

20083/02/A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

インターフェロンの抗肝線維化分子機構 の解明とその応用

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成21(2009)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

インターフェロンの抗肝線維化分子機構 の解明とその応用

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告		
インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用	-----	3
河田 則文		
II. 分担研究報告		
1. 肝星細胞活性化、増殖におけるmicroRNAの関与についての検討	-----	10
池田一雄		
2. 抗肝線維化分子機構における星細胞と マイクロRNAに関する研究	-----	12
小川 智弘		
3. インターフェロン著効 (SVR) 例の肝発癌因子の解析	-----	15
田守 昭博		
4. C型慢性肝炎において肝線維化・治療抵抗性に関する microRNAの網羅的解析	-----	20
榎本 大		
5. インターフェロンの抗肝星細胞・ 抗肝線維化のメカニズム解析	-----	23
鈴木知比古		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

研究要旨：ウイルス駆除を主目的として臨床使用されるインターフェロン（interferon, IFN）の直接的肝線維化抑制効果が明らかにされてきたが、その分子機構は不明である。肝線維化は星細胞（HSC）と筋線維芽細胞（MFB）が主役のI型コラーゲン蓄積症候であり、IFNの本細胞群への直接的分子作用を検討する必要がある。研究者らはIFNがヒトMFB（hMFB）のDNA合成を抑制することを報告したがその機構は現在までの解析手法では明らかではない。本研究の初期段階ではHSC/hMFBのmicroRNA発現に及ぼすIFNの効果を網羅的に検討することを目的とした。MicroRNAは蛋白質をコードしないノンコーディングRNAであり様々な細胞代謝に深く関与する。研究者らはmicroRNA発現のHSC活性化に及ぼす研究に着手し、平成20年度にHSC活性化に伴うmicroRNA発現を網羅的に解析し、活性化に伴って減少するmicroRNAとしてmiR143など9種、増加するものとしてmiR34cなど8種を同定した。一方、IFN刺激特異的に変動するmicroRNAを同定してきた。また、同定されたmicroRNAをレンチウイルスベクターで強制発現させて、HSC/hMFBの増殖、コラーゲン発現、transforming growth factor- β などのサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した。

一方、例えばC型肝炎では肝線維化進行群（stage 3-4）はHCVの遺伝子型に関わらずIFN治療によるウイルス駆除率が不良だが理論的背景は不明であり、ウイルス側因子のみでは説明できない。そこで宿主側因子を明らかにする目的で、肝組織中におけるmicroRNA発現の相違を、線維化軽度群（stage 1-2）と網羅的に比較検討した。同時に、患者の同意が得られた場合stage 1-2群とstage 3-4群で、IFN治療前後で肝組織microRNA発現を網羅的に比較解析し、肝線維化進行例でIFN反応を低下させる要因をmicroRNAの見地から明らかにしつつある。得られた情報から線維化進行群の効果改善方策を立案する。

A. 研究目的

血液製剤によるC型肝炎がニュースである現在、国民の関心は肝臓病に集まっている。B型、C型肝炎などのウイルス性肝炎に加えて、近年では進行性の非アルコール性脂肪性肝炎患者も増加している。また、アルコールによる肝臓病は国境なき社会問題である。その病因の如何に関わらず慢性肝炎→肝線維化→肝硬変→肝癌が肝臓病セントラルドグマであり、病因の除去（ウイルス性の場合は駆除、アルコール性の場合は禁酒、非アルコール性の場合は肥満対策）に加えて肝線維化の抑制と治療は肝疾患患者の予後を左右する。特に今後、高齢患者が増えるため副作用が軽減されて長期間投与可能な抗線維化剤の開発は国民福祉の観点からも喫緊の研究課題である。本研究の目的は、ウイルス性

肝炎治療に汎用され有効性が確立されているインターフェロン（interferon, IFN）の直接的抗線維化分子機構を解明し、その情報を広く肝疾患に利用して線維化抑制できる治療法の開発を目指すことである。

IFN治療により肝線維化が抑制されることは2000年以降の多数の報告により確立されている（Ann Intern Med 2000;132:517）。しかしながら、その分子機構の詳細は明らかにされておらずウイルス排除による結果と一般的には理解されている。しかし一方で、IFNがヒト筋線維芽細胞（human myofibroblasts, hMFB）の増殖や動物モデルの線維化を抑制することが報告されており、IFNが直接的に星細胞（hepatic stellate cell, HSC）やMFBに影響する可能性があるが、そのメカニズムは不明である。最近、IFN β の抗HCV作用の一部が

microRNAの誘導による可能性が報告された (Nature 2007;449:919)。MicroRNAはリボソームRNAや転移RNAを除く蛋白質をコードしていないノンコーディングRNAで発生、分化、増殖などの様々な生命現象に深く関与することが明らかとなってきた。私たちは既にmicroRNA発現のHSC活性化に及ぼす研究に着手しており、活性化とともに変動する22のmicroRNAを同定している。そのデータベースなどを活用することで、IFNにより特異的に変動するmicroRNAを同定することが可能である。MicroRNAは多種多様な遺伝子・蛋白の発現に関与するため、IFN感受性microRNAの同定は新しい抗線維化療法の端緒となり得る。

