

200933016A

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21年度 総括研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成22(2010)年 5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21年度 総括研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成22(2010)年 5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 -----	15
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 -----	18
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 -----	24
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 ----	28
鈴木知比古	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	38

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、活性化と共に減少する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。平成21年度には、miR-29bとmiR-195に関してそれぞれがHSC/hMFBのコラーゲン産生と細胞増殖に及ぼす分子機構を詳細に検討してきた。

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はリボゾーム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 $\alpha/\beta$ あるいはIFN $\gamma$ 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 $\gamma >$  IFN $\alpha/\beta$ 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 $\alpha/\beta$ あるいはIFN $\gamma$ 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  $\alpha$ -actin、collagens、MMPs、TIMPs、TGF $\beta$ 、MCP-1、PDGF、leptin、PPAR $\gamma$ ) 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方策を立案する。

## C. 研究結果

(1) 研究グループ全体の研究成果をまとめながら HSCの増殖やコラーゲン発現に対する miR の作用について以下の研究を行った。

(2) IFN による肝星細胞増殖抑制作用のメカニズム解明

ヒト星細胞株 (LX-2) を用いて miR-195 の IFN による発現調節および IFN による細胞増殖の調節との関連について検討した。IFN は 10~100 IU/mL で濃度依存的に LX-2 増殖抑制を示し、これは p21 の発現増加と cyclin E1 の発現減少を介する CDK2 活性低下によることが示唆された。miR-195 発現は IFN により約 1.5 倍増加し、miR-195 precursor により細胞増殖は抑制された。現在 miR-195 のターゲット分子を探索し、IFN を介する肝星細胞増殖抑制への関与を検討中である。

(3) IFN による肝星細胞コラーゲン発現抑制作用のメカニズム解明

コラーゲン発現関連遺伝子のうち 3' UTR に miR-29b、-143 および -218 の予想結合領域を持つ遺伝子を探索した。miR-29b は 1 型コラーゲン  $\alpha 1$  鎖 (Col1a1)、1 型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖 (Col1a2) および Sp1、miR-143 は Col1a1 および Smad3、また、miR-218 は Col1a1、Sp1 および Socs3 の 3' UTR に予想結合領域が認められた。これら

候補遺伝子の3' UTRを組み込んだルシフェラーゼリポーターベクターを用いて解析した結果、miR-29b および miR-218 が、Coll1A1 と Sp1 の3' UTR と相互作用した。以上、miR-29b および miR-218 が Coll1a1 発現調整に関与することが示唆された。

#### (4) 臨床検体を用いた検討

[I] C 型慢性肝炎における肝線維化進行例に特有な肝内 microRNA 発現の変化を同定

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎 30 例の肝組織より microRNA を抽出し 3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1 を用いて網羅的解析を行なった。肝線維化軽度群 (stage 1-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) の間で比較した結果、進行群では 7 種の miR 発現が有意に低下 (fold change, 0.59~0.83) し、17 種が有意に亢進 (fold change, 1.21~2.59) していた。有意に低下したもののうち、miR-422a は  $p < 0.01$  であった。有意に亢進した miR-222、miR-214、miR-199a-3p (miR-199b-3p)、miR-199a-5p は  $p < 0.01$  であった。

[II] C 型慢性肝炎におけるインターフェロン治療効果を規定する肝内 microRNA 発現の変化を同定

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎 30 例を対象に、インターフェロン治療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。治療効果については PEG-IFN- $\alpha$ 2b 1.5  $\mu$ g/kg (または PEG-IFN- $\alpha$ 2a 180  $\mu$ 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 症例において 11 種の miR が有意に低下 (fold change, 0.69~0.90) し、2 種が有意に亢進 (fold change, 1.03~1.80) していた。有意に低下したもののうち、miR-660、miR-324-5p、miR-532-5p は  $p < 0.01$  であった。

#### 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  $\alpha$  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  $\alpha$  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  $\alpha$  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. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. Am J Pathol. 2010, in press
2. Inhibition of Pancreatic Stellate Cell

