

2010 J0003A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成23（2011）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、線維化における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 -----	13
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 -----	16
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 -----	19
榎本 大	
5. インターフェロンの抗肝線維化分子機構 の解明とその応用に関する研究 -----	24
鈴木 知比古	
6. C型慢性肝炎における肝内マイクロRNA発現解析 -----	28
村上 善基	
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

総括研究報告書

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

主任研究者 河田 則文 大阪市立大学教授

研究要旨：インターフェロン（interferon, IFN）の抗肝線維化効果の分子機構は不明な点が多い。肝線維化は星細胞（hepatic stellate cells, HSC）と筋線維芽細胞が主役の I 型コラーゲン蓄積症候であり、IFN の HSC への直接作用を検討する必要がある。申請者らは IFN のヒト HSC（LX-2）や肝癌細胞に対するアポトーシス促進作用を報告したが（細胞 41, 35-38, 2009；Hepatology Int, 2009；鈴木ら、特許出願中）、分子機構は未解明である。MicroRNA（miR）はノンコーディング RNA であり、様々な細胞機能に深く関与する。平成 21 年度までに HSC 活性化に関与する miR 発現を網羅的解析後抽出し、その中で IFN 作用に関連する miR-29b、miR-92 クラスター、miR-195 などが星細胞の増殖とコラーゲン産生に関与する主な miR であることを突き止めた（Biochem Biophys Res Commun 391, 316-21, 2010）。一方、同定された miR を強制発現させて、HSC の増殖、コラーゲン 1a1 や Sp1 発現、TGF β などのサイトカイン産生に及ぼす影響も検討した。平成 22 年度は特異的 miR の作用機序をさらに詳細に転写因子や細胞内シグナル因子の観点から検討すると同時に、発現ベクターを構築し、肝臓毒、総胆管結紮による肝線維化動物モデルに対する本 miR の効果について *in vivo* 解析した。また、miR-92 クラスターの機能解析を行った。

一方、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である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。平成 21 年度までに得られた肝線維化と関連する miR（miR-660、miR-324-5p、miR-532-5p）、あるいは、治療予測に関与する miR（miR-422amiR-222、miR-214、miR-199a-3p（miR-199b-3p）、miR-199a-5）について定量性を検討し、その分子学的意義をさらに検討する。

A. 研究目的

2009 年 11 月 30 日に肝炎対策基本法が成立し、国民の肝臓病に対する関心が高まると同時に既感染患者、特に病状の進行した肝炎患者への対応が急務になってきた。350 万人以上は存在すると言われ、国内最大の感染症であるウイルス性肝炎の治療を優先すべく、IFN 治療の公的助成制度が始まり、また、IFN 治療を率先して行うための肝疾患連携拠点病院も整備されている。肝臓病はその病因の如何に関わらず慢性肝炎→肝線維化→肝硬変→肝癌と進行することが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）に加えて肝線維化の抑制（肝硬変の予防）と治療は肝疾患患者の予後を大きく左右する。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 IFN にかわる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 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理解されている。一方で、IFN が HSC 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 HSC に影響する可能性もある。最近、IFN β の抗 HCV 作用の一部が miRNA の誘導による可能性が報告された（Nature 2007;449:919）。miR はノンコーディング 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になってきた。平成 21 年度までに HSC 活性化に関与する miRNA 発現を網羅的解析後抽出し、その中で IFN 作用に関連する miR-29b、miR-92 クラスター、miR-195 などが星細胞の増殖とコラーゲン産生に関与する主な

miRNAsであることを突き止めた (Biochem Biophys Res Commun 391, 316-21, 2010)。miRNA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miRNAの同定は新しい抗線維化療法の端緒となり得る。このようなmiRNAとHSCに関する研究は皆無であり極めて独創性が高い。

B. 研究方法

河田が研究代表者として研究を統括した。池田はH21年までの結果から得られた星細胞の活性化と伴に低下するmiR-92クラスター(miR-19, 17-5p, 18a, 20a, 92)の星細胞機能への影響を詳細に検討した。小川はmiR-29bのコラーゲン発現に対する影響に関して、Sp1発現への関与を主としてさらに検討を進めた。また、miR-218のコラーゲン発現に及ぼす影響を検討した。田守、榎本、村上是臨床サンプルを用いた解析に加え、個々のこれまでの研究により得られた情報をもとにヒトでの臨床試験を開始する薬剤の選別ならびに試験の準備を立ち上げた。鈴木はIFN α と β との作用機序の差を含め、星細胞増殖に及ぼすmiRNAの影響と肝発癌に対するIFNの新しい機序を解明した。

