

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

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

研究分担者 榎本大 大阪市立大学講師

研究要旨：遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎の患者を対象に、ペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン併用療法前の肝生検組織において microRNA 発現の網羅的解析を行なった。肝線維化進行例（stage 3-4）では 18 種の microRNA 発現が有意に低下し、34 種の発現が有意に亢進していた。またウイルス学的著効例では 15 種の発現が有意に低下し、3 種の発現が有意に亢進していた。今後、これらの microRNA より絞込みを行い、肝線維化や治療抵抗性の機序を明らかにすることによって、新たな治療薬の開発など治療成績の向上に繋がることが期待される。

A. 研究目的

本邦における肝癌による死亡は年間約 35,000 人と推定され、悪性新生物による死亡の第 4 位となっている。その約 80% は C 型肝炎ウイルス（HCV）感染によると考えられ、その対策は急務である。また約 200 万人と推定される HCV 感染者の中には血液製剤による薬害患者も含まれるなど社会問題となり、厚生労働省は平成 20 年 4 月より治療費の公費助成を開始するなど対策を打ち出している。

C 型慢性肝炎に対してはペグインターフェロン（PEG-IFN）とリバビリン併用療法が標準治療となっているが、本邦の C 型慢性肝炎のおよそ 7 割を占める遺伝子型 1b の患者においてウイルス学的著効（SVR）が得られるのは約半数にとどまっている。また遺伝子型に関わらず肝線維化進行例での SVR 率は低く、治療抵抗性の機序はウイルス側因子のみでは説明できない。そこで microRNA など肝組織中における遺伝子発現を制御する宿主側の因子を解析することにより肝線維化や治療効果を規定する要因が明らかになれば、新しい抗ウイルス療法・抗線維化療法の端緒となる可能性がある。

本研究では、マイクロアレイを用いて肝組織内の microRNA の発現を網羅的に解析し、遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN・リバビリン併用療法の治療抵抗性の機序を明らかにすることによって、新たな

治療薬の開発など治療成績の向上に貢献することを目的とする。

B. 研究方法

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎の患者を対象に、研究に関する説明と同意を取得した上で、肝生検組織において microRNA 発現の網羅的解析を行なった。すなわち病理学検査に必要な肝組織が十二分に採取された場合の余剰の肝組織の一部より mirVana miRNA isolation kit（Applied Biosystems）を用いて microRNA を抽出し 3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1（東レ）を用いた網羅的解析を行なった。まず肝線維化軽度群（stage 1-2）と肝線維化進行群（stage 3-4）との比較を行い肝線維化の進展に伴って特異的に変動する microRNA の同定を試みた。次に PEG-IFN- α 2b 1.5 μ g/kg（または PEG-IFN- α 2a 180 μ g）週 1 回とリバビリン 600~1,000 mg 連日を 48 週間投与し、治療終了 6 ヶ月後に血中 HCV RNA 陰性のものを SVR と判定した。SVR が得られた患者と得られなかった患者の比較により、治療効果を規定する microRNA の同定を試みた。

C. 研究結果

肝線維化軽度群（stage 1-2）と肝線維化進行群（stage 3-4）の間で肝内 microRNA 発現を網羅的に解析した結果、肝線維化進行例では miR-192 など 18 種の発現が有

意に低下し、miR-214 など 34 種の発現が有意に亢進していた。また治療効果による比較では、SVR 症例において miR-660 など 15 種の発現が有意に低下し、miR-215 など 3 種の発現が有意に亢進していた。

D. 考察

近年、特定の遺伝子の発現を調節する因子として microRNA の働きが注目されている。肝癌細胞株 Huh7 やヒト初代培養肝細胞においてマイクロアレイを用いた *in vitro* の検討では、IFN 処理により約 30 個の microRNA が変動することが示されている (Pederson et al. *Nature* 2007;449:919-22)。そこで *in vivo* の C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN・リバビリン療法においても、microRNA が特定の遺伝子の発現を調節することによって、治療効果に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

次年度にはリアルタイム PCR により初年度の結果で候補に挙げられた特定の microRNA の定量的解析を行い、その microRNA が PEG-IFN・リバビリンの治療効果に関係することを検証する計画である。また選択された microRNA のターゲット分子の検索を、miRBase 等のデータベースを用いて行う予定である。

本研究によって予想される結果として、第一に microRNA が PEG-IFN・リバビリン療法の治療効果を予測出来るマーカーとなり得る可能性が考えられる。IFN の効果を予測することは、無効例において副作用を伴う治療を避けるためにも、医療経済的な見地からも非常に重要である。第二に肝線維化の進展や治療抵抗性に関する microRNA が同定出来れば、究極的には新たな治療薬の開発に繋がり、治療成績の向上に貢献出来ることが期待される。

E. 結論

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎において肝線維化や PEG-IFN・リバビリン治療効果を規定する microRNA の候補を同定した。microRNA という分子生物学の新領域を利用しつつ肝線維化の進展や治療抵抗性の機序を解明す

ることにより、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。

F. 研究発表

論文発表

1. 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.
2. 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;28:1314-5.
3. 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;38:954-9.
4. 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.
5. Hepatitis B-Associated Cryoglobulinemia and Antiphospholipid Antibodies. Enomoto M, Negoro N, Kawada N. *Ann Intern Med.* 2009, in press.
6. Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. *Gut* 2009, in press.