- Activation by Halofuginone Prevents Pancreatic Xenograft Tumor Development. Spector I, Honig H, Kawada N, Nagler A, Genin O, Pines M. *Pancreas*. 2010, in press
3. Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning. Fujii H, Ikura Y, Arimoto J, Sugioka K, Iezzoni JC, Park SH, Naruko T, Itabe H, Kawada N, Caldwell SH, Ueda M. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16:893-901.
  4. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. *Rev Recent Clin Trials*. 2009 4:179-84.
  5. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. Mu YP, Ogawa T, Kawada N. *Lab Invest*. 2010;90:245-56.
  6. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:316-21.
  7. Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. *Gut*. 2009;58:1566-7.
  8. Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus. Tamori A, Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N. *J Viral Hepat*. 2010;17:123-9.
  9. Two cases of hepatocellular adenomatosis treated with transcatheter arterial embolization. Kobayashi S, Sakaguchi H, Takatsuka M, Suekane T, Iwai S, Morikawa H, Enomoto M, Tamori A, Kawada N. *Hepatol Int*. 2009;3:416-20.
  10. Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada K, Ikeda K. *Hepatology Int*. 2009, in press
  11. 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;3:378-83
  12. 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;29:490-501..
  13. 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;38:427-35.
  14. 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.
  15. 肝臓の線維化研究の進展。河田則文。Annual Review 消化器 2010巻 Page158-164.
  16. 肝臓線維化研究の現状。河田則文。Frontiers in Gastroenterology 2010;10:11-20.
  17. 【ウイルス肝炎 日常診療のポイント】 occult HBV感染とは何か。田守昭博, 河田則文. *Medicina* 2010;47:484-485.

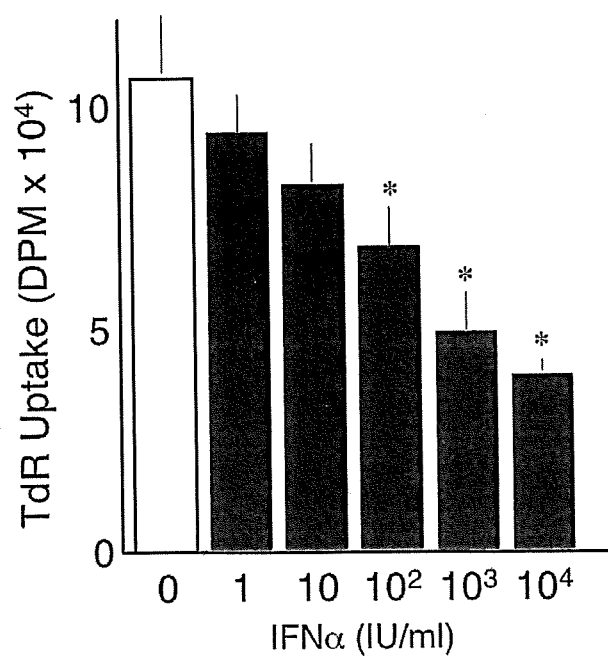


図1。培養ヒトMFBの増殖に対するnatural IFN $\alpha$ の効果。濃度依存的に増殖を抑制することが判明した。

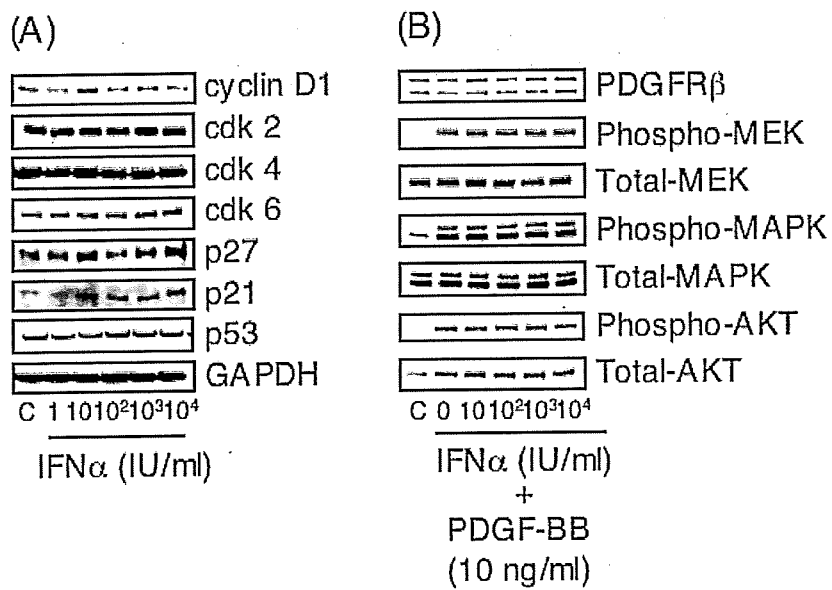


図2。培養ヒトMFBの細胞周期に対するnatural IFN $\alpha$ の効果。Cyclin D1, CDKs 2, 4, 6, p21, 27, p53や細胞増殖に関連する細胞内情報伝達系には影響しなかった。



