性が示唆されました。以上よりアポトーシスに陥った肝細胞はマクロファージに貪食されて TGF β を放出し、TGF β が肝星細胞や肝細胞からの FGF18 の産生を誘導します。誘導された FGF18 は肝星細胞に働きかけ、細胞増殖を誘導します。増殖した肝星細胞にさらなる別の活性化シグナルが入ると、線維化関連遺伝子の産生が誘導され、最終的には肝臓の線維化が亢進するというモデルを提唱しています (図 4)。

今後の展望

FGF18 は肝星細胞の増殖を介して肝臓に線維化を誘導している可能性が高いことから、FGF18 の活性を阻害することで肝線維化を抑制できる可能性が示唆されました。既に研究者らはヒト FGF18 に対する中和抗体の作製に成功していることから、抗体医療への展開も考えられます。また血中のヒト FGF18 を高感度で検出することのできる ELISA の系の樹立にも成功しており、予備実験の結果ではいくつかのがん種の患者血清で FGF18 が上昇していることを見出しており、FGF18 がその他の疾患のバイオマーカーとなりうると思っています。

◆ 発表雑誌

雑誌名 : 「*Nature Communications*」 (2023 年 10 月 9 日)

論文タイトル : Fibroblast growth factor 18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis

著者 : Tsuchiya Y, Seki T, Kobayashi K, Komazawa-Sakon S, Shichino S, Nishina T, Fukuhara K, Ikejima K, Nagai H, Igarashi Y, Ueha S, Oikawa A, Tsurusaki S, Yamazaki S, Nishiyama C, Mikami T, Yagita H, Okumura K, Kido T, Miyajima A, Matsushima K, Imasaka M, Araki K, Imamura T, Ohmuraya M, Tanaka M, Nakano H.

DOI 番号 : <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42058-z>

論文 URL : <https://www.nature.com/articles/s41467-023-42058-z>

◆ 用語解説

(注 1) Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis : MASH、

Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease : MAFLD

これまで nonalcoholic steatohepatitis (NASH)あるいは nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)と呼ばれていたが、最近の名称変更により metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH)や metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD)と呼ばれるようになった。

(注 2) 肝星細胞 (hepatic stellate cells : HSCs)

肝臓の類洞内皮と肝細胞との間の Disse 腔に存在する間葉系細胞であり、vitamin A を大量に細胞質内に顆粒として貯蔵しており、静止期には体内の vitamin A 代謝に関係している。特徴的なマーカーとして Lecithin retinol acyltransferase (Lrat)や desmin を高発現している。慢性肝障害に伴い TGF β などにより活性化されると、これらの特徴的なマーカーの発現を失い、 α -smooth muscle actin (α -SMA)陽性の筋線維芽細胞へと分化し、コラーゲンなどの大量の細胞外マトリックスを産生して、肝臓の線維化を促進する。

(注 3) cFLIP

Cellular FLICE-inhibitory protein の略であり、アポトーシスに関与するカスパーゼ 8 と構造的に類似しているが、酵素活性を示さないことから、カスパーゼ 8 に結合して阻害し、細胞死を抑制する働きをもつ。この遺伝子が肝細胞で欠損すると、肝細胞のアポトーシスが亢進する。

(注 4) コリン欠乏エチオニン添加水(CDE)食

肝臓から全身の組織への脂肪の運搬を阻害する薬剤の入った食事であり、肝臓に著明な脂肪の蓄積、線維化、および細胆管の増生を誘導する。

(注 5) RNA シークエンス、1 細胞 RNA シークエンス

RNA シークエンスは、次世代シーケンサーを用いて取得したリードの情報をもとに、RNA 配列を解析する手法であり、得られた情報をもとにデータ解析することで、サンプル内の遺伝子の発現量が解析できる。それを組織レベルではなく、個々の細胞レベルでどのような遺伝子が発現しているかを解析する手法が開発されており、その解析手法を 1 細胞 RNA シークエンスと呼ぶ。

(注 6) FGF18

FGF ファミリーに属するサイトカインの 1 つで、FGF ファミリーが大きく 5 種類に分類される中で、FGF18 は FGF8 サブファミリーに属する。FGF18 はヘパリン硫酸などに強く

結合し、分泌された局所でその効果を発揮する。これまでの研究から骨発生や軟骨発生に関与していることや、ある種のがんで高発現していることが報告されていたが、肝臓の線維化についての報告はほとんどなかった。