学会発表

1. S19 「B型肝炎の今日的標準治療と理想的近未来治療

への挑戦」B型慢性肝炎における核酸誘導体の中止について。榎本大，田守昭博，河田則文。肝臓 2008;49: Suppl. 2 Page A443.

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

インターフェロンの抗肝星細胞・抗肝線維化のメカニズム解析

分担研究者 鈴木 知比古 東レ株式会社医薬研究所創薬薬理研究室

研究要旨：C型慢性肝炎やC型代償性肝硬変に対するインターフェロン（interferon, IFN）治療において、ウイルス駆除に至らなくとも、肝線維化の進展や肝癌の発症が抑えられることが示されているが、その詳細な分子機構は不明である。肝線維化に重要な役割を果たしている肝星細胞（HSC）に対するIFNの直接的作用を明らかにすることを目的として、本年度はまず、細胞増殖・細胞周期および細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（Matrix metalloproteinase, MMP）の産生に対するI型IFNの作用に着目して検討を行った。その結果、I型IFNはヒトHSCに対し、①細胞周期のG1期からS期への移行を抑制し、細胞増殖抑制作用を示すことを確認した。そのメカニズムの一つとして、I型IFNがサイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害因子であるp21を誘導することを明らかにした。②MMP-1産生を濃度依存的に増加させること、またTGF- β 処置によるMMP-1産生の低下に対し、I型IFNがその産生を正常レベルにまで回復させることを確認した。またTGF- β シグナルの抑制を示唆する、Smad2のリン酸化抑制ならびにSmad7遺伝子の発現上昇がメカニズムの一部として明らかとなった。一方、I型IFN処置したHSCにおける網羅的miRNAおよびmRNAアレイ実験を完了した。今後、両解析結果を関連づけながら詳細な解析を進め、得られた情報からIFNの線維化抑制機構を分子レベルで解明し、類似の作用を有する薬物の探索方策を提案する。

C. 研究目的

日本、中国をはじめとする東アジア地域において肝炎ウイルスの感染率ならびに肝臓病の罹患・発症率は他地域と比較して非常に高いとされる。また肝癌の多くはウイルス性肝炎から発生し、我が国では原疾患としてC型肝炎が70～80%と最多である。慢性肝炎は、肝線維化→肝硬変→肝癌へと徐々に進行するが、病因の除去により肝線維化は抑制される。I型インターフェロン（IFN）は、現在C型慢性肝炎やC型代償性肝硬変の治療に用いられているが、C型肝炎ウイルスの排除にかかわらず、肝線維化の進展や肝癌発症を抑えることが示されている。一方、IFN治療における副作用の回避・軽減は、解決しなければならない問題であり、副作用の少ない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重要な研究課題である。本研究は、IFNの直接的抗線

維化分子機構を解明し、それを基盤として肝線維化治療薬または予防薬などの開発を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

培養可能なヒトHSCをヒトI型IFNであるIFN- α あるいはIFN- β で処理し、細胞増殖に対する作用をMTS法にて検討した。また常法により細胞周期に対する作用を解析した。次いで細胞周期に関連するCDK阻害因子p21遺伝子およびp21蛋白の発現への影響をそれぞれ定量PCR法およびウェスタンブロット法により検討した。更に上述した検討でより強力な作用を示したIFN- β についてヒトHSC処置後の各種MMP遺伝子の変動を定量PCR法にて確認した。その後有意な変動が認められたMMP-1に注目し、線維化促進因子としての機能が知られているTGF- β 共存下におけるIFN- β の作用を解

析した。最後にヒトIFN- α あるいはIFN- β で処理したヒトHSCから抽出したTotal RNAを材料にして、microRNAおよびmRNAの発現変動を網羅的にスクリーニングした。

C. 研究結果

1. HSC に対する I 型 IFN の細胞増殖または細胞周期への作用：IFN- α またはIFN- β は、HSC に対し細胞増殖抑制作用を示し（図1）、細胞周期のG0/G1期からS期への移行を遅らせることで、細胞分裂を抑制することが明らかとなった（図2）。細胞周期が、G0/G1期で停滞していることからCDK阻害因子、特に*p21*遺伝子に着目して定量PCRを行ったところ、IFN- β は*p21*遺伝子の発現を2倍上昇させ（図は示していない）、更に蛋白レベルでも*p21*の発現を増加させることを確認した（図3）。一方で他のCDK阻害因子である*p15*や*p27*には影響しないことが示された（図3）。これらの作用において同じ生物活性濃度で処置した場合、IFN- β はIFN- α よりも作用が強力であることが明らかとなった。

2. HSC に対する IFN- β の MMP 産生への影響作用：上記1.の検討で作用がより強力であったIFN- β 処置による各種MMP遺伝子の変動を定量PCR法で経時的に検討した。その結果IFN- β は*MMP-1*遺伝子の発現を有意に増加させることが明らかとなった（表1）。またIFN- β はHSC培養上清中のMMP-1蛋白を濃度依存的に増加させることをEIA法にて確認した（図4a）。またTGF- β 処置によりMMP-1蛋白の産生量は低下するが、IFN- β は、その産生量を正常レベルにまで回復させることが明らかとなった（図4b）。

3. HSC における TGF- β シグナルに対する IFN- β の作用：上記2.でTGF- β 刺激時のヒトHSCに対し、IFN- β が抑制的に働くことが示唆されたため、TGF- β シグナル伝達分子について解析を進めた。その結果Smad2のリン酸化が濃度依存的に抑制されること（図5a）、およびTGF- β シグナルの抑制因子である*Smad7*遺伝子の発現が約1.6倍上昇すること（図5b）が明らかとなった。