平成22年度

以上の実験により選択されたIFN刺激や星細胞の活性化と関連して変動するmiR-29b, miR-92クラスター(miR-19, 17-5p, 18a, 20a, 92)及びmiR-195に関しては直接的な標的遺伝子であるcolla1, Sp1やE2F1が明らかとなってきたため、詳細なメカニズム解析を進めると同時に、これらのmiRNAを星細胞に輸送する方法論を模索した。また、これらのmiRのin vivoでの効果を検討するために、エンターベクター (pENTR) に U6promoter-TATA-loxP-CMV-EGFP-loxP-preursor miRNA配列を組み込んだベクターを構築し、GatewayシステムのLRクローゼ反応によりレンチウイルス

スペクターへの組換えを起こさせ精製後に感染実験に使用した。MicroRNAの過剰発現によるチオアセトアミドや総胆管結紮による肝線維化モデルマウスにin vivoでも抗線維化的に効果を発揮するかについて検討を行った。

一方、標的分子の3次元立体構造のコンピュータ解析により阻害可能な低分子物質をスクリーニングした。また、既存・既知の抗線維化作用を有する低分子物質との共通性についても検証した。

臨床サンプルを用いた網羅的解析から得られたデータに関しては、さらに解析を行うと同時に、各miRNAに関してリアルタイムPCRで定量解析を行った。また、有意に増加、あるいは、減少するmiRNAに関してはターゲット遺伝子をデータベースTargetScanを用いて予測し、それぞれのmiRNAの結合性を下記のリポーターベクターを用いて確定した。

他施設と共同研究にて多数のサンプルを用いた解析を行った。具体的には京都大学大学院医学研究科付属ゲノム医学センター疾患ゲノム疫学解析分野の村上善基先生と共同研究を開始した。

C. 研究結果

・研究代表者 (河田則文)

- (1) IFNによる肝星細胞増殖抑制作用のメカニズム解明：IFNはmiR-195を介するp21の発現増加とcyclinE1の発現減少によりヒト星細胞株(LX-2)の細胞増殖を抑制した。
- (2) 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：miR-29bは1型コラーゲン α 鎖(Colla1)、およびSp1の3' UTRに結合した。miR-29bはTGF- β を介さずにColla1発現とSp-1を発現低下させた。
- (3) 肝臓の線維化を反映するマーカーとしてmiR-222を同定した。

・研究分担者(池田一雄)

(1) ラット星細胞の活性化に伴い変動する 17 個の miRNA を同定した。miR-92 とクラスターを形成する miR-17-5p, 18a, 20a は活性化に伴って発現低下することを確認した。

(2) miRNA クラスターを強制発現した細胞において E2F の核内発現が減少した。E2F 蛋白発現は減少し、PTEN の発現が増加した。解析の結果、E2F1 3' UTR 上には miR-17, miR-20a が結合した。

(3) マウス肝組織中 miRNA の検索では、チオアセトアミド投与障害肝において miR-18a, miR-19b, miR-20a, miR-29b, miR-155, miR-200a, miR-199a-3p, miR-199a-5p が正常と比べ上昇することが明らかとなった。

・研究分担者(小川智弘)

(1) miRNA 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 miR-29b について検討した。IFN α , β は miR-29b を増加させた。レポーターアッセイでは、miR-29b が collagen 1A1 と Sp1 の 3' UTR に結合した。miR-29b の precursor 導入は I 型コラーゲンと Sp1 の発現を抑制した。

(2) 研究分担者である榎本大氏とともに、ヒト肝生検組織より得られた RNA のマイクロアレイ解析により肝線維化進展とともに発現変動する miRNA を同定した。miR-21, miR-29b, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-214, miR-221, miR-222 の発現は肝臓の線維化の進行とともに正の相関関係にあることが判明した。

・研究分担者(田守昭博)

(1) 1124 例のインターフェロン治療症例の内 373 例が SVR (完全著効) となった。その SVR 例を 66 ヶ月追跡した結果 13 例(3.5%)に肝癌が発症した。

(2) SVR 症例においてインターフェロン治療前の肝線維化進行例からの発癌率が高かった。

(3) SVR 肝癌例の大部分ではウイルス排除後の肝組織において線維化の改善を認めなかった。

(4) SVR 肝癌例では非 B 非 C 型肝炎例と類似した臨床像を認めた。

・研究分担者(榎本大)