B. 研究方法

hMFBをIFN α / β あるいはIFN γ で処理し、経時的にそれぞれの材料をApplied Biosystem社 mirVana miRNA isolation kit、mirVana miRNA Array Systemと反応させIFNにより発現変動するmicroRNAを網羅的にスクリーニングする。HSCの活性化抑制はIFN γ >IFN α / β であるので、この効果を反映するmicroRNAを選択する。抽出されたmicroRNAに関してはその発現を再度IFN α / β あるいはIFN γ で処理したhMFBでTaqMan MicroRNA Assayにて詳細に濃度・時間依存性を含め定量解析を行う。これら数方向からの発現確認によりデータの信頼度を引き上げることができる。解析後重要と考えられる数個を選定し、hMFBに対してmicroRNAの強制発現を行う。実際にはInvitrogen社のエントリーベクター (pENTR) にU6 promoter-TATA-loxP-CMV-EGFP-loxP-precursor miRNA配列を組み込んだベクターを構築し、GatewayシステムのLRクロナーゼ反応によりレンチウイルスベクターへの組換えを起こさせ、精製後hMFBへの感染実験に使用する。MicroRNAの過剰発現によるhMFBの機能変化としてHSC活性化や肝線維化に関係深い細胞外マトリックスやサイトカインなど (smooth muscle α -actin, collagens, MMPs, TIMPs, TGF β , MCP-1, PDGF, leptin, PPAR γ) の発現をReal time RT-PCR、Western blotにより解析する。同時にチオアセトアミドや総胆管結紮による肝線維化モデ

ルをマウスに作製して、アデノウイルスベクターを用いたmicroRNA強制過剰発現を行ない、in vivoでも抗線維化的に効果を発揮するかについて詳細な検討を行う。

一方、臨床的にC型肝炎では肝線維化進行群 (stage 3-4)はHCVの遺伝子型に関わらずIFN治療によるウイルス駆除率が不良だが理論的背景は不明であり、ウイルス側因子のみでは説明できない。そこで宿主側因子を明らかにする目的で、肝組織中におけるmicroRNA発現の相違を、線維化軽度群 (stage 1-2)と網羅的に比較検討する。同時に、患者の同意が得られた場合stage 1-2群とstage 3-4群で、IFN治療前後で肝組織microRNA発現を網羅的に比較解析し、肝線維化進行例でIFN反応を低下させる要因をmicroRNAの見地から明らかにする。得られた情報から線維化進行群の効果改善策を立案する。

C. 研究結果

Human MFBのIFN α に対する反応性を検討した。図1に示すように培養したhMFBに天然型IFN α を添加するとIFNの濃度依存的に細胞のDNA合成 (thymidine 取り込み) が低下した。この反応は増殖因子であるplatelet-derived growth factor (PDGF)の存在下においても同様に観察できた (図は示していない)。このメカニズムを調べるためにhMFBの細胞周期に関連する蛋白質であるcyclin D1、各種 cyclin-dependent kinase-2、4、6、p21、p27、p53の発現、さらにはPDGF刺激下におけるMEK、MAPK、AKTのリン酸化を検討したがいずれも変動はなくIFN α がどのレベルでhMFBの増殖を抑制するのかわかりにできなかった (図2)。一方、IFN α の効果は増殖抑制ではなく細胞死を誘導する可能性も否定できなかったため、IFN α 及びtumor necrosis factor α (TNF α)により細胞死を観察したところ、IFN α のみではアポトーシス誘導は見られなかったが、TNF α との共存下でhMFB数が激減することを見出した (図3)。この反応はIFN α とTNF α により細胞表面にAnnexin Vが表出する結果であることをFACS解析により確認した (図4)。以上の結果から、IFN α によるhMFBの増殖抑制は既存の細胞周期に対する阻害ではなく、現在は不明の細胞死誘導による可能性が示唆されたた

ため、このメカニズムを解明するために microRNA に着目した。

マウスから星細胞を分離した。Total RNA を用いて 238 個の microRNA を検出できる array (サンガー研究所に登録済み分) により、マウス星細胞の活性化とともに発現変動する microRNA を網羅的に解析した。その結果、星細胞活性化に伴って発現上昇する 8 microRNA と、発現低下する 9 microRNA を同定した。

発現低下した microRNA を強制発現する系を作製し hMFB に感染させて microRNA 依存性に発現変動する蛋白を解析した。その結果、Annexin V, HSP71, cofilin-1 など 33 個の蛋白質を同定した。

一方、臨床的研究として、同意の得られた患者肝組織から total RNA を抽出し、array で microRNA 解析を進行中である。即ち、genotype 1b の C 型慢性肝炎 20 例の治療前の肝生検組織から microRNA の発現を網羅的に解析した。線維化軽度群 (stage 1-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) の間で比較検討を行った結果、数個の microRNA について有意な差が認められている (未発表)。

D. 考察

我が国には B 型、C 型肝炎ウイルス感染者が併せて約 250 万人存在する。また、メタボリックシンドロームと関係が深い脂肪性肝炎患者もすでに推定で 100 万人近く存在し、さらにアルコール性肝障害患者も減少傾向にはない。総じて、約 500 万人にも及ぶ肝疾患患者が存在する現状のなか、IFN 治療や最新の核酸アナログ製剤などで治癒させうるウイルス性肝炎患者はほんの一部である。肝臓病の難点は症状がなく、知らないうちに進行する点であり、多数の患者は肝線維化から逃れることなく、肝硬変、肝癌に至り死亡する。従って、この連鎖を断ち切る、あるいは、少なくとも肝臓病の進展を遅延させる治療手段を早急に確立する必要がある。平均寿命が延長しているため、相対的に高齢化した慢性肝炎疾患が増加する事実や IFN 治療自体が副作用の観点から高齢者は対象外であることを考慮しなければならないこと、また、具体的な治療法・予防法がない脂肪性肝炎患者の増加が

見込まれることに対応するためにも肝線維化の分子機構を詳細に再検討し、その制御を行なえる薬剤を開発することは厚生労働行政上急務である。MicroRNA という分子生物学の新領域を利用しつつ、hMFB 機能の制御法を確立することは、線維化を抑制する創薬開発、検査薬開発とそれらの商品化へと続く可能性が期待される。