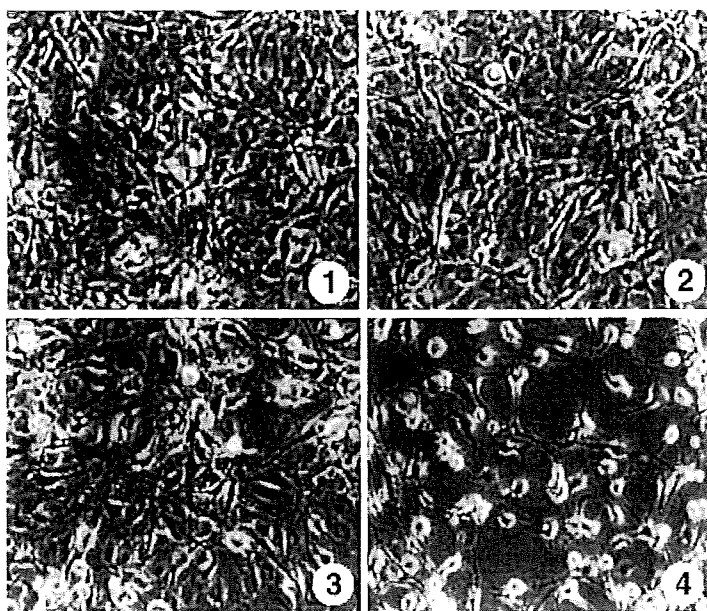


図3。培養ヒトMFBC数に対するnatural IFN $\alpha$ の効果。natural IFN $\alpha$ のみでの効果は少ないが、TNF $\alpha$ と同時に刺激するとMFBCが細胞死に陥ることが判明した。

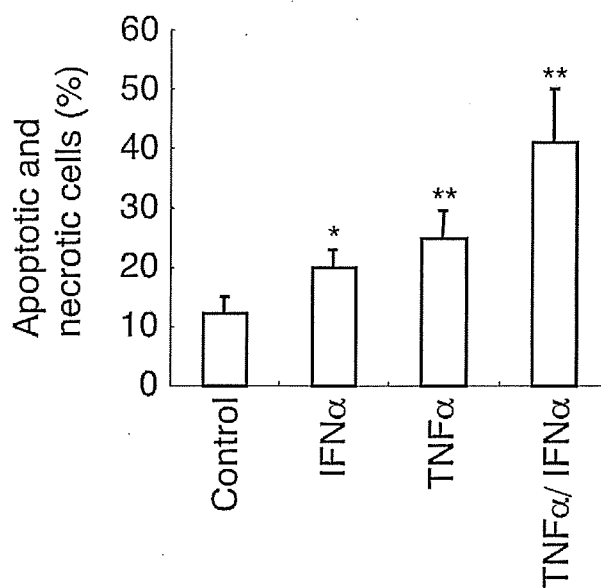


図4。培養ヒトMFBC数に対するnatural IFN $\alpha$ の効果。natural IFN $\alpha$ のみでの効果は少ないが、TNF $\alpha$ と同時に刺激するとMFBCが細胞死に陥ることが判明した。FACSを用いて定量性を明らかにした。