(1) 遺伝子型 1b の C 型肝炎 35 例を対象に IFN 治療前の肝生検組織において miRNA 発現を網羅的に解析した。肝線維化軽度群 (stage 1-2) と進行群 (stage 3-4) を比較したところ肝線維化進行例では 7 種の発現が有意に低下 (fold change, 0.59~0.83) し、17 種の発現が有意に亢進 (fold change, 1.21~2.59) した。有意に低下したもののうち、miR-422a (fold change, 0.59) については、 $p < 0.01$ であった。有意に亢進したもののうち、miR-222 (fold change, 1.80), miR-214 (fold change, 1.84), miR-199a-3p (miR-199b-3p) (fold change, 1.90), miR-199a-5p (fold change, 2.00) については $p < 0.01$ であった。

(2) C 型肝炎における IFN 治療効果を規定する肝内 miRNA 発現の変化を同定：ウイルス学的完治 (+) 症例と (-) 症例の間で肝内 miRNA 発現を網羅的に解析した結果、(-) 症例において 11 種の発現が有意に低下 (fold change, 0.69~0.90) し、2 種の発現が有意に亢進 (fold change, 1.03~1.80) していた。有意に低下したもののうち、miR-660 (fold change, 0.61), miR-324-5p (fold change, 0.59), miR-532-5p (fold change, 0.56) については $p < 0.01$ であった。

・研究分担者(鈴木知比古)

(1) I 型 IFN (IFN β > IFN α) が抗ウイルス作用とは独立して、直接肝星細胞に作用し、増殖抑制、細胞周期抑制、コラーゲン分解酵素産生亢進、TGF- β 抑制等の多様な効果をもたらすことを示した。

(2) 上記(1)の作用のうち細胞周期抑制のメカニズムとして p21 の発現亢進を見出すとともに、その他の Cell cycle 関連遺伝子の発現が IFN β で誘導されることを明らかにした。

(3) 肝細胞癌株との比較で肝星細胞により特異的に

IFN β がIFN α よりもダイナミックな遺伝子発現変動をもたらす可能性を網羅的発現解析法にて示し、その変動遺伝子群にはアポトーシス関連遺伝子群を同定した。またペグ化したインターフェロン α やインターフェロン β でも同様の傾向があることを明らかにした。

- (4) 肝星細胞の *in vitro* の培養細胞系において、IFN および他の抗線維化薬の miRNA 発現に及ぼす影響はあまり大きくない可能性を示した。一方 *in vivo* 動物レベルにおいて、病態時の miRNA 発現の変化は明確に認められた。変動した miRNA の幾つかは肝傷害、肝癌と関連する miRNA であった。
- (5) チオアセタミド誘発マウス肝炎モデルにおいて、IFN β が線維化マーカーの Col1A2 遺伝子や肝星細胞活性化マーカーの遺伝子の発現を抑制するだけでなく、線維性コラゲナーゼであるマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)-13 の発現を増加させることを明らかにし、肝線維化を改善する可能性を示した。IFN の肝がん増殖抑制効果 (感受性) を予測するための方法を見出し特許出願した。

・研究分担者 (村上善基)

- (1) C型慢性肝炎の肝線維化の程度別のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。
- (2) C型慢性肝炎のインターフェロン・リバビリン併用療法の応答に関係したマイクロ RNA を同定した。
- (3) 肝細胞癌組織型別のマイクロ RNA 発現プロファイルを作成した。

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ので、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

肝星細胞の活性化制御に関して miR-29b が極めて重要である事が判明した。miR-29b の星細胞内での発現を制御する薬剤をスクリーニングする。また、その薬剤の肝臓へのターゲティングを行う。

肝臓の筋線維芽細胞の増殖は miR-195 で制御された。IFN の抗線維化的な新たな薬理効果の一つとして機能することが判明し、HSC や筋線維芽細胞の miR-195 を増加させる手法の開発が必要である。

肝線維化マーカーになり得る miR-199, 200 と 222 に関してその有用性を臨床研究する。

F. 研究発表

・研究代表者 (河田則文)

- (1) Evolution of hepatic fibrosis research.
Kawada N. Hepatol Res. 2011;41:199-208.