E. 結論

IFN の抗線維化作用を培養したヒト MFB とマウス HSC を用いて検討した。IFN α は hMFB の DNA 合成を抑制した。しかしながらその作用点は細胞周期関連蛋白質発現に対する影響や細胞増殖シグナルである MAPK や AKT カスケードに対する効果ではなかった。IFN α には hMFB を細胞死に陥らせるイニシエーション作用が推測され、TNF α との共存下で hMFB は細胞死に陥った。この分子機構の解明に microRNA の変動が関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada K, Ikeda K. Hepatology Int. 2009, in press
2. Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. Hepatology Int. 2009, in press
3. Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. Smedsrød B, Le Couteur D, Ikejima K, Jaeschke H, Kawada N, Naito M, Knolle P, Nagy L, Senoo H, Vidal-Vanaclocha F, Yamaguchi N. Liver Int. 2009, in press.
4. Inhibition of Transforming Growth Factor beta Signaling by Halofuginone as a Modality for Pancreas Fibrosis Prevention. Zion O, Genin O, Kawada N, Yoshizato K, Roffe S, Nagler A, Iovanna

- JL, Halevy O, Pines M. *Pancreas*. 2009, in press.
5. Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:254-5.
 6. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med*. 2008;149:912-3.
 7. Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N. *Liver Int*. 2008;28:1314-5.
 8. Does a late evening meal reduce the risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C? Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Takeda T, Tamori A, Sakaguchi H, Seki S, Kawada N, Nishiguchi S, Shiomi S, Hirota Y. *Hepatol Res*. 2008 Sep;38(9):860-8.
 9. Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S. *Hepatol Res*. 2008 Sep;38(9):954-9.
 10. Differences in molecular alterations of hepatocellular carcinoma between patients with a sustained virological response and those with hepatitis C virus infection. Hayashi T, Tamori A, Nishikawa M, Morikawa H, Enomoto M, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Kubo S, Nishiguchi S, Shiomi S. *Liver Int*. 2009;29:126-32.
 11. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294:R311-20.
 12. 【B型・C型ウイルス肝炎 対肝炎ウイルス総合戦略に基づいた日常診療の実際】 B型・C型ウイルス肝炎・セミナー/実地医家に必要な検査の知識と実際ウイルス肝炎からの発癌の早期発見 最も重要な手がかりは肝臓の硬さ 肝線維化の新しい検査方法。小林佐和子, 森川浩安, 河田則文。 *Medical Practice* 2008;25:1815-7.
 13. 【肝の線維化を探る】線維化のMechanism 肝線維化と細胞間ネットワーク。小川智弘, 河田則文。 *肝・胆・膵* 2008;57:Page 205-209.
 14. 【ウイルス性肝炎のプライマリケア】肝炎の進行と線維化マーカー。森川浩安, 河田則文。 *診断と治療* 2008;96:Page541-546.
 15. 【平滑筋臓器の分子病態と新しい治療戦略】肝疾患と門脈圧亢進症。河田則文。 *Medical Bio*2008;5:Page 40-43.

学会発表

1. 星細胞におけるマイクロRNAに関する研究。小川智弘, 池田一雄, 河田則文。 *肝臓* 2008;49巻Suppl.1 Page A402
2. Serotype 1型低ウイルス量および2型C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2a単独療法の多施設共同研究。森山光彦, 田中基彦, 高口浩一, 建石良介, 泉並木, 河田則文, 正木勉, 横須賀收, 岩崎良章, 加川建弘, 小俣政男。 *肝臓* 2008;49:Suppl.2 Page A555
3. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン治療の投与期間と抗ウイルス効果。田守昭博, 榎本大, 遠山まどか, 安田隆弘, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 坂口浩樹, 羽生大記, 河田則文。 *肝臓* 2008;49:Suppl.1 Page A328
4. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン療法のHCV遺伝子多型と抗ウイルス効果。田守昭博, 榎本大,

森川浩安, 岩井秀司, 小林佐和子, 藤井英樹, 安田隆弘, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文。肝臓 2008;49:Suppl.1 Page A213.

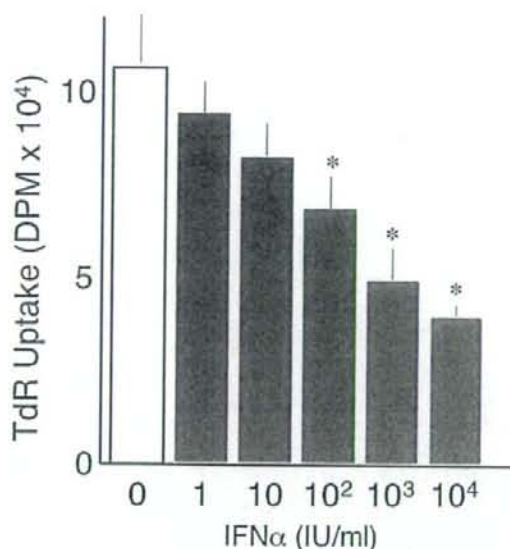


図1。培養ヒトMFBの増殖に対するnatural IFN α の効果。濃度依存的に増殖を抑制することが判明した。

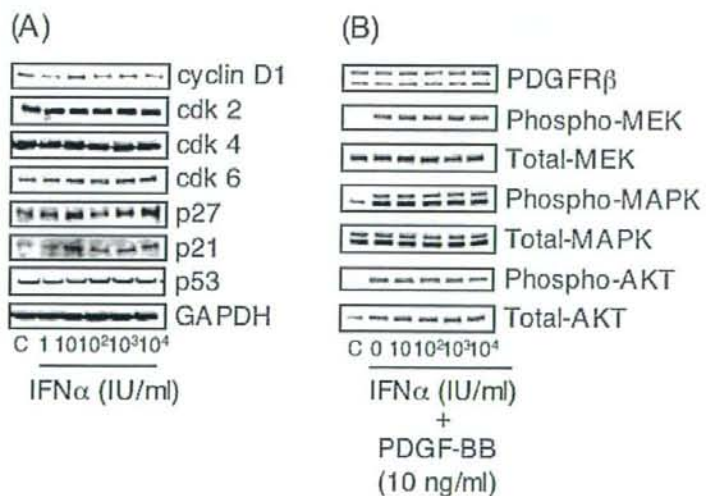


図2。培養ヒトMFBの細胞周期に対するnatural IFN α の効果。Cyclin D1, CDKs 2, 4, 6, p21, 27, p53や細胞増殖に関連する細胞内情報伝達系には影響しなかった。