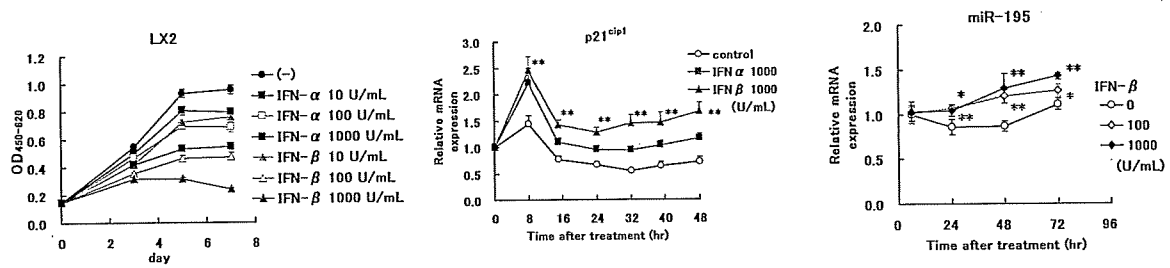


図5。LX-2を用いてmiR-195のIFNによる発現調節およびIFNによる細胞増殖の調節との関連について検討した。IFNは10~100 IU/mLで濃度依存的にLX-2増殖抑制を示し(左)、これはp21の発現増加とcyclin E1の発現減少を介するCDK2活性低下によることが示唆された(図中及び示していない図)。miR-195発現はIFNにより約1.5倍増加し(右)、miR-195 precursorにより細胞増殖は抑制された。また、miR-92クラスターがE2F経路で増殖に関与する可能性を見出した(図なし)。

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ない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。この活性化に伴って発現が低下したマイクロRNAの中にクラスターを形成するもの（miR-17-92）があり、これを星細胞に強制発現すると、細胞増殖やアポトーシスに関連をもつE2F1の発現を制御することが明らかとなった。

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、PDGF などの因子の影響を受け増殖し、また TGFβ1 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、筋線維芽様細胞へと変化して 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、細胞増殖、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やヒト肝星細胞株である LX-2 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 を強制発現させて、細胞活性化のさまざまな変化を解析した。

C. D. 研究結果と考察：ラット肝臓から星細胞を分離・培養し、培養 2 日目および 7 日目の星細胞から RNA を抽出した。マイクロRNAアレイおよび ABI 社の TaqMan MicroRNA Assay にて定量解析を行った。星細胞のマイクロRNA の発現をアレイにより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RNA9個と、反対に発現が増強するマイクロRNA8個を見いだした。TaqMan MicroRNA Assayにてこれらをさらに詳細に検討したが、同様の結果が得られた(図1)。活性化星細胞で発現が低下する mir-92をNCBIのデータベースで検索するとmir-19, 17-5p, 18a, 20aとクラスターを形成することが判った。そこで19と92以外の mir-17-5p, 18a, 20aの発現を確認してみると星細胞の活性化に伴ってこれらのmir-RNAも同様にその発現量が低下することがわかった。

次に、このmiRNAクラスターを強制発現させ、さらにGFPを共発現させるベクターを作製し、星細胞にトランスフェクションさせた。GFPを発現する細胞は、miRNAクラスターも同時に発現する細胞と考えられるが、このmiRNAクラスターを強制発現した細胞においてE2Fの核内の発現が減少した。ウエスタンブロットを行ったところE2Fの発現が減少し、PTENの発現が増加したことがわかった。

E2Fは、細胞増殖やアポトーシスに関連する因子であり、星細胞活性化にも影響を与える因子である。このE2Fの発現抑制が、マイクロRNAの直接作用かどうかを調べてみた。Web上でTarget Scan Human Release 5.1を検索すると図2AのようにE2F1 3' UTR上にはmiR17, miR20aが結合するsiteがあり、この領域を図2Cに示すLUC geneの下流に挿入し、このベクターをmiR17, miR20aと同時に星細胞へトランスフェクトさせた。同様に、miR17とmiR20aの結合サイトのあるp21についても検討した。図2Dに示すように、miR17, miR20aどちらにおいてもE2F1の3' UTRに結合し直接的にその翻訳を抑制していることがあきらかとなった。ちなみに、p21においては、miR20aの結合による抑制は観察されなかった。

さらに、現在、線維化に関連が最も深い因子であるTGFbeta シグナルに影響を及ぼす因子についても解析を進めているところである。

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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表：

##### 論文発表

1. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.

Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1;391(1):316-21.

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

Hepatol Int. 2009 Jun;3(2):378-83.

##### 学会発表

1. 陳輝 小川智之 飯塚昌司 関谷由美子 諏訪友紀子 上田優希子 庄秋栄 葛岩 後藤公寿 河田則文 池田一雄 肝星細胞活性化におけるマイクロRNAの関与についての検討 第23回肝類洞壁細胞研究会 大阪, 平成21年12月12日

2. 飯塚昌司 小川智之 関谷由美子 吉里勝利 池田一雄 河田則文 星細胞のコラーゲン発現に関与するマイクロRNAとその機能第23回肝類洞壁細胞研究会 大阪, 平成21年12月12日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