- (2) Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- α -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. J Cell Physiology, in press.
- (3) 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.
- (4) Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. Hepatol Int. 2009 [Epub ahead of print]
- 研究分担者 (池田一雄)
- (1) Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- α -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. J Cell Physiology, in press.
- (2) Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y. Gastroenterology. 2009;137:1459-66.
- 研究分担者 (小川智弘)
- (1) Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. J Cell Physiology, in press.
- (2) Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy. Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habu D, Shiomi S, Kawada N. Hepatol Res. 2010;40:853-61.
- (3) 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;177:153-65.
- (4) 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.
- (5) 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.
- 研究分担者 (田守昭博)
- (1) Investigation of Interferon- α Response by a Single Amino Acid Substitution of Nonstructural Protein 5A in Hepatitis C Virus Infected Patients. Noguchi N, Tamori A, Ogura N, Hori Y, Ikeda S, Nishiguchi S. J Interferon Cytokine Res. 2011 in press
- (2) Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S,

- Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M. *J Med Virol.* 2011 83: 871-878.
- (3) Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. *J Med Virol.* 2011 83: 445-52.
- (4) Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C. Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. *J Gastroenterol.* 2010 46: 350-8.
- (5) Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). Izumi N, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. *Hepatol Res.* 2010 40: 347-68
- ・研究分担者 (榎本大)
- (1) Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakanishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med* 2008;149:912-3.
- (2) Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. *Rev Recent Clin Trials* 2009;4:179-84.
- ・研究分担者 (鈴木知比古)
- (1) I型インターフェロンの肝線維化改善メカニズム (The mechanism of action of type I interferon to improve liver fibrosis). 西村和美, 鈴木知比古. *細胞*, 2009; 41: 35-38.
- ・研究分担者 (村上善基)
- (1) Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. *PLoS One.* (in press).
- (2) Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. *PLoS One.* 2011 Jan 24;6(1):e16081.
- (3) Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. *BMC Medical Genomics.* 2010; 3: 48
- (4) Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. *PNAS* 2010; 107: 15856-61
- (5) Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. *Pathol Int.* 2010; 60: 351-357
- (6) マイクロ RNA の発現異常と肝発癌の関与. 村上

善基. 細胞 42 (6) 2010

G. 知的財産権の出願・登録状況

(1) 「遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法」
村上善基. 特願2010-86966 (H22-4-5)

(2) 「種交差性の判定方法及びその判定方法を使用したアッセイキット」(特許出願番号2009-078975
発明者：鳥居裕一，鈴木知比古，下菌利恵子)。

(3) 「インターフェロン感受性又は応答性の予測方法」(特許出願済(出願日:2010/3/31) 発明者：
鈴木知比古，倉橋香菜，木綿しのぶ)。

(4) 「肝線維症の存在及び/又は肝線維症の重症度の判定方法、判定マーカー、判定用キット、肝線維症の治療の効果予測方法、効果予測マーカー、並びに効果予測用キット」河田則文、榎本 大、小川智弘. 特願2010-281254 (H22-12-17)

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、線維化における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：肝線維化に重要な役割を果たす肝星細胞の活性化や線維化に関連するマイクロRNA発現についてこれまで検討を進めてきたが、星細胞活性化に伴って発現が低下したクラスターを形成するマイクロRNA (miR-17-92) が、線維化と深く関連する因子 TGFbeta の偽受容体である BAMBI の発現を制御してい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-codingRNA) 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：肝星細胞の活性化に伴って発現に変動を認めた miR-17-92 に着目し、web 上の Target Scan Human での解析で特に臓器線維症、線維化に関連する因子を導き出し、これら因子と microRNA の関連について、培養肝星細胞を用いて解析を行った。

C. D. 研究結果と考察：Web上のTarget Scan Human でのmiR-17-92に関する検索で、これまでの我々の肝線維化に関連する研究でtargetとなった因子で共通したものとして、HIF1a, ID2, BAMBIが、候補として挙げられた。活性化星細胞が低酸素状態でHIF1aを産生しVEGFの発現を誘導すること (Biochem Biophys Res Commun. 2004;317:358-62), ID2を星細胞へ強制発現させることでTGFbetaシグナルの抑制も伴って肝臓の線維化が押さえられること (Gut. 2007;56:706-14) を報告してきた。また、線維化に特に強く関連するTGFbetaシグナルを抑制する因子がBAMBIであって、これは、TGFbetaの偽受容体とし

て作用することが知られている (Nat Med. 2007;13:1324-32.)。これら3因子について3' UTR上に結合可能なmiRNAを図1に示した。これら3' UTRの領域を図2に示すLUC geneの下流に挿入し、このベクターをmiR-17-20aと同時に肝星細胞へトランスフェクトさせた。その結果は、図3に示すようにBAMBIに対しては、miR17-20aは有意差を持ってその発現を制御させることが明らかとなった。しかしながら、HIF1aとID2に関しては期待したような制御は認められなかった。さらにLUC geneの実験でmiR-17-20aにより有意に制御を受けたBAMBIについては、蛋白発現レベルにおいても抑制していることが明らかとなった。