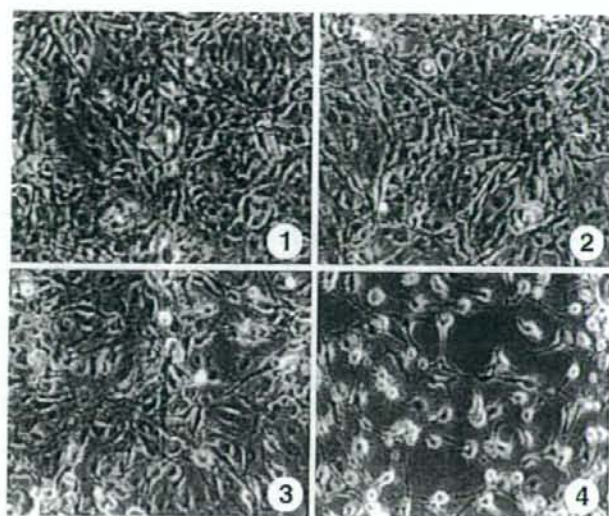


図3。培養ヒトMFB数に対するnatural IFN α の効果。natural IFN α のみでの効果は少ないが、TNF α と同時に刺激するとMFBが細胞死に陥ることが判明した。

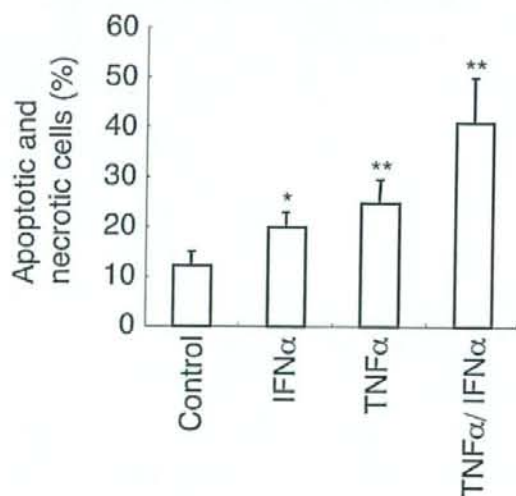


図4。培養ヒトMFB数に対するnatural IFN α の効果。natural IFN α のみでの効果は少ないが、TNF α と同時に刺激するとMFBが細胞死に陥ることが判明した。FACSを用いて定量性を明らかにした。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

分担研究報告書

肝星細胞活性化、増殖におけるmicroRNAの関与についての検討

分担研究者 池田 一雄 名古屋市立大学教授

研究要旨：本研究において、肝線維化に重要な役割を果たす肝星細胞の、活性化、増殖によって変動を示すマイクロRNA発現について検討するためラット肝臓から星細胞を分離し、静止期および活性化星細胞のマイクロRNAアレイおよびTaqMan MicroRNA Assayによる定量解析を行った後に、その発現に変動が見られたマイクロRNAを星細胞特異的に発現させるためのレンチウイルスベクターを用い、培養星細胞に感染させ、目的のマイクロRNAを強制発現させ、その影響を解析した。今回の検討では、星細胞のマイクロRNAの発現を網羅的に調べた結果、星細胞の活性化に伴ってその発現が低下したマイクロRNA 9個と、反対に発現が増強するマイクロRNA 8個を見いだした。これらのうちの数個をウイルスベクターに組み込み、培養星細胞に感染させた。その結果、それぞれのマイクロRNA発現ウイルスベクターの感染により、培養星細胞でのマイクロRNAの高発現が確認された。強制発現させた星細胞でのプロテオーム解析ではタンパク質発現の変動を確認することができた。

A. 研究目的：

肝臓の線維化には星細胞の活性化が重要な役割を演じていることが知られている。正常の星細胞 (hepatic stellate cell; HSC) は Disse 腔に存在する細胞で、ビタミン A を成分とする脂肪滴を有している。しかし、肝臓が何らかの障害を受けると、この細胞は、TGF β 1などのサイトカインを主とする炎症性メディエーターや酸化ストレスなどの刺激により活性化され、筋線維芽様細胞へと変化して増殖を開始し、I型コラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生する。肝線維化は、これら細胞外マトリックスの過剰な蓄積により引き起こされると考えられている。これまで肝星細胞の活性化、線維化に関連する様々な遺伝子解析や蛋白発現解析がなされてきたが、最近のゲノム・トランスクリプトーム解析により、蛋白質をコードしていないと考えられる非翻訳性 RNA (non-coding RNA) のなかに、低分子 RNA である microRNA (miRNA; 21~25 塩基程度の大きさ) が存在し、転写・翻訳レベルで遺伝子発現を制御していることがわかってきた。哺乳動物のゲノムには 1000 種類もの特有の miRNA がコードされ、少なくとも

遺伝子の 30% がこれらの miRNA によって制御されていると推測されている。miRNA は RISC (RNA-Induced Silencing Complex) に類似した複合体に取り込まれ、複合体に結合した 1 本鎖の miRNA は相補性のある数百のターゲットとなる mRNA に結合し、機能を発揮すると考えられている。そこで我々は、星細胞の活性化、及び肝線維化において miRNA が重要な役割を演じているかどうか検討するため、ラットの初代培養肝星細胞を用いて miRNA の発現変動について検討した。

B. 研究方法

ラット肝臓から星細胞を分離・培養し、培養 2 日目 (静止期状態) および 7 日目 (活性化状態) の星細胞から RNA を抽出した。マイクロRNAアレイおよびアプライドバイオシステムズ社の TaqMan MicroRNA Assay にて定量解析を行った。次に、上記解析にて発現に変動が見られたマイクロRNAを星細胞特異的に発現させるためのレンチウイルスベクターを作製した。作製したウイルスベクターを培養星細胞に感染させ、目的のマイクロRNAを強制発現させた。培養 2 日目と 7 日目の星細胞