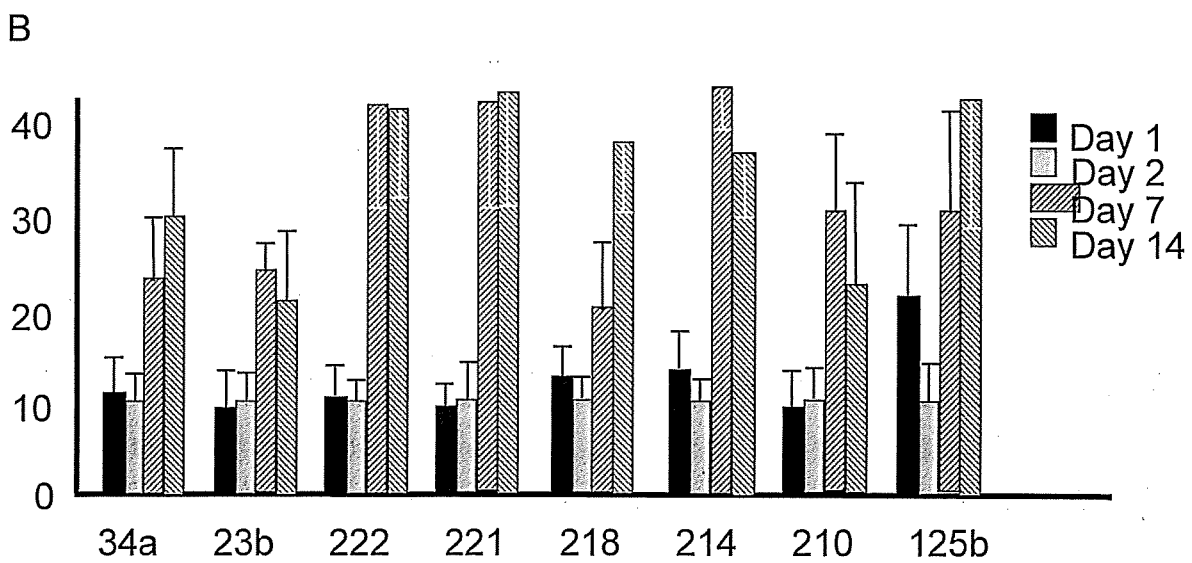
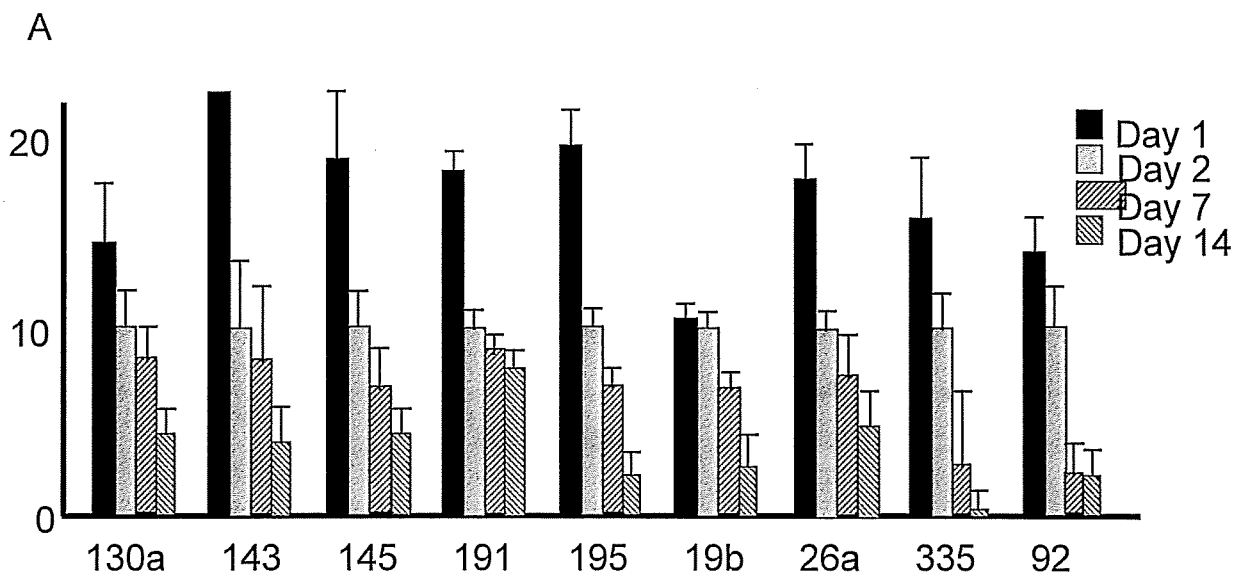
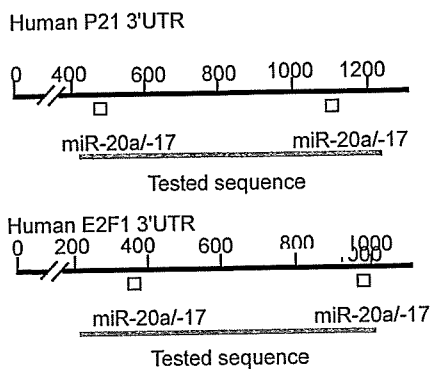