4. I 型 IFN 処理 HSC における microRNA および mRNA

の網羅的解析：IFN- α またはIFN- β 処理したHSCにおける網羅的miRNAおよびmRNAアレイ解析を行った。現在詳細な解析を進めている最中であるが、miRNA解析では、元々の発現が高いmiRNAに関しては、IFN処理によってダイナミックな発現量変化は検出されず、またIFN- α とIFN- β による差も認められなかった。一方、低発現のmiRNAに関しては、発現量が2倍以上あるいは1/2以下に変動しているものが認められた（図表は示していない）。

D. 考察

本年度の検討により、肝線維化において重要な役割を果たしているHSCに対して、I型IFNが直接的に、細胞増殖抑制作用、細胞周期抑制作用、MMP-1産生亢進作用、TGF- β 抑制作用などの多様な作用を引き起こすことが明らかとなった。I型IFNが動物レベルでも臨床においても肝線維化を抑制することについては、多くの知見が得られている。更にこれまで一方向性と考えられてきた線維化進行が、リバースする可能性があり、I型IFNにその作用を有する可能性が示唆されている。したがって、肝線維化に対するI型IFNの作用分子機構を詳細に再検討し、明らかにすることは、肝線維化を制御する薬物の創薬研究の基盤となり、類似の作用を有する低分子化合物の探索方針を提示することが可能となる。

E. 結論

培養ヒトHSCを用いてI型IFNの肝線維化抑制作用を検討した。I型IFNはCDK阻害因子である*p21*を誘導することで細胞周期のG1期からS期への移行を抑制し、細胞増殖抑制作用を示した。また、同じI型IFNに分類されていても、IFN- β はIFN- α よりも効力が高いことが明らかとなった。更にIFN- β は、TGF- β シグナルの抑制を介してMMP-1産生を亢進させることが示された。これらの結果からI型IFNの中でもIFN- β は肝線維化を抑制するだけでなく、細胞外マトリックスを分解して線維化をリバースさせる作用を有する可能性が示唆された。今後、網羅的miRNAおよびmRNA解析結果とも関連づけ

て、IFNの線維化抑制機構と類似の作用を有する薬物の探索方策を提示していく予定である。

F.研究発表

論文発表

なし

学会発表

5. ヒト肝星細胞を用いた I 型インターフェロンの抗線維化メカニズム解析検討。西村和美、伊澤明子、田邊純一、鈴木知比古、中牟田誠。第15回肝細胞研究会。H20. 6.
6. Marked amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by a PEGylated murine recombinant interferon- β with improved pharmacokinetic properties. Tsuchiyama H, Torii Y, Mori K, Yamashita K, Miyauchi Y, Izawa A, Tanabe J, Mochizuki H, Okano K, Taniguchi T, Narumi H, Suzuki T. In World congress on treatment and research in multiple sclerosis. H20. 9.
7. A PEGylated human recombinant interferon- β markedly enhances potency of anti-tumor activity in the xenografted human tumor model. Momen S, Suzuki T, Narumi H, Yamashita K, Taniguchi T, Okano K. 第67回日本癌学会学術総会 H20. 10.
8. インフルエンザワクチンに対する新規CpGオリゴのアジュバント効果。岩村智勝、上仲一義、松田純一、鈴木知比古、成見英樹、野崎周英。第12回日本ワクチン学会学術集会 H20. 11.

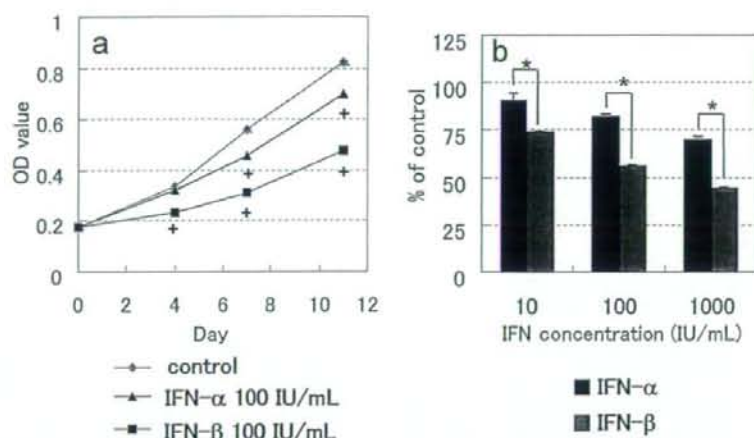


図1 培養ヒトHSCの増殖に対するI型IFNの作用。IFN- α 、IFN- β 共に濃度依存的に増殖を抑制した。その抑制効果はIFN- α よりIFN- β の方が強かった。

a) Human hepatic stellate cells (hHSCs) were cultured with or without IFN 100 IU/mL for 4-11 days. Medium were changed every for 4 days. b) hHSCs were cultured with or without IFN 10-1000 IU/mL for 7 days. Medium were changed every for 4 days. Data represent the mean \pm SEM (n=5). +p < 0.05 vs control (t-test) . *p < 0.05 (t-test).