(注7) RNA スコープ

組織中でどの細胞で目的とする遺伝子が発現しているかを検出する新しい手法であり、複数の目的とする遺伝子がどの細胞で発現しているかを同時に、検出することができる。

(注8) TGF β 1

TGF は transforming growth factor の略であり、さまざまな生体応答に関与するサイトカインであり、TGF β 1~TGF β 3 の3種類よりなる。肝星細胞を刺激すると線維化関連遺伝子の発現を誘導することは既に明らかにされていた。

(注9) *Col1a2, Acta2, COL1A1, ACTA2*

*Col*で省略される遺伝子はコラーゲンをコードする遺伝子であり、多数の遺伝子が含まれる。*Acta2*は筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA) をコードする遺伝子である。いずれの遺伝子も線維化に伴い発現が上昇する。

(注10) *Ccnd1*

細胞周期のG1期からS期への移行に関与するサイクリンD1というタンパク質をコードする遺伝子である。

◆ 本研究への支援

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) 「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「NASHにおける肝リモデリングを制御する細胞間相互作用の解明と革新的診断・治療法創出への応用」(研究開発代表者 田中稔、分担研究者 中野裕康)、革新的先端研究開発支援事業 (PRIME) 「生体組織の適応・修復機構の時空間的解析による生命現象の理解と医療技術シーズの創出」研究開発領域における研究開発課題「細胞間相互作用テンポラルネットワーク解析による線維化肺修復機構の解明」(研究開発代表者 七野 成之)、日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 B (研究代表者 中野裕康)、基盤研究 C (研究代表者 土屋勇一)、学術変革領域 B (研究代表者 七野成之)、日本私立学校振興・共済事業団 学術研究振興資金 (研究代表者 山崎創)、公益財団法人 高松宮妃癌研究基金 (研究代表者 中野裕康)、東邦大学重点領域研究補助金 (TUGRIP) (研究代表者 中野裕康) により支援を受けて行われたものです。

◆ 添付資料

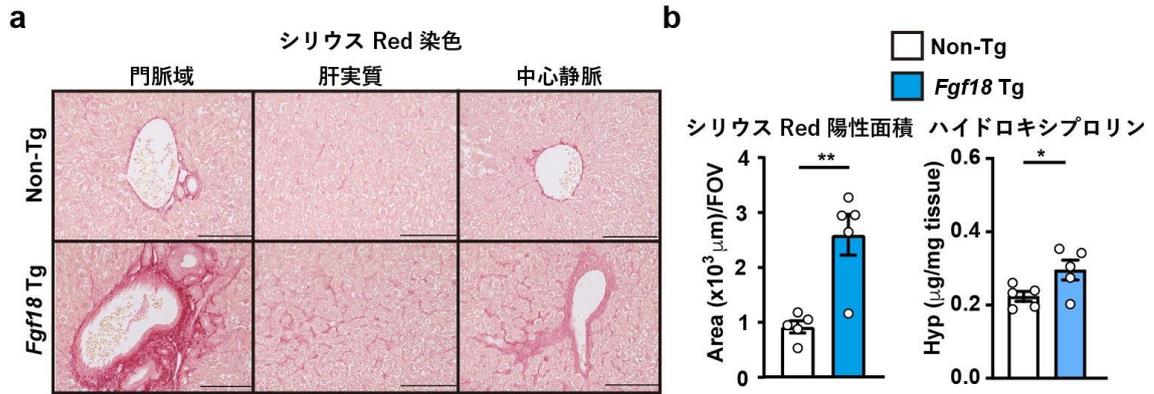


図 1. *Fgf18* 過剰発現マウス (*Fgf18*Tg マウス) は自然に肝臓の線維化を発症する

a. 8 週齢マウスの肝臓のシリウス Red 染色。(スケールバー 100 μm)

b. 8 週齢マウスの肝臓でのシリウス Red 用面積の計測値と、肝臓でのハイドロキシプロリン含有量。結果は平均値 \pm SE (マウス数 = 5 匹) で示す。統計学的有意差検定は unpaired スチューデント-*t* 検定により行った。* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ 。