E. 結論：星細胞の活性化によって発現に変動がみられたマイクロRNAが細胞外マトリックスの産生に深く関連するTGFbetaシグナルにも関与することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表：

論文発表

1: Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-beta-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol.* 2010 Dec 29.[Epub ahead of print]

学会発表

1: 杉山良典、富谷智明、池田一雄、小池亨、塩尻信義マウス肝臓発生過程におけるsyntaxin2の発現と肝

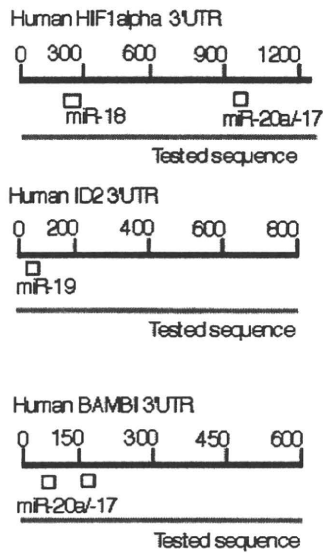
芽細胞の増殖・分化に対する影響 第17回肝細胞研究会 平成22年6月19日 秋田アトリオン

2: 関谷由美子 小川智弘 飯塚昌司 吉里勝利 池田一雄 河田則文 I型インターフェロンのマイクロRNA発現調節を介した肝星細胞増殖抑制作用 第46回日本肝臓学会総会 平成22年5月27日 山形

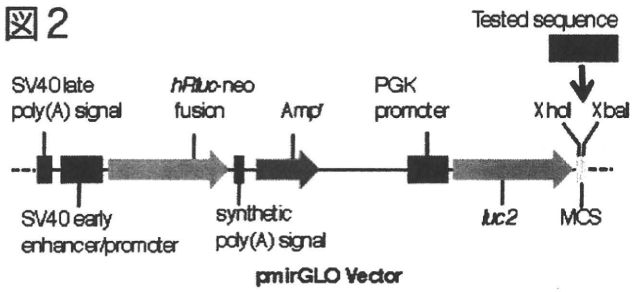
H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