にそれぞれ感染させることで、静止期および活性化星細胞でのマイクロRNAの強制発現による影響を解析した。

C. D. 研究結果と考察

星細胞のマイクロRNAの発現を網羅的に調べた結果、星細胞の活性化に伴ってその発現が低下したマイクロRNA 9個と、反対に発現が増強するマイクロRNA 8個を見いだした。これらのうちの数個をウイルスベクターに組み込み、培養星細胞に感染させた。その結果、それぞれのマイクロRNA発現ウイルスベクターの感染により、培養星細胞でのマイクロRNAの高発現が確認された。現在、強制発現させた星細胞でのプロテオーム解析にてタンパク質発現に変化を認めており、これらのスポット解析を進めている。また、英国のサンガー研究所のデータベースを用いた解析を行ったところ、細胞の増殖、細胞の遊走能、細胞外基質の産生に関与する因子と今回星細胞の活性化に伴ってその発現量が変わったmicroRNAが関連付けられていることがわかりました。

またNCBIのデータベースによりmicroRNA92がmicroRNA17~20と近接した領域に存在していてクラスターを形成していることがわかりました。これらのクラスターに関しても今後解析を進めていく予定である。

E. 結論

星細胞の活性化においてもマイクロRNAの発現変化が確認された。マイクロRNAの発現が遺伝子およびタンパク質の発現制御に何らかの影響を与えている可能性が高く、星細胞の活性化や肝線維化への影響が示唆された。病態や治療に対するマイクロRNAの有用性はいまだ不明な点もあるが、今後のマイクロRNA研究の発展が期待される。

F. 研究発表

論文発表

1. Effect of natural interferon α on proliferation

and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada K, Ikeda K. *Hepatology Int.* 2009, in press
2. Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. *Hepatology Int.* 2009, in press
3. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294:R311-20.

学会発表

1. 星細胞におけるマイクロRNAに関する研究。小川智弘, 池田一雄, 河田則文。肝臓 2008;49 巻 Suppl. 1 Page A402
2. 肝疾患の治療を目的とするドラッグデリバリーシステムの開発と形態学。金井美晴, 村田義夫, 池田一雄, 曾爾彊。解剖学雑誌 2009;84 巻 S18-2, Page107

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

分担研究報告書

抗肝線維化分子機構における星細胞とマイクロRNAに関する研究

分担研究者 小川 智弘

研究要旨：ウイルス駆除を主目的として臨床使用されるインターフェロン（interferon, IFN）の直接的肝線維化抑制効果が明らかにされてきたが、その分子機構は不明である。肝線維化におけるコラーゲンなどの細胞外マトリックスの主な産生細胞は活性化星細胞であり、星細胞の活性化およびコラーゲンの産生を抑えることによって肝線維化が抑制される。そして、星細胞へのインターフェロンの直接的な作用によって肝線維化が抑制されていると考えられている。そこで、我々は星細胞の培養系を用いてインターフェロン添加による星細胞の増殖やコラーゲン産生への影響を解析した。それと同時に、近年ウイルス研究や癌研究で注目されているマイクロRNAの発現にも着目した。マイクロRNAの発現が遺伝子の転写や翻訳の制御に深く関与していることがわかっており、マイクロRNAの発現を制御することにより肝線維化抑制効果も期待される。その中で、我々はtransforming growth factor- β (TGF β)添加によるI型コラーゲンの発現増加と同調および反して、発現が増減するマイクロRNAを同定した。このことによりTGF β に応答するマイクロRNAを詳細に解析することで、肝線維化の分子機構の解明とその治療法の開発を試みる。

A. 研究目的

インターフェロン(IFN)による肝臓の抗線維化作用は知られており、星細胞の活性化およびコラーゲンの産生を抑制することが知られているが、その分子機構は不明な点が多い。マイクロRNAはこれまでその機能がほとんど不明なノンコーディングRNAである。マイクロRNAに関する研究はここ数年、癌研究やウイルス学の分野で急速に進展しており、肝臓病研究においてはウイルス肝炎などの新たな治療法の標的分子として注目されている。我々は星細胞におけるマイクロRNAの発現が遺伝子およびタンパク質発現制御に重要であり、星細胞の活性化や増殖に影響を与えると考えた。そこで、in vitroにおいてIFN添加による星細胞の活性化およびコラーゲン産生に関与すると考えられるマイクロRNAを同定し、IFNによる抗肝線維化分子機構の解明とマイクロRNAを標的とした抗肝線維化治療法の開発を目的に研究を進めている。

B. 研究方法

マウス肝臓から星細胞を分離・培養し、培養7日目（活性化状態）の星細胞にIFNを添加し、24時間後RNAを抽出した。抽出したRNAを用いてマイクロRNAの発現を網羅的に解析した。さらに、IFN添加により発現に変動の見られたマイクロRNAの発現をアプライドバイオシステムズ社のTaqMan MicroRNA Assayシステムにより解析した。

同様に、ヒト星細胞株LX-2を用いて、IFN添加により発現変動の見られるマイクロRNAの発現を調べた。また、TGF β やTNF α との同時添加によってコラーゲン産生や細胞のアポトーシスに関連するマイクロRNAの同定を行った。

C. 研究結果

マウス星細胞へのIFN添加によるマイクロRNAの発現変

化を網羅的に調べた結果、発現が2倍以上増加するマイクロRNAを9個、2分の1以下に減少するマイクロRNAを2個同定した。

ヒトの星細胞株を用いた実験では、IFN 単独添加およびTGF β や TNF α との同時添加を試みた。その結果、TGF β 添加によるコラーゲン産生はIFNにより抑制され(図1)、TNF α 添加による細胞死の誘導がIFNによってさらに促進した。我々はこれらの現象に同調および反して発現を変動するマイクロRNAを同定した(図2, 未発表)。