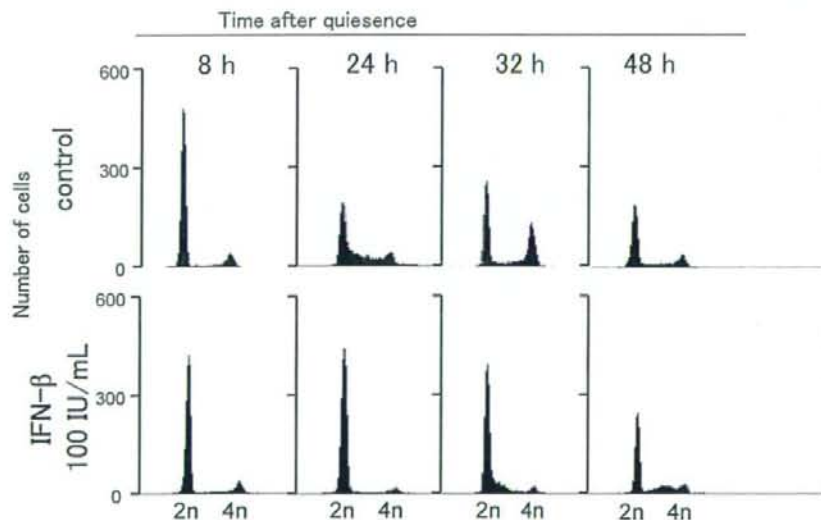


図2 培養ヒトHSCの細胞周期に対するI型IFNの作用。IFN- β が細胞周期のG0/G1期からS期への移行を遅らせることが確認された。

Cell cycle progression of hHSCs grown in absence (control) or presence of IFN- β 100 IU/mL at indicated periods after quiescence. Cellular DNA content was analyzed by flow cytometry.

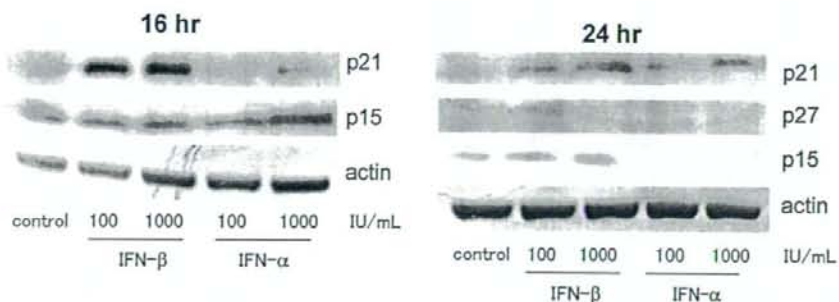


図3 培養ヒトHSCにおける細胞周期関連蛋白CDK阻害因子に対するI型IFNの作用。I型IFNはp21蛋白の発現を増加させたが、他のCDK阻害因子p15やp27蛋白に影響しなかった。

The hHSCs were cultured with IFN 100, 1000 IU/mL for 16, 24 h. Expression of indicated cyclin-dependent kinase inhibitor was analyzed by Western blot.

表1 培養ヒトHSCにおける各種MMP遺伝子発現に対するIFN-betaの作用。I型IFNはMMP-1遺伝子の発現を上昇させたが、他のMMPには影響しなかった。

Gene Name	proteinase	Time		
		8 h	24 h	72 h
MMP-1	Collagenase-1	→	↗ 1.3 folds	↑ 2 folds
MMP-2	Gelatinase A	→	→	→
MMP-3	Stromelysin-1	→	→	→
MMP-9	Gelatinase B	→	→	→
MMP-14	MT1-MMP	→	→	→
TIMP-1	MMPs inhibitor	↗ 1.2 folds	↗ 1.2 folds	↗ 1.3 folds
TIMP-2	MMPs inhibitor	→	→	→

Time course analysis of the MMP-1, -2, -3, -9, -14 and TIMP-1, -2 mRNAs expression levels in IFN-beta-treated hHSCs were carried out. The cells were cultured for 8, 24, 72 hrs with or without IFN-beta 100 IU/mL. The levels of mRNAs in the cells were determined by real-time PCR assay.

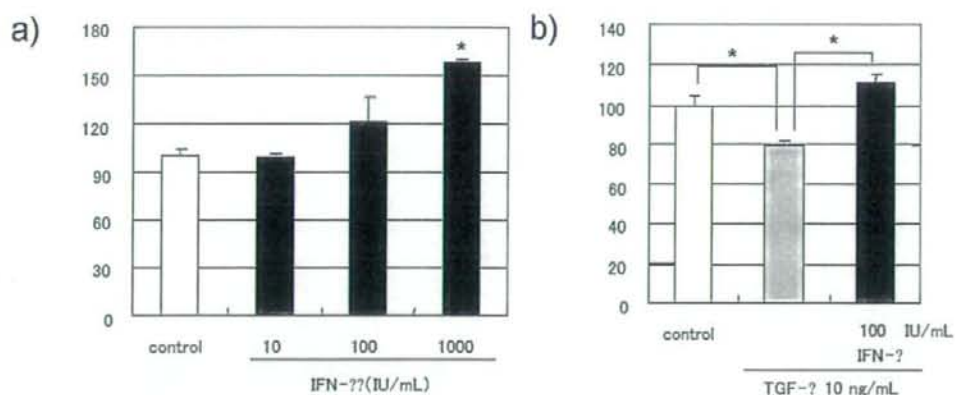


図4 培養ヒトHSCにおけるMMP-1蛋白発現に対するIFN- β の作用。IFN- β はTGF- β 非存在下および存在下ともにMMP-1蛋白の発現を上昇させた。

a) The hHSCs were cultured for 96 h with IFN- β 10-1000 IU/mL. * $p < 0.01$ vs control (Shirley-Williams test). b) The hHSCs were stimulated by TGF- β in the presence or absence of IFN- β for 96h. * $p < 0.05$ (t-test). MMP-1 contents in the culture supernatants were measured by ELISA. The cell numbers were measured by MTS Cell Proliferation Assay. Data represent MMP-1 secretion per cell. MMP-1 secretion in non-treated cells was used as a control (100%). Data represent the mean \pm SEM ($n=3$).