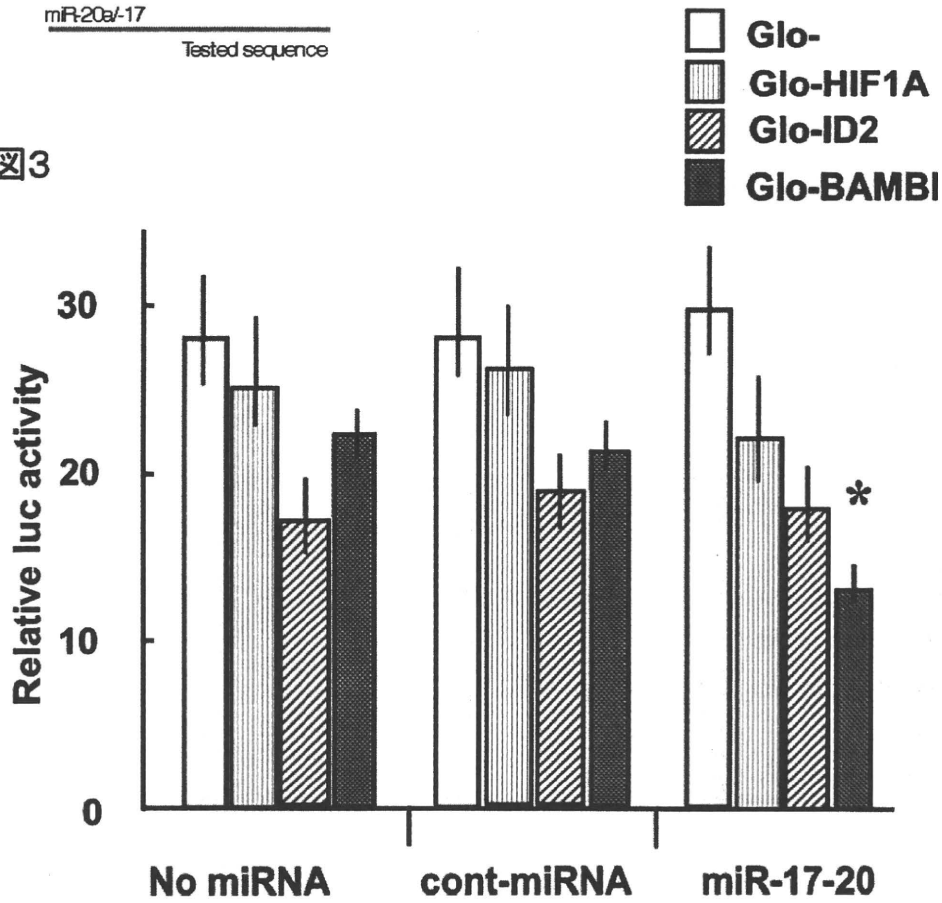
☒ 1



☒ 2



☒ 3



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。

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、TGFβおよびIFNα, β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、その標的遺伝子を明らかにした。そして、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維化治療法の開発を目的に研究を進めた。

B.研究方法

ヒト肝星細胞株LX-2細胞にTGFβおよびIFNα, βを培地中にそれぞれ添加した際、発現が変動するマイクロRNAを調べた。マイクロRNAの発現は、TaqMan MicroRNA Assay (ABI)により調べた。マイクロRNAの標的遺伝子はデータベースTargetScanを用いて探索した。次に、これらのマイクロRNAがcollagen1A1やSP1, cyclin E1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、星細胞の増殖やコラーゲンの発現に変化が見られるかをWST-1やReal-time PCR、Western blotにより調べた。

C.研究結果

ヒト星細胞にTGFβを添加するとI型コラーゲンのmRNAの発現が増加し、IFNα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）。また、IFNα, βを星細胞にそれぞれ単独添加すると、細胞増殖が有意に

抑制されることがわかった (Fig. 1)。同条件下で、IFN 添加により発現が変動するマイクロRNAとして、miR-29bの発現増加およびmiR-195の発現減少が見られた (Fig. 2)。これらのマイクロRNAは、TargetScanによりmiR-29bはcollagen 1A1とSP1の3'UTRに結合すると予想され、一方でmiR-195はcyclin E1の3'UTRに結合すると予想された。マイクロRNAの結合実験では、miR-29bがcollagen 1A1とSP1の3'UTRに結合し、miR-195はcyclin E1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立証された。miR-29bとmiR-195のprecursorをそれぞれ細胞導入した結果、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-195はcyclin E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、細胞の増殖も抑制した (Fig. 4)。

D. 考察

我々はインターフェロン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、星細胞の増殖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TGFβや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。その中でもcollagen 1A1の3'UTRに結合する可能性の高いmiR-29bとcyclin E1の3'UTRに結合する可能性の高いmiR-195に着目した。しかしながら、これらのマイクロRNAの肝臓での機能は全く不明であった。そこで、我々は、これらのマイクロRNAがcollagen 1A1やcyclin E1の発現制御に関与するかをルシフェラーゼアッセイにより調べた。結果として、miR-29bがcollagen 1A1の3'UTRに結合し、miR-195がcyclin E1の3'UTRに結合することが示唆された。miR-29bとmiR-195のprecursorの細胞導入実験では、miR-29bを導入した場合、I型コラーゲンの発現が遺伝子およびタンパク質レベルで抑制された。miR-195を導入した場合、cyclin Eの発現が遺伝子およびタンパク質レベルで抑制され、増殖が抑制された。このことから、miR-29bが特に星細胞におけるコラーゲン産

生に深く関与し、miR-195が肝星細胞の増殖に関与するマイクロRNAであることが我々の研究によりわかった。そして、このマイクロRNAはインターフェロンによって誘導されることから、現在、その分子機構の解明とmiR-29bを星細胞で高発現することによる肝線維症治療を目的とした研究を進めている。

E. 結論

これまでに、星細胞の増殖や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、星細胞の増殖や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、in vivoにおけるマイクロ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. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-β-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol.* 2010, in press.
2. Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habu D, Shiomi S, Kawada N. Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy. *Hepatol Res.* 2010;40(9):853-61.
3. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, and Kawada N. A human-type non-alcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *Am J Pathol.* 2010;177(1):153-65.
4. Mu YP, Ogawa T, and Kawada N. Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. *Laboratory Investigation* 2010;90(2):245-56.
5. 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;391(1):316-21.