D. 考察

我々はIFNによる抗肝線維化のメカニズムを解明する目的で研究を進めている。肝線維化治療の標的となる細胞は、主に星細胞であり、星細胞の活性化およびコラーゲンの産生を抑制することで線維化抑制効果は得られる。我々は、培養星細胞にIFN添加によって発現に変動の見られるマイクロRNAを同定した。しかしながら、これらのマイクロRNAの機能は全く不明であった。今後、これらのマイクロRNAの機能解析を進め、肝線維化での役割を調べる。

ヒト星細胞株を用いた実験では、IFNによるコラーゲン産生の抑制および細胞のアポトーシス促進作用に着目し、それらに関連すると思われるマイクロRNAの同定に成功した。今後、マイクロRNAの強制発現およびノックダウンによる機能解析を進め、肝線維化の新たな治療法開発に向けた研究を行なう。

E. 結論

これまでに、IFNの抗線維化作用(星細胞の活性化)に関連するマイクロRNAを網羅的に解析し、スクリーニングを行なった。今後は星細胞の活性化やコラーゲン、増殖に関連するマイクロRNAにターゲットを絞り、機能解析とともにマイクロRNAを用いた新たな治療法開発に着手する。

F. 研究発表

論文発表

1. Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T,

Kawada K, Ikeda K. Hepatology Int. 2009, in press

2. Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. Hepatology Int. 2009, in press

3. 【肝の線維化を探る】線維化のMechanism 肝線維化と細胞間ネットワーク。小川智弘, 河田則文。肝・胆・膵 2008;57:Page 205-209.

学会発表

1. 星細胞におけるマイクロRNAに関する研究。小川智弘, 池田一雄, 河田則文。肝臓 2008;49巻Suppl.1 Page A402

Col1A1

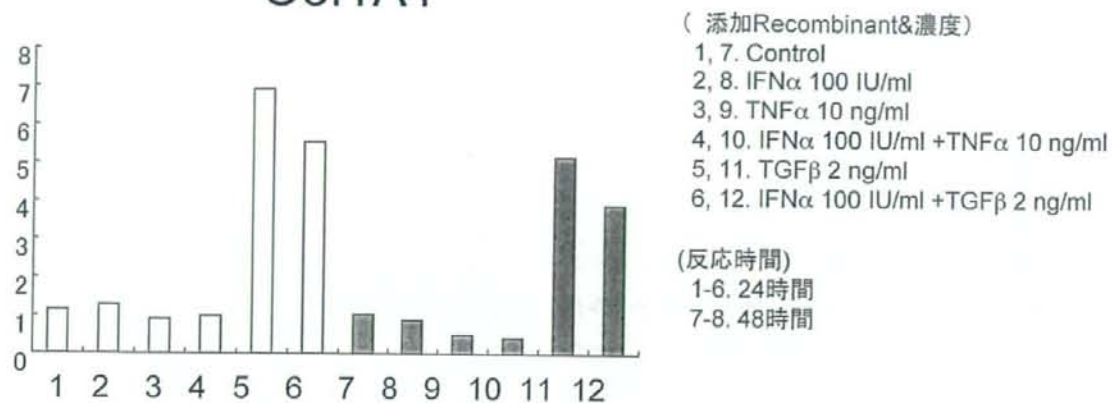


図1 ヒト星細胞株LX-2におけるCol1A1 mRNAの発現

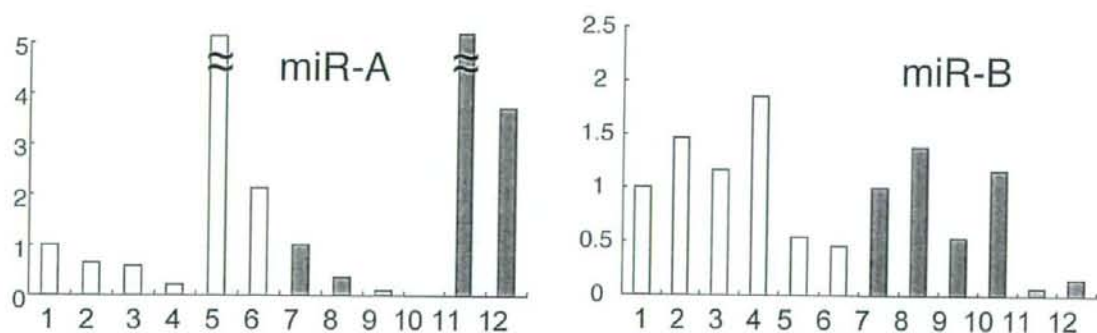


図2 ヒト星細胞株LX-2におけるマイクロRNAの発現

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

分担研究報告書

インターフェロン著効（SVR）例の肝発癌因子の解析

分担研究者 田守 昭博 大阪市立大学准教授

研究要旨：C型慢性肝炎に対する根治療法はインターフェロン（interferon, IFN）によるウイルス駆除であり、持続的なウイルス陰性化（Sustained virologic response, SVR）に至ることで肝発癌は制御できることが示されている。近年では Peg-IFN とリバビリン（RBV）併用療法にて慢性肝炎患者のほぼ半数が SVR となり、肝発癌は減少するものと期待される。一方、ウイルス排除後 10 年以上経過した症例からの肝発癌の報告もあり SVR 症例をどのように観察するべきかは明らかではない。本年度の研究では SVR 肝発癌の特徴を明らかとするため HCV 持続感染例での肝発癌と SVR 症例からの発癌例について臨床背景や癌部での遺伝子変化を網羅的に検討することを目的とした。研究者らは外科との共同研究として同意を得られた肝発癌患者より、切除肝組織の遺伝子変化を解析している。今回は DNA メチル化と癌抑制遺伝子 p53 の変異をおよびミトコンドリア DNA の変異について SVR 肝発癌と HCV 肝発癌を比較検討した。また B 型肝炎ウイルス（HBV）の感染既往の有無について肝組織内 HBV DNA の有無を解析した。さらに肝発癌の発生していない SVR 症例について治療前後の肝線維化の改善程度を評価し発癌例と比較した。