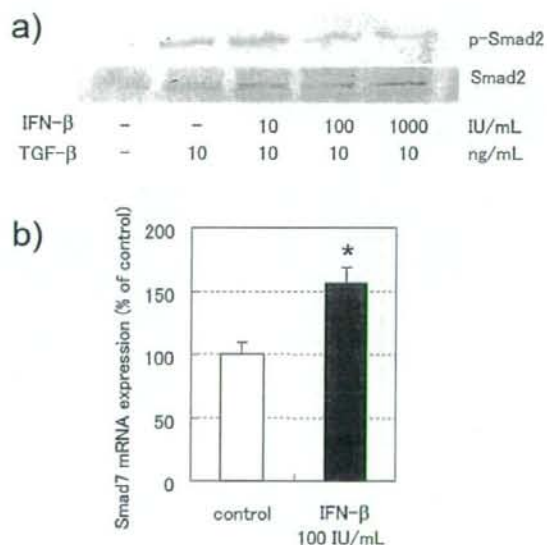


図5 培養ヒトHSCにおけるTGF- β シグナルに対するIFN- β の作用。IFN- β はSmad2リン酸化の抑制およびSmad7遺伝子の発現亢進によりTGF- β シグナルの一部を抑制することが明らかとなった。

a) Western blot analysis of phosphorylated (p-Smad2) and nonphosphorylated Smad2 were carried out. The hHSCs were stimulated by TGF- β in the presence or absence of IFN- β for 24 h. b) The expression levels of Smad7 mRNA were analyzed by real-time PCR. The hHSCs were cultured for 24 h with or without IFN- β 100 IU/mL. Data were normalized on GAPDH mRNA expression levels. Data represent the mean \pm SEM ($n=3$). * $p < 0.05$ vs control (t-test).

研究成果の刊行に関する一覧表

河田則文

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T, Kawada K, Ikeda K	Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatology Int.		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis	Hepatology Int.		in press	2009
Smedsrød B, Le Couteur D, Ikejima K, Jaeschke H, Kawada N, Naito M, Knolle P, Nagy L, Senoo H, Vidal-Vanaclocha F, Yamaguchi N	Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium.	Liver Int.		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N.	Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet.	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.	294	R311-20	2008
小林佐和子, 森川浩安, 河田則文。	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。	Medical Practice	25	1815-7	2008
小川智弘, 河田則文	線維化のMechanism 肝線維化と細胞間ネットワーク	肝・胆・膵	57	205-209	2008
森川浩安, 河田則文	肝炎の進行と線維化マーカー	診断と治療	96	541-546	2008
河田則文	肝疾患と門脈圧亢進症	Medical Bio	5	40-43	2008

池田一雄

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌：

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T, Kawada K, Ikeda K	Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatology Int		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis	Hepatology Int		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N.	Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet.	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol	294	R311-20	2008

小川智弘

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa T, Kawada K, Ikeda K	Effect of natural interferon α on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatology Int		in press	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis	Hepatology Int		in press	2009

小川智弘, 河田則文	線維化のMechanism 肝 線維化と細胞間ネット ワーク	肝・胆・膵	57	205-209	2008
------------	--------------------------------------	-------	----	---------	------

田守昭博

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinkawa H, Naka i T, Tamori A, Toma anaka H, Takemur a S, Ohba K, Uen ishi T, Ogawa M, Yamamoto S, Hai S, Ichikawa T, Kodai S, Hirohas hi K, Wakasa K, Kubo S.	Hepatocellular carcin oma (HCC) recurring 1 0 years after clearan ce of hepatitis B sur face antigen and 20 y ears after resection of hepatitis B virus- related HCC.	Int J Clin On col.	13	562-6	2008
Tamori A, Hayash i T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iw ai S, Enomoto M, Morikawa H, Sak aguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N	Frequent detection of hepatitis B virus DN A in hepatocellular c arcinoma of patients with sustained virolo gic response for hepat itis C virus	J Med Virol		In press	2009
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	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	Jpn J Transfi sion and Cell Therapy	54	393-397	2008
松本健二、高橋峰 子、田守昭博、西 口修平	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	日本公衛誌	55	75-82	2008

榎本 大

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N.	Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C.	Liver Int.	28	1314-5	2008

鈴木知比古

書籍：なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌：なし

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし。

Effect of Natural Interferon α on Proliferation and Apoptosis of Hepatic Stellate Cells

Tomohiro Ogawa¹, Norifumi Kawada¹, and Kazuo Ikeda²

1) Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan

2) Department of Anatomy, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan

Short Title: Interferon α and stellate cell apoptosis

Corresponding Author:

Norifumi Kawada, M.D. & Ph.D.

Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University

1-4-3, Asahimachi, Abeno, Osaka 545-8585, Japan

(Phone) 81-6-6645-3897 (Fax) 81-6-6646-6072

(E-mail) kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp

Abstract

Inhibition of the proliferation of hepatic stellate cells (HSC) is clinically important for the control of liver fibrosis and cirrhosis. Interferons are now frequently used for chronic viral hepatitis because of their anti-viral activity. However, patients treated with interferons exhibit a regression of liver fibrosis even if viral eradication is not achieved, indicating that interferon itself has anti-fibrotic activity. Herein, we show the anti-proliferation and pro-apoptotic activity of natural interferon α against HSC. We found that interferon α inhibited serum-stimulated [³H]thymidine incorporation of HSC in a dose-dependent manner, with a significant reduction at more than 100 U/mL. Interferon α also attenuated PDGF-BB-stimulated DNA synthesis of HSC.

Although the molecular mechanism behind these phenomena has not been defined, we found that interferon α triggers the apoptosis of HSC treated with low-dose tumor necrosis factor α , as determined by the Alamar blue assay, morphology, and DNA ladder formation. Furthermore, interferon α decreased inhibitor of caspase-activated DNase levels, which may augment tumor necrosis factor α -induced cell death signals. Thus, interferon α regulates the number of myofibroblastic hepatic stellate cells and may clinically contribute to the regression of human liver fibrosis.

Total: 186 words

Index Words: tumor necrosis factor α , caspase, cyclin, cytochrome c, caspase-activated DNase

1. Introduction

Hepatic stellate cells (HSC), which reside in Disse's space outside sinusoids, maintain a quiescent phenotype, and store vitamin A under physiologic conditions. They undergo activation in response to inflammatory stimuli and become myofibroblastic cells (1, 2). The latter phenotype secretes profibrogenic mediators, generates extracellular matrix materials, and thus plays a pivotal role in the fibrogenesis of the liver (3-5). One of the features of activated HSC is their proliferation. An increase in the number of activated myofibroblasts together with the deposited extracellular matrix materials contributes to the formation of fibrotic septa forming C-C and P-C bridges. The suppression of HSC activation and cell number is thus a possible mechanism which can be exploited to establish therapeutic strategies against human liver fibrosis (6, 7).

Our previous studies have shown that antioxidative compounds such as resveratrol and *N*-acetyl-L-cysteine exert anti-fibrotic activity in the liver and have an anti-proliferative effect on cultured HSC. (8-10). Resveratrol functions as an inhibitor of tyrosine kinase and inhibits the phosphorylation of platelet-derived growth factor-receptor β (PDGFR β) under PDGF-BB stimulation, leading to attenuation of the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *N*-acetyl-L-cysteine also inhibited DNA synthesis of cultured rat HSC stimulated by PDGF-BB through the cathepsin B-dependent proteolytic degeneration of PDGFR β .

Recently, several clinical reports have revealed that interferon α (IFN α), especially when used in combination with ribavirin, provides an effective therapy for chronic hepatitis C. Although the primary action of IFN α is to eradicate viruses, it has also been suggested to suppress and even cause the regression of liver fibrosis, as revealed by repeated liver biopsies performed in IFN α -treated patients with chronic hepatitis C (11, 12). These reports strongly indicate that IFN α may induce the deactivation of human HSC, thereby reducing the septum-forming fibroblastic cell lineage. Herein, we show evidence for the anti-proliferative and pro-apoptotic actions of IFN α against human HSC (13).

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Recombinant rat dimer of platelet-derived growth factor B (PDGF-BB) was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MO, USA). Polyclonal antibodies against extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2), phospho-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), mitogen-activated kinase/ERK kinase (MEK), phospho-MEK, Akt, phospho-Akt (Ser 473), cytochrome c, caspase-3, and cleaved caspase-3 were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA) and those against cyclin D1, cdk2, cdk4, cdk6, p21, p27, p53, caspase-activated DNase (CAD), and inhibitor of CAD (ICAD) were acquired from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and fetal bovine serum were purchased

from Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, USA). [³H]Thymidine and enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent were purchased from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England). Immobilon P membranes were purchased from Millipore Corp. (Bedford, MA, USA). Kodak XAR5 film was purchased from Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, USA). Human natural IFN α was donated by Otsuka Pharmaceutical Co. (Tokushima, Japan). All other reagents were obtained from Sigma Chemical Co. or Wako Pure Chemical Co.

2.2. Preparation of human hepatic stellate cell line, LX-2

Human HSC-line, (LX-2, donated by Dr. Scott Friedman), a cell line spontaneously immortalized by growth in low serum, were established as previously reported. Characterizations of the cells were described in detail elsewhere (13). Human HSC were maintained on plastic culture plates in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. After the culture had continued for the indicated number of days, the medium was replaced by serum-free DMEM with test agents and the culture was continued for 48 h.

2.3. Immunoblot

Proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred to Immobilon P membranes. After blocking, the membranes were treated with primary antibodies followed by peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were visualized using the enhanced chemiluminescence system (Amersham

Pharmacia Biotech) and Kodak XAR5 film.

2.4. Cell growth assay

Subconfluent Human HSC-line was cultured on plastic dishes for 3 days in 10% FBS/DMEM, and then maintained for 24 h in serum-free DMEM. These cells were successively stimulated with test agents for 24 h, and then were pulse-labeled with 1.0 μ Ci/ml of [³H]thymidine during the last 24 h. The incorporated radioactivity was counted by liquid scintillation, as previously described (9).

2.5. Cell survival assay

Cell survival was measured using the Alamar blue assay (BIOSOURCE) according to the manufacturer's instructions. In brief, 20 μ l of Alamar blue was added to 6-well plates containing DMEM. Absorbance at 530 nm was measured using a micro-plate reader (Wallac 1420 ARVOsx, P-E Applied Biosystems).