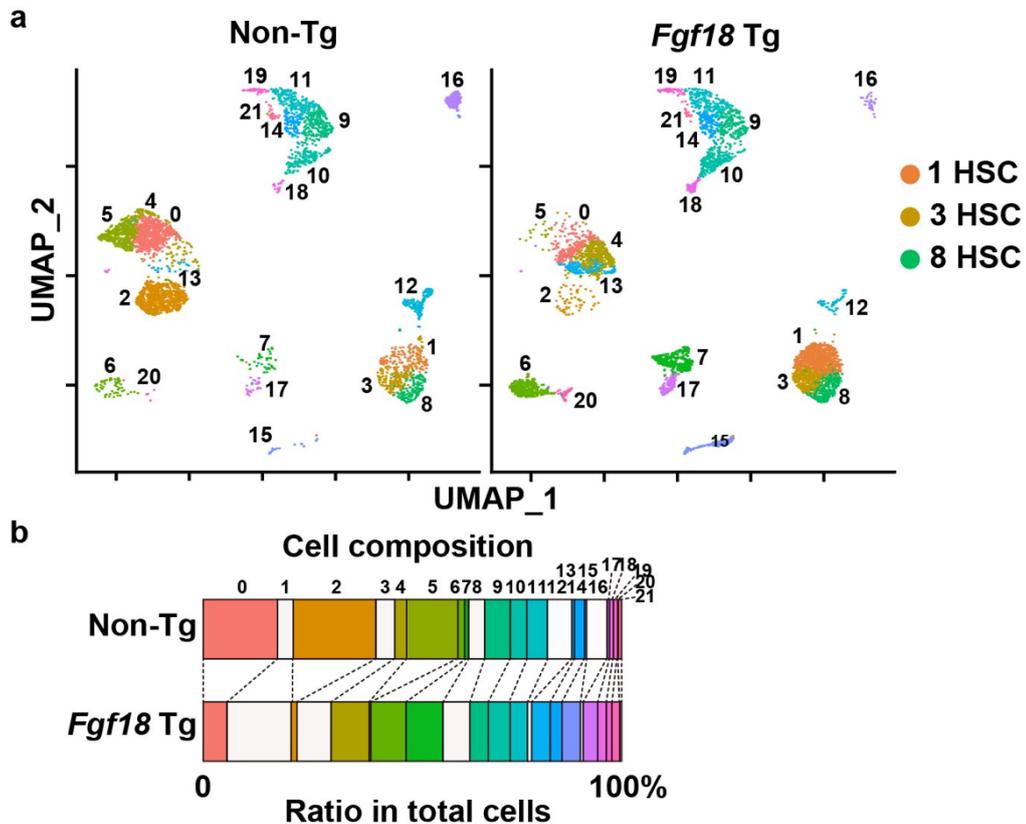


図 2. *FGF18*Tg マウスの肝臓の間質細胞の 1 細胞 RNA シークエンス解析

- UMAP 解析。全体で 0~21 番までの 22 個のクラスターを同定することができた。その中で肝星細胞のクラスターは 1, 3, 8 番の 3 個。
- それぞれのクラスターの相対的な比率。肝星細胞のクラスター(1, 3, 8 番)の比率が増加している。