得られた情報から効率良い SVR 症例の追跡手法を提示し、発癌例を早期に診断し治療開始に滞りなく対応する方策を立案する。

A. 研究目的

我が国の肝発癌死亡数は未だ減少する傾向にはない。発癌の最大の要因である C 型肝炎ウイルス（HCV）感染に対してインターフェロン（interferon, IFN）療法の関する国の補助が開始され、近い将来には癌患者の抑止が期待されている。さて IFN により持続的なウイルス陰性化（Sustained virologic response, SVR）となった患者では肝発癌が制御されることは明らかであるが、完全に発癌を制圧できるわけではない。我が国の多くの施設からウイルス排除後の肝発癌に関する報告があり（図 1）、中には 10 年以上経過した症例からの肝発癌の報告もある。そこで SVR 症例をどのように観察するべきかは今後の課題である。近年では Peg-IFN とリバビリン（RBV）併用療法にて慢性肝炎患者のほぼ半数が SVR となる一方、高齢 C 型肝炎患者が増え SVR 時には既に肝硬変と診断される例も散見される。

そこで私たちは SVR 後に発癌した症例の特徴を解析す

るため、HCV 持続陽性患者からの肝発癌との比較解析をおこなうとともに肝発癌を認めていない SVR 症例と SVR 肝発癌例との IFN 治療経過を比較した。その検討項目から効率良い SVR 症例の追跡手法を提示し、発癌例を早期に診断し治療開始に滞りなく対応する方策を立案する計画である。

B. 研究方法

肝組織を研究目的に使用する事に同意をしていただいた C 型肝炎患者を対象とした。

1) SVR 肝発癌と HCV 肝発癌の比較。肝組織から DNA, RNA を抽出し解析に供した。癌抑制遺伝子 p53, beta-catenin の変異は direct sequence 法にて検討した。またミトコンドリア DNA の変異については C-loop 領域を direct sequence にて解析した。DNA のメチル化は p14, p15, p16, PTEN については Bisulfite 処理後に methylation specific PCR にて解析した。また RB 遺伝子は制限酵素

Hap II 処理後にPCRを行い評価した。さらにB型肝炎ウイルス (HBV) に関する感染既往を評価するために肝組織内のHBV DNAの存在有無をPCRにて解析した。

2) これまでに登録されたSVR症例の内、肝発癌を認めていない71例と肝癌発症例29例に関する検討。両群のIFN治療前の臨床背景や治療開始後の飲酒歴およびウイルス消失後の肝組織像について比較解析した。得られた情報からSVR肝癌例の臨床的特徴を抽出し発癌危険群の特定を行う。

C. 研究結果

13例のSVR肝癌と44例のHCV肝癌について肝癌組織と担癌肝組織における遺伝子変化を解析した。癌部の遺伝子メチル化頻度は、(SVR肝癌、HCV肝癌)の各々において p14 (18%:0%), p15 (30%:0%), p16 (77%:100%), RB (27%:14%), PTEN (25%:14%)であった(図2)。非癌部では p14 (9%:0%)、p15 (32%:0%)、p16 (30%:15%)、RB (25%:15%)、PTEN (11%:0%)であった。p53遺伝子変異はHCV肝癌44例中12例(27%)検出され、SVR肝癌では14例中2例(14%)検出された。Mt-DNA変異数の平均はHCV肝癌4.2、SVR肝癌2.0であり非癌部ではそれぞれ2.8、1.3であった(図3)。

次に SVR 肝癌 16 例と HCV 肝癌 50 例について肝組織内の HBV DNA の有無を解析した。全例 HBs 抗原陰性であった。(SVR 肝癌、HCV 肝癌)の各々において Occult HBV 感染の頻度は(81%, 42%)で SVR 肝癌において有意に高頻度であった(表)。

SVR例での臨床背景の比較では性別、平均年齢、HBc抗体陽性率、IFN前の肝線維化に統計学的な有意差を認めた。すなわち発癌例では男性が多く、高齢者、HBc抗体陽性例が多かった。また肝線維化の進行した患者での発癌が多かった。

D. 考察

今回の検討から、SVR後に発症した肝癌とHCV持続感染例からの肝癌では癌抑制遺伝子のメチル化パターンとMt-DNAの変異が両群で異なっていた。またSVR肝癌ではOccult HBV感染を合併する症例も多く存在

した。以上よりSVR肝癌はC型肝炎と異なる遺伝子変化を背景として発生している可能性が示唆された。

さらにSVR症例における発癌群と非発癌群の比較から発癌群の特徴が明らかになりつつある。今後、我が国では高齢者での抗ウイルス治療も実施されることが予想され、よりSVR後の肝発癌例が増加する可能性が危惧される。IFNによるウイルス除去にてC型慢性肝疾患の治療が終了となるのではないこと明確に示し、より質の高い肝癌制御の対策を検討すべきである。

E. 結論

IFNにてHCV排除後に肝癌が発症した症例の特徴として60歳以上の高齢者、男性、HBc抗体陽性、治療前の線維化進展例およびウイルス排除後の線維化改善が遅延していることが明らかとなった。またSVR肝癌は、HCV持続感染例の肝癌とは異なる遺伝子異常を有しており発癌背景に違いがある可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus. Tamori A, Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Skaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N. *J Med Virology* 2009, in press
2. Hepatocellular carcinoma (HCC) recurring 10 years after clearance of hepatitis B surface antigen and 20 years after resection of hepatitis B virus-related HCC. Shinkawa H, Nakai T, Tamori A, Tanaka H, Takemura S, Ohba K, Uenishi T, Ogawa M, Yamamoto S, Hai S, Ichikawa T, Kodai S, Hirohashi K, Wakasa K, Kubo S. *Int J Clin Oncol.* 2008; 13:562-566.
3. Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M,