図1：肝星細胞活性化に伴うマイクロRNAの変動

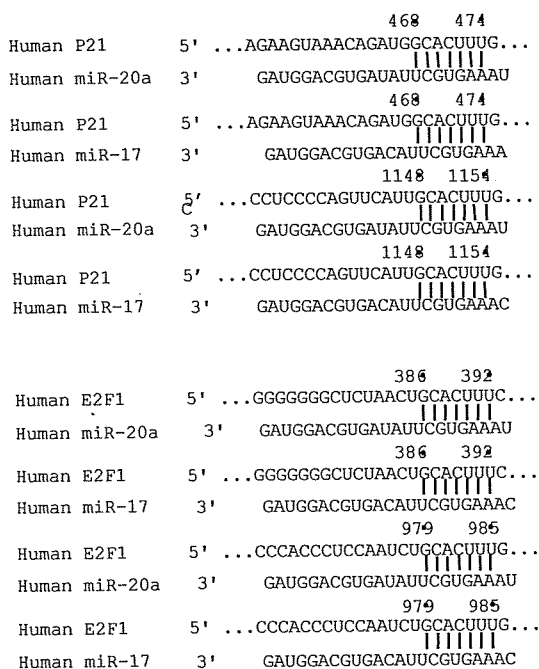
A；肝星細胞の活性化に伴ってその発現が低下したマイクロRNAを示す。

B；肝星細胞の活性化に伴ってその発現が増強したマイクロRNAを示す。

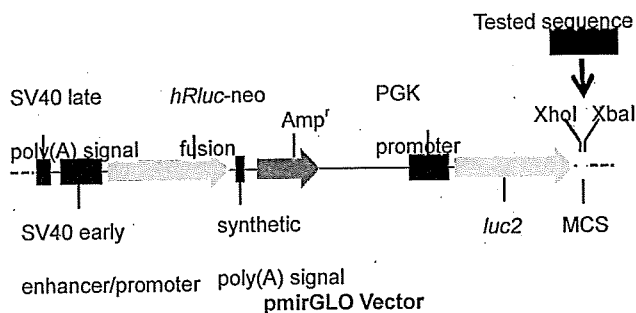
A



B



C



D

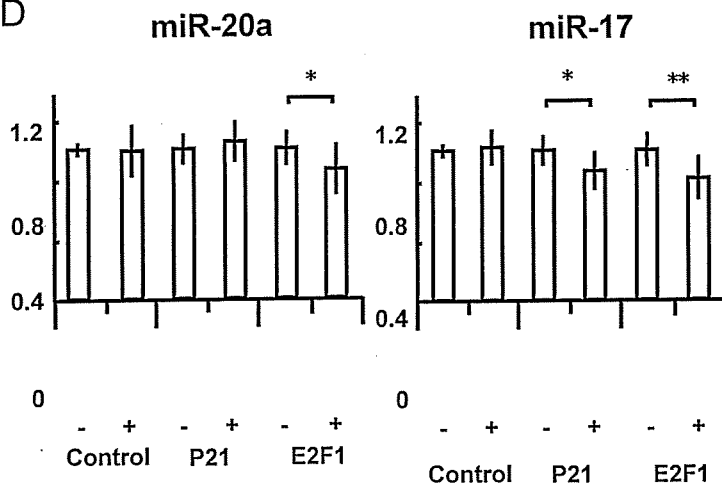


図 2: miR-17 -20a によるターゲット因子 (E2F1, P21) に対する発現制御

A) Target Scan (<http://www.targetscan.org/>) 上での E2F1 と P21 の 3' UTR への結合部位を示す。 B) E2F1 と P21 の 3' UTR での miR-17 -20a のターゲットとなる 7mer の結合 sequence を示す。数字は 3' UTR 上の位置を示す。 C) ルシフェレースレポーターベクタ