2.6. DNA fragmentation assay.

Cell samples were homogenized and centrifuged. The pellet was resuspended in 1 mL of lysis buffer consisting of 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 100 g/L proteinase K, and 0.5% SDS and incubated for 2 h at 50°C before being treated with ribonuclease overnight at 37°C. After extraction with phenol-chloroform twice and precipitation with ethanol, the DNA was dissolved in TE buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L EDTA). The DNA was loaded onto 1.5% agarose gel containing ethidium bromide, electrophoresed in Tris acetate/EDTA buffer for 2 h at 50 V, and

photographed under ultraviolet illumination.

2.7. Flow Cytometric Quantification of Apoptotic and Necrotic cells.

For quantification of apoptotic cells, we used flow cytometry (FACS Calibur HG; BD, Franklin Lakes, NJ) after trypsination of Human HSC treated with IFN α or TNF α , IFN α /TNF α under serum-reduced conditions (0.1% FBS) for 48 hours (14). To detect early apoptotic changes, staining with Annexin V-FITC, which is known to have high affinity to phosphatidylserine, and propidium iodide were used according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland).

2.8. Mitochondria/cytosol fractionation

Human HSC were treated with medium supplemented with TNF α and/or IFN α for 24 h. Then, the cells were collected using a cell scraper, and the collected cells were pelleted by centrifugation at 600 x g for 5 min at 4°C. After washing with ice-cold PBS, fractions with enriched mitochondria and cytosol were obtained using a Mitochondria/Cytosol fractionation kit (Bio Vision Research Products, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Individual fractions were stored at -80°C until use.

2.8. Statistical analysis

Data presented as bar graphs are the means \pm S.D. of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's t-test ($P < 0.01$ was considered significant).

3. Results

3.1. Effect of IFN α on DNA synthesis of Human HSC-line

As shown in Fig. 1, human HSC incorporated 11 ± 2 (DPM $\times 10^4$) of [3 H]thymidine in the presence of serum. DNA synthesis dose-dependently decreased in the presence of IFN α ; it decreased significantly to 71 and 48% of the control in the presence of 10^2 and 10^3 IU/mL, respectively, of IFN α . PDGF-BB (10 ng/mL) augmented DNA synthesis of HSC at about 1.2 times. Even in this condition, IFN α at a concentration of more than 10^3 IU/mL significantly suppressed DNA synthesis of HSC (Fig. 2).

3.2. Effect of IFN α on cell cycle-related protein expression and PDGF-BB-stimulated signal transduction in HSC.

Because IFN α suppressed DNA synthesis of human HSC, we hypothesized that IFN α regulates cell cycle-related protein expression, thereby hampering cell cycle transition from the G1 to S phase. Thus, the expression of several cell cycle-related proteins was determined by immunoblot. As shown in Fig. 3, the amount of major cell cycle-related proteins such as cyclin D1, cdk2, cdk4, cdk6, p21, and p27 was not affected by IFN α . Although a previous report using hepatoma cell lines indicated that p53 is involved in growth suppression by IFN α (15), we failed to observe the suppression of p53 in HSC treated with IFN α . The PDGF-BB-activated MEK-MAPK cascade and Akt were also

unaffected.

3.3. Induction of apoptosis of HSC by IFN α

Although the mechanism of IFN α -dependent DNA synthesis inhibition was not clear, we found that IFN α triggered the apoptosis of human HSC-line in the presence of a low dose of TNF α . As shown in Fig. 4, IFN α or TNF α alone failed to affect the number of HSC, as determined by the Alamar blue assay. However, the simultaneous addition of IFN α and TNF α significantly decreased the cell number to 54% of the control. In fact, when observed under a phase-contrast microscope, the cell density of human HSC became sparse when cells were treated with IFN α and TNF α for 48 h (Fig. 5). This finding indicates that cell death is actively stimulated by the combination of IFN α and TNF α . This observation was further supported by the fact that cell treatment with IFN α plus TNF α induced DNA ladder formation (Fig. 6) and analysis using flow cytometric quantification of apoptosis of human HSC line (Fig.7).

3.4. Role of IFN α on caspase cascade

Finally, we tested whether IFN α regulates the caspase cascade in human HSC-line. As shown in Fig. 8A, cytochrome c release from mitochondria into the cytosol was augmented by TNF α alone and TNF α /IFN α treatment. In accordance with this result, cleaved caspase 3 was enriched in cells treated with TNF α alone and TNF α /IFN α (Fig. 8B). Because TNF α alone thus triggered cytochrome c release and the activation of caspase 3 and failed to induce the active apoptosis of HSC, we hypothesized that IFN α may play a critical

role in finalizing DNA fragmentation. After searching for the mechanism, we found that IFN α significantly reduced the level of inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) without affecting the amount of CAD (Fig. 8C).

4. Discussion

IFN α is now a first-choice therapy for chronic hepatitis C (CH-C). In combination with ribavirin, IFN therapy leads to about a 30 and 80 % eradication of HCV genotypes 1 and 2, respectively. Recently, pegylated IFN α has improved the efficacy of antiviral therapy (16, 17). IFN α as well as IFN β binds to cell surface receptors composed of IFNAR1 and IFNAR2 subunits. IFN α binding leads to ligand-induced receptor dimerization and then to the auto- and trans-phosphorylation of Janus protein tyrosine kinases, which successively induces the phosphorylation of STAT1/STAT2. Phosphorylated STAT1/STAT2 binds to IFN regulatory factor 9 (IRF-9) to form IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3), which translocates into the nucleus and binds to the IFN-stimulated response element (ISRE), initiating the transcription of IFN-dependent genes such as 2'-5'-oligoadenylate synthetase. These IFN-induced intracellular signalings suppress viral replication to complete viral eradication (18, 19).