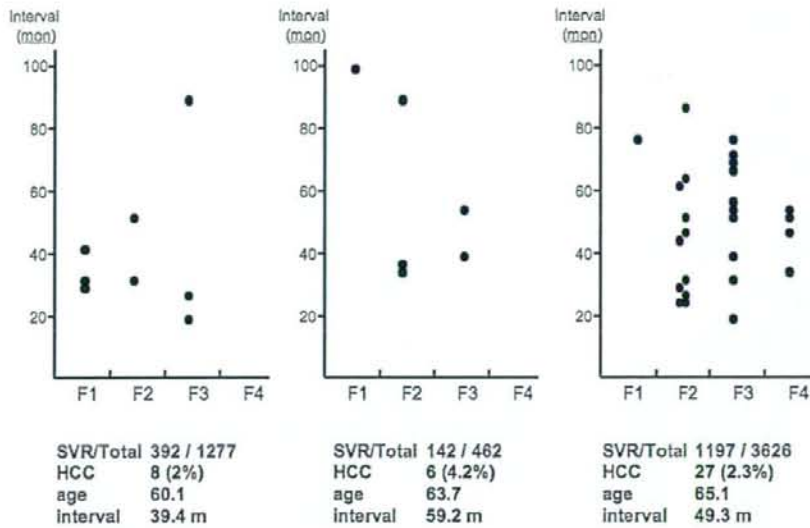
- Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:254-255.
4. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med.* 2008;149:912-913.
 5. Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopaenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N. *Liver Int.* 2008;28:1314-1315.
 6. Does a late evening meal reduce the risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C? Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Takeda T, Tamori A, Sakaguchi H, Seki S, Kawada N, Nishiguchi S, Shiomi S, Hirota Y. *Hepato Res.* 2008; 38:860-868.
 7. Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S. *Hepato Res.* 2008; 38:954-959.
 8. Differences in molecular alterations of hepatocellular carcinoma between patients with a sustained virological response and those with hepatitis C virus infection. Hayashi T, Tamori A, Nishikawa M, Morikawa H, Enomoto M, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Kubo S, Nishiguchi S, Shiomi S. *Liver Int.* 2009; 29:126-132.
 9. Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C patients. Takahara Y, Takahashi M, Zhang QW, Wagatsuma H, Mori M, Tamori A, Shiomi S, Nishiguchi S. *World J Gastroenterol.* 2008; 14:2010-2022.
 10. PTPRC (CD45) variation and disease association studied using single nucleotide polymorphism tagging. Hennig BJ, Fry AE, Hirai K, Tahara H, Tamori A, Moller M, Hopkin J, Hill AV, Bodmer W, Beverley P, Tchilian E. *Tissue Antigens.* 2008; 71:458-463.
 11. 大阪市におけるC型肝炎ウイルス検診と肝炎フォローアップ事業の検討. 松本健二、高橋峰子、田守昭博、西口修平. *日本公衆衛生学会* 2008; 7: 35-39.
 12. 遡及調査にて判明した輸血後B型肝炎ウイルス感染の1例. 田守昭博、藤野恵三、尾島成子、武田和弘、河田則文、日野雅之、西口修平. *日本輸血細胞治療学会誌.* 2008; 54: 393-397

学会発表

1. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン治療の投与期間と抗ウイルス効果. 田守昭博, 榎本大, 遠山まどか, 安田隆弘, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 坂口浩樹, 羽生大記, 河田則文. *肝臓* 2008;49:Suppl.1 Page A328
2. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン療法でのHCV遺伝子多型と抗ウイルス効果. 田守昭博, 榎本大, 森川浩安, 岩井秀司, 小林佐和子, 藤井英樹, 安田隆弘, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文. *肝臓* 2008;49:Suppl.1 Page A213.

表. SVR肝癌とHCV肝癌におけるHBV DNAの検出頻度

	SVR HCC		HCV HCC	
	with Occult HBV	without Occult HBV	with Occult HBV	without Occult HBV
N	13	3	21	29
Age	66.4	63.3	63.8	65.3
Cirrhosis/ Non-cirrhosis	2/11	2/1	10/11	14/15
Span for carcinogenesis after IFN therapy (month)	87 (13-177)	32 (19-41)	/	/
Alcohol				
> 30g/d	0	0	4	2
< 30g/d	3	2	5	15
none	10	1	12	12
Diabetes melitus (+/-)	2/11	0/3	5/16	12/17
Hypertention (+/-)	5/8	2/1	8/13	10/19
BMI	23.8	25.3	23.6	22.5



Toyoda H, J Viral Hepatitis 2000

Enokimura N, Anticancer Res 2003

Makiyama A, Cancer 2004

図1. 我が国におけるSVR肝癌の報告

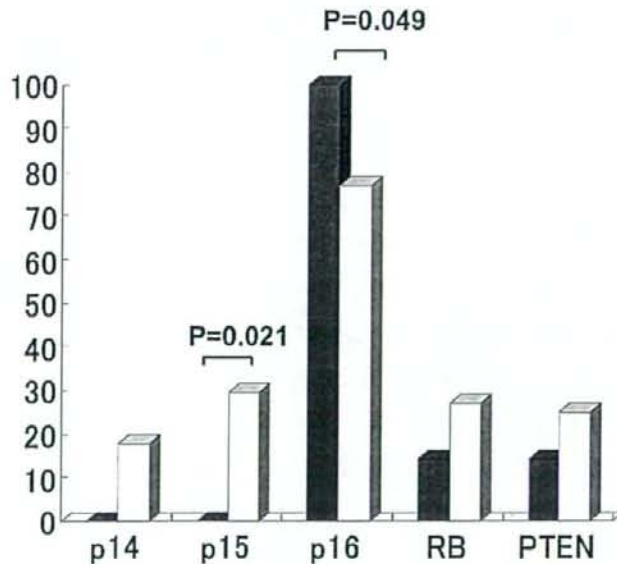


図2. SVR肝癌とHCV肝癌における遺伝子メチル化の頻度。