学会発表

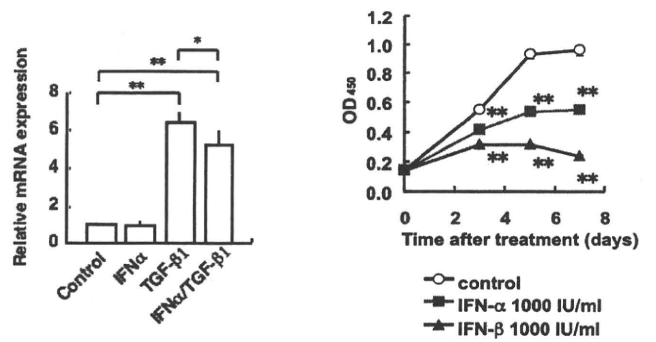
1. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、吉里勝利、池田一雄、河田則文・Type I interferon inhibits hepatic stellate cell proliferation via downregulation of cyclin E1 by microRNA-195 • 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (2010)
2. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、吉里勝利、池田一雄、河田則文・星細胞活性化に関するマイクロRNAについての検討・第6回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (2010)
3. 飯塚昌司、小川智弘、関谷由美子、吉里勝利、池田一雄、河田則文・マイクロRNAによる肝星細胞のI型コラーゲン発現制御・第46回日本肝臓学会総会 (2010)
4. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、吉里勝利、池田一雄、河田則文・I型インターフェロンのマイクロRNA発現調節を介した肝星細胞増殖抑制作用・第46回日本肝臓学会総会 (2010)
5. 小川智弘、飯塚昌司、関谷由美子、吉里勝利、池田一雄、河田則文・MICRORNA-29B SUPPRESSES TYPE I COLLAGEN AND SP1 EXPRESSION IN INTERFERON-TREATED STELLATE CELLS • 45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (2010)

G.知的財産権の出願・登録状況

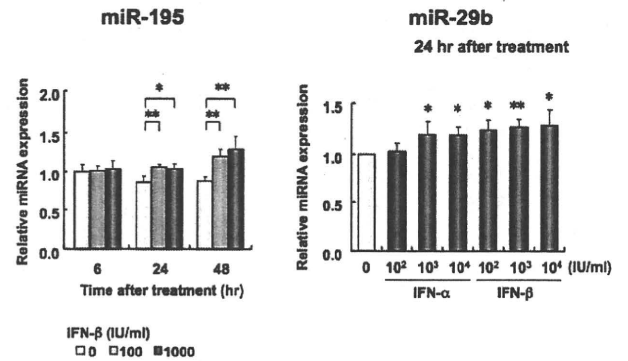
特許出願

1. 脂肪組織画像表示装置：堀中博道、松中敏行、森川浩安、小川智弘 (特願 2010-080293)
2. 肝線維症の存在及び/又は肝線維症の重症度の判定方法、判定マーカー、判定用キット、肝線維症の治療の効果予測方法、効果予測マーカー、並びに効果予測用キット河田則文、榎本大、小川智弘 (特願 2010-281254)

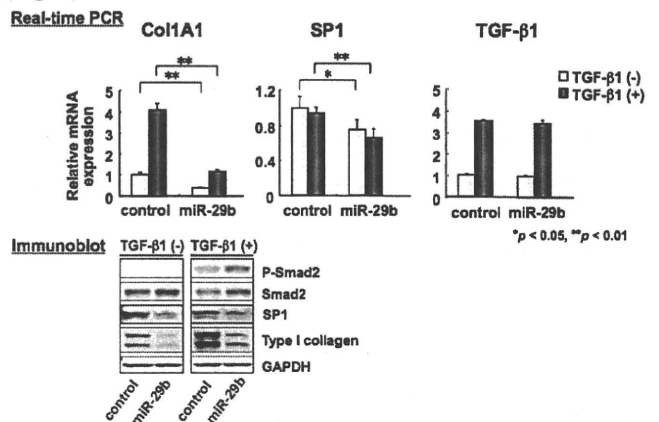
(Fig. 1)



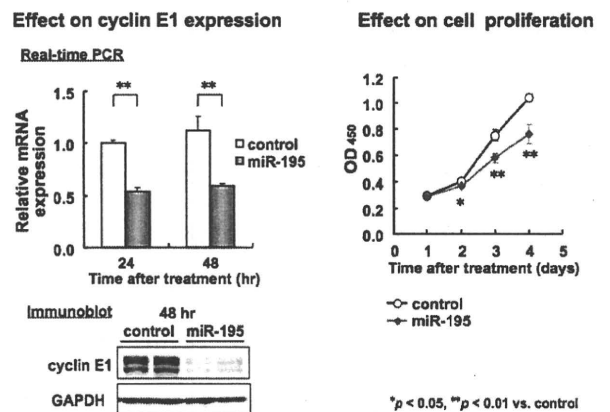
(Fig. 2)



(Fig. 3)