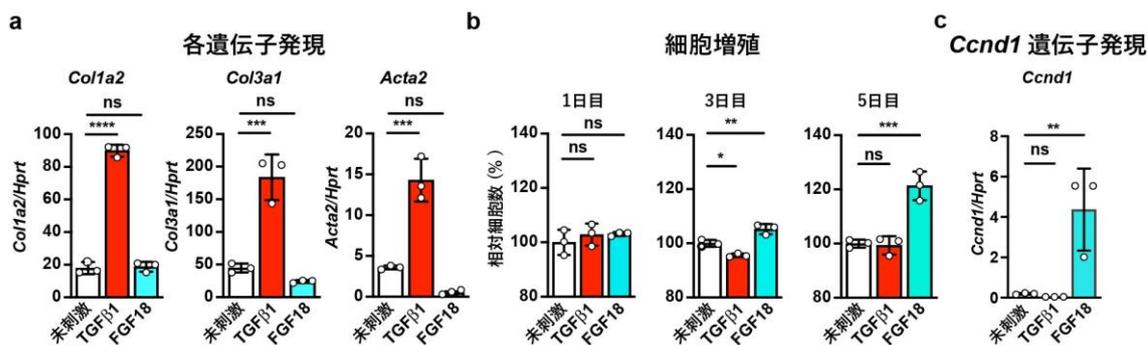


図 3. *FGF18*は肝星細胞の *Ccnd1* の発現上昇を誘導し、細胞増殖を誘導する

- 野生型マウスから肝星細胞を標準的な方法により調製し、刺激せず、TGFβ1 あるいは FGF18 により 24 時間刺激した。細胞から RNA を抽出し、それぞれの遺伝子に対して定量的 RT-PCR を行った。
- 同様に調製した肝星細胞をそれぞれで刺激し、1 日目、3 日目、5 日目に MTT アッセイを行った。結果は平均値 ± SD (triplicates) で示す。統計学的な有意差検定は one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison analysis により行った。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns, 有意差なし。

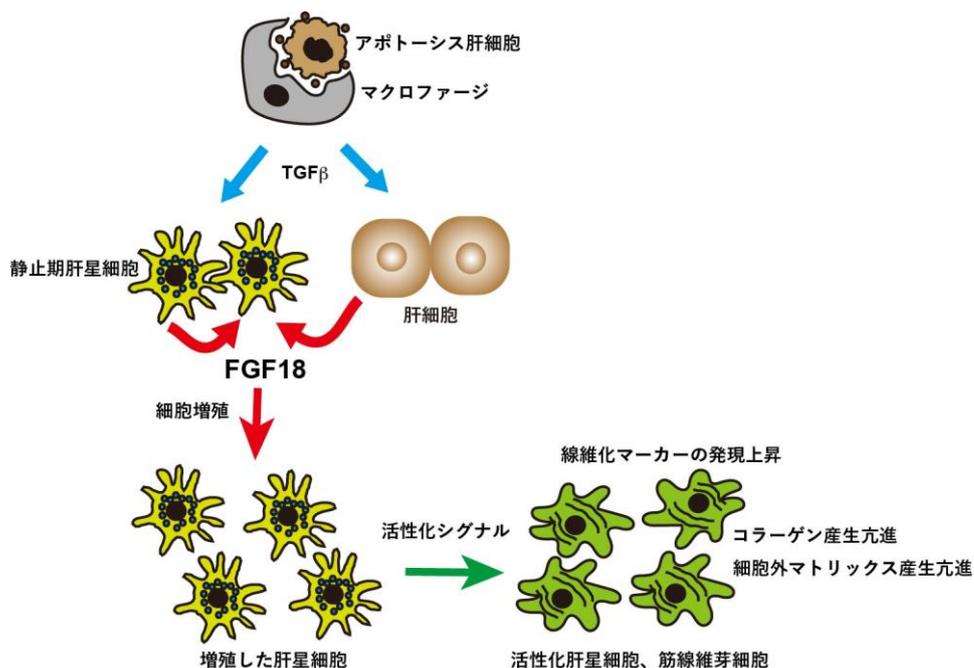


図 4. *FGF18*は肝星細胞の増殖を誘導して、肝線維化を促進する

肝障害に伴いアポトーシスに陥った肝細胞が出現し、マクロファージなどに貪食される。死んだ肝細胞を取り込んだマクロファージは、 $TGF\beta$ などのサイトカインを放出する。放出された $TGF\beta$ は肝星細胞や肝細胞に作用し、*FGF18* の産生を誘導する。放出された *FGF18* は肝星細胞に働き、肝星細胞の細胞増殖を誘導するが、*Colla2*や *Acta2*などの肝線維化マーカー遺伝子の発現は誘導しない。増殖した肝星細胞は、他の因子群によりさらに活性化され、コラーゲンや細胞外マトリックスを分泌して、肝臓の線維化を促進する。

◆ お問い合わせ先

【本発表資料のお問い合わせ先】

東邦大学医学部生化学講座生化学分野
教授 中野 裕康

〒143-8540 大田区大森西 5-21-16

TEL: 03-5763-5317 FAX: 03-5493-5412

E-mail: hiroyasu.nakano@med.toho-u.ac.jp

URL: <https://tohobiochemi.jp/>

【本ニュースリリースの発信元】

学校法人東邦大学 法人本部経営企画部

〒143-8540 大田区大森西 5-21-16

TEL: 03-5763-6583 FAX: 03-3768-0660

E-mail: press@toho-u.ac.jp

URL: www.toho-u.ac.jp