への E2F1, P21 の 3' UTR 結合部位 (tested sequence) の挿入。 D) ルシフェレセンスアッセイにより miR-17 は, P21, E2F1 の両者の 3' UTR に結合し, レポーター遺伝子の発現は抑制された。 (-, + は, それぞれ miR-20a, miR-17 の細胞への transfection -, +を示す。 \* p < 0.05)

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IFN添加により発現が増加するマイクロRNAを数種同定した。これらのマイクロRNAのうち、miR-29bがI型コラーゲンの発現抑制効果が強いことが我々の研究によりわかった。このことによりIFN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が期待された。

維化治療法の開発を目的に研究を進めた。

A. 研究目的

インターフェロン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、ヒト星細胞株（LX-2）を用いて、TGFbおよびIFNa, b添加による星細胞の活性化およびコラーゲン産生、増殖に関与すると考えられるマイクロRNAを同定し、インターフェロン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

B. 研究方法

マイクロRNAのデータベースTargetScanを用いて、ヒトcollagen 1A1の3' UTRに結合すると想定されるマイクロRNA（miR-143, 218, 29b）が、LX-2細胞にTGFbおよびIFNa, bを培地中にそれぞれ添加した際、発現が変化するか調べた。細胞から抽出したtotal RNAは、TaqMan MicroRNA Assay（ABI）により定量解析を行った。次に、これらのマイクロRNAがcollagen1A1やSP1の3' UTRに結合することが予想されたため、pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector（Promega）を用いて、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の3'末端側にマイクロRNA標的サイトを導入し、miRNA precursor（Ambion）との結合実験を行なった。また、miRNA precursorをLX-2細胞に導入することで、星細胞のコラーゲンの発現に変化が見られるかをReal-time



PCRおよびWestern blotにより調べた。

### C. 研究結果

ヒト星細胞に TGF $\beta$  を添加すると I 型コラーゲンの mRNA の発現が増加し、IFN $\alpha$  を同時添加することによりその発現は有意に低下した (Fig. 1)。同条件下で、miR-143 の発現は TGF $\beta$  を添加すると濃度依存的に増加した (Fig. 2)。一方で、miR-218 の発現は TGF $\beta$  添加により減少した。また、IFN $\alpha$ ,  $\beta$  をそれぞれ単独添加すると miR-143 の発現は減少し、miR-29b の発現は増加した。マイクロ RNA の結合実験では、miR-218 と miR-29b が、collagen 1A1 と SP1 の 3' UTR に結合することがルシフェラーゼ活性の有意な低下により確認された。miR-218 と miR-29b の precursor を細胞導入した結果、miR-29b が I 型コラーゲンの発現を遺伝子およびタンパク質レベルで有意に抑制した (Fig. 3)。miR-218 は I 型コラーゲンの発現を遺伝子レベルでは抑制しないが、タンパク質の翻訳を抑制することがわかった。また、miR-218 と miR-29b が SP1 の翻訳を抑制している可能性も示唆された。

### D. 考察

これまでに、星細胞の I 型コラーゲンの発現に関与するマイクロ RNA を数種同定した。これらのマイクロ RNA の発現を制御することで、コラーゲンの発現を抑制することができる可能性が示唆された。今後、マイクロ RNA などの低分子を用いた新たな抗線維化治療法の開発が期待される。

### F. 研究発表

#### 論文発表

1. A human-type non-alcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, and Kawada N Am J Pathol. 2010, in press.
2. Suppression of type I collagen production by

microRNA-29b in cultured human stellate cells. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Biochem Biophys Res Commun. 2010;391:316-21.

3. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. Mu YP, Ogawa T, and Kawada N Laboratory Investigation 2010;90:245-56.
4. Effect of natural interferon  $\alpha$  on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada K, Ikeda K. Hepatology Int. 2009, in press
5. 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;3:378-383.