In addition to the antiviral effect, IFN α is also known as a negative growth factor and shows anti-oncogenic activity (14). Several lines of evidence have revealed that IFN therapy for CH-C lowers the occurrence of hepatocellular carcinoma (HCC), although the precise molecular

mechanism has not yet been elucidated (20-22). In addition, treatment using IFN in combination with 5'-fluorouracil (5-FU) was reported to be effective for advanced HCC with portal vein thrombosis (23, 24). It has recently been reported that IFN α/β induces p53 gene transcription and increases the p53 protein level in HepG2 and HLE cells, two human hepatic cancer cell lines, thereby contributing to tumor suppression. However, the effect of IFN on the proliferation and cell survival of hepatic non-parenchymal collagen-producing HSCs has yet to be fully elucidated.

Several lines of evidence show that IFN α treatment for chronic hepatitis C leads to the regression of liver fibrosis even if HCV is not successfully eradicated (11,12). This fact indicates that IFN α has a direct anti-fibrotic action, most likely through its action against HSC. Initially, IFN γ was reported to successfully inhibit HSC activation, as revealed by its inhibitory effect on collagen synthesis and smooth muscle α -actin expression (25,26). Its *in vivo* anti-fibrotic action has also been elucidated (27,28). Successively, IFN α was proven to inhibit DNA synthesis of human HSC although a relatively weak inhibitory effect was seen at a concentration above 10^4 U/ml (29). In the present study, we observed an almost 100-times stronger anti-proliferative effect using OIF, a natural IFN α . This discrepancy may be derived from the difference in IFN used and from the condition and culture system of HSCs. Furthermore, in that report, Mallat et al. showed that IFN α suppressed [3 H]thymidine incorporation of human HSC stimulated with 5% fetal calf serum, PDGF-BB (20 ng/mL), PDGF-

AA (20 ng/mL), or TGF β 1 (0.5 ng/mL), and that IFN α reduced the number of HSC stimulated with 5% fetal calf serum. However, the authors did not refer to the mechanism, especially to the induction of apoptosis of human HSC exposed to IFN α . Although we failed to clarify the mechanism of IFN α -dependent inhibition of cell cycle progression in human HSC-line, we found that natural IFN α contributes to the induction of apoptosis of human HSC by activating the caspase cascade, which provides a novel insight into the fibrosis regression in patients treated with IFN α derivatives.

Mallat et al. additionally showed that IFN α as well as IFN γ reduced the secretion of prolines and the mRNA expressions of collagens α 1(I) and α 1(III) (29). With respect to this mechanism, Inagaki Y et al. recently reported that IFN α blocked promoter activation and prevented the progression of liver fibrosis induced by CCl $_4$ injection when administered to transgenic mice harboring the alpha2(I) collagen gene (COL1A2) promoter sequence, and that, in transient transfection assays, IFN α decreased the steady-state levels of COL1A2 mRNA and inhibited TGF β /Smad3-stimulated COL1A2 transcription (30).

In addition to these previous observations, we herein found that IFN α in combination with a small amount of TNF α shows a pro-apoptotic effect in HSC. This effect is considered to be related to cytochrome c release into the cytosol from mitochondria and caspase-3 activation and be regulated by ICAD (Fig. 7). Although human HSC have been proven to be resistant to apoptosis (31), the data shown here clearly indicate that

they undergo apoptosis at inflammatory liver sites in the presence of IFN α , which may at least partially account for the regression of liver fibrosis during IFN therapy due to chronic hepatitis C.

In conclusion, the present study demonstrates the anti-proliferative and pro-apoptotic actions of natural human IFN α against human HSC-line, and provides useful information regarding the mechanism of IFN-dependent regression of human liver fibrosis caused by viral infection.

Acknowledgements

We thank Drs. Kazuki Nakatani, Naoto Maeda, Yukihiro Imanishi, and Koji Kinoshita for their critical comments on this work. This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). A part of this study was presented at the 12th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (12th ISCHS).

References

- 1) Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N. The hepatic stellate cell in the post-genomic era. *Histol. Histopathol.* 2002; 17: 487-495.
- 2) Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 279: G7-G11.
- 3) Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 2247-2250.
- 4) Gabele E, Brenner DA, Rippe DA. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. *Front. Biosci.* 2003; 8: D69-D77.
- 5) Pinzani, M., Marra, F., 2001. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21, 397-416.
- 6) Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin. Liver Dis.* 2001;5:315-334.
- 7) Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin. Liver Dis.* 2001; 21: 437-451.
- 8) Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 1998; 27: 1265-1274.
- 9) Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Kristensen DB, Yoshizato K, Uyama N, Yamaoka Y. Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor beta. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 28274-28280.
- 10) Matsui H, Ikeda K, Nakajima Y, Horikawa S, Kawada N. Sulfur-containing amino acids attenuate the development of liver fibrosis in rats through down-regulating stellate cell activation. *J. Hepatol.* 2004; 40: 917-925.
- 11) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, Omata M. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have