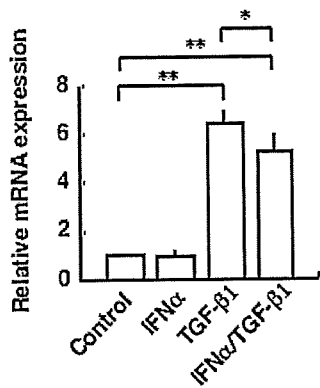


図1 ヒト星細胞株LX-2におけるIFNのCol1A1 mRNAの発現抑制

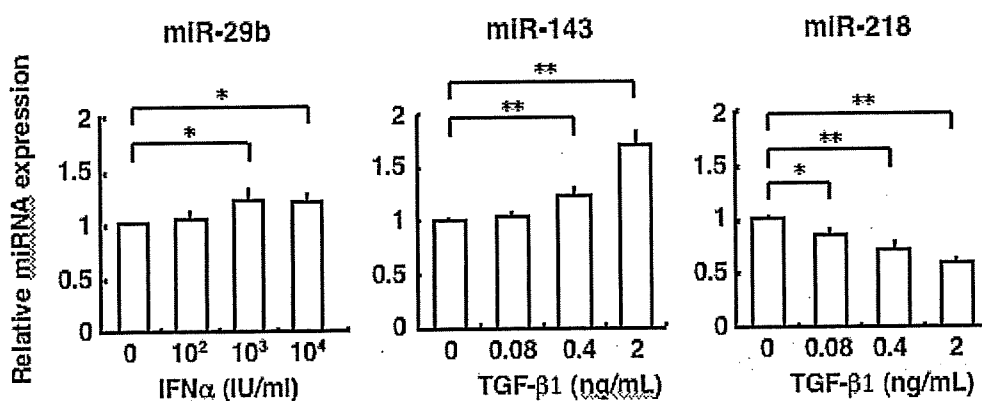


図2 ヒト星細胞株LX-2におけるIFN $\alpha$ およびTGF- $\beta$ 1添加によるマイクロRNAの発現

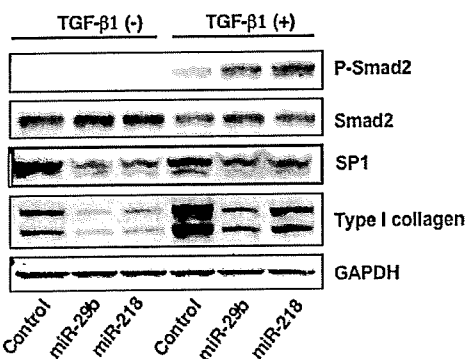
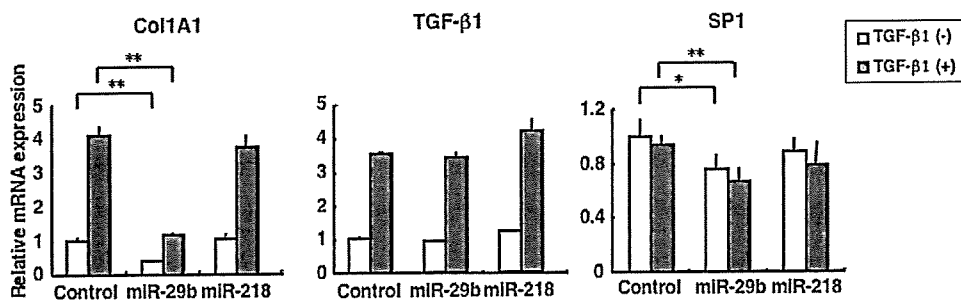


図3 マイクロRNA細胞導入による遺伝子およびタンパク質発現

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にするため 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) 療法に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 法にて解析した。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。

3) 発癌例と非発癌例においてインターフェロン治療前後の肝生検を実施した各19例、20例において肝線維化の組織学的所見を犬山分類にて比較した。

### 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)。

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。

非発癌例ではIFN前後の線維化程度は2.2から1.0へ改善した。一方、発癌例では2.6から2.4へ改善していた。

### 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。以上よ

りSVR肝癌はC型肝癌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. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. *Hepatol Res.* 2010;40:347-368.
2. Comparison of the effect of BCAA granules on between decompensated and compensated cirrhosis. Habu D, Nishiguchi S, Nakatani S, Lee C, Enomoto M, Tamori A, Takeda T, Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Kawamura E, Shiomi S. *Hepatogastroenterology.* 2009; 56: 1719-1723.
3. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. *Rev Recent Clin Trials.* 2009; 4:179-184.
4. Applicability of BARD score to Japanese patients