(Fig. 4)



*p < 0.05, **p < 0.01 vs. control

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（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。しかしウイルス排除後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。一方、近年、非B非C型肝発癌の増加が指摘されており、今後の肝疾患領域の課題として注目されている。本年度の研究ではSVR肝発癌の特徴を明らかとするため非B非C型肝発癌とSVR肝発癌の臨床的特徴について回顧的に解析した。その結果、SVR肝発癌の一部では、非B非C型肝発癌と共通点の特徴を有していることが明らかとなった。SVR肝発癌は、HCV肝発癌とは異なる病態にて発生する可能性を示唆するものであり、今後のSVR症例への発癌対策を検討する上で示唆に富む結果と考えられた。

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（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、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。現在の標準治療であるPeg-IFNとリバビリン（RBV）併用療法では慢性肝炎患者の約半数がSVRと成りうるが、SVR症例をどのように観察するべきかは一定の見解はない。一方、近年非B非C型肝発癌の増加が指摘されており、今後の肝疾患領域の課題として注目されている。本年度の研究ではSVR肝発癌の特徴を明らかとするため非B非C型肝発癌とSVR肝発癌の臨床的特徴について回顧的に解析した。

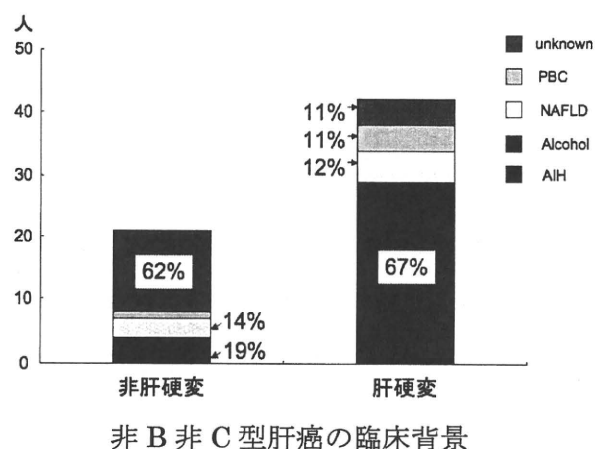
B. 研究方法

2006年1月以降当院にて初めて診断された非B非C型肝発癌63例（HBs抗原陰性かつHCV抗体陰性）を対象とした。

比較するSVR肝発癌として抗ウイルス治療終了後、4年以上経過して診断された15例を対象とした。

C. 研究結果

非B非C型肝発癌；平均年齢70（45-87）性別は（女11、男52）肝硬変例42例あり、背景肝疾患の主な因はアルコール性肝障害32例、非アルコール性脂肪肝関連8例、PBC5例、AIH1例、17名が不明。BMI24.1（17.3-34.1）、HBc抗体陽性例24例、AFP100ng/ml以上9例、PIVKA-II200



別や腫瘍マーカーの上昇パターンなど類似点を認めた。すなわち SVR 肝癌には非 B 非 C 型肝癌と区別できない症例が含まれているものと推測された。

E. 結論

非 B 非 C 型肝癌ではアルコール性肝障害を背景とする症例が多く、PIVKA-II 高値を示す例が多かった。SVR 肝癌は非硬変非 B 非 C 型肝癌と類似点を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Investigation of Interferon- α Response by a Single Amino Acid Substitution of Nonstructural Protein 5A in Hepatitis C Virus Infected Patients. Noguchi N, Tamori A, Ogura N, Hori Y, Ikeda S, Nishiguchi S. J Interferon Cytokine Res. 2011 in press
- Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M. J Med Virol. 2011 83: 871-878.
- Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. J Med Virol. 2011 83: 445-52.
- Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients

mAU/ml 以上 40 例, 平均腫瘍径 42 mm (10-155), であった。

SVR 肝癌はすべて非硬変肝に発生したため、非硬変肝に発生した非 B 非 C 型肝癌 21 例と SVR 肝癌を比較した。

両群の比較：

SVR 肝癌；IFN 終了後の平均期間 116 ヶ月 (48-186)。平均年齢 68 (55-76) 性別は(女 2、男 13) HBc 抗体陽性例 9 例, AFP 100ng/ml 以上 4 例, PIVKA-II 200mAU/ml 以上 7 例, 平均腫瘍径 31mm (17-55), 背景肝に脂肪沈着症例 2 例、鉄沈着例 1 例、正常肝 1 例。

非 B 非 C 型肝癌；平均年齢 75 (45-89) 性別は(女 3、男 18) HBc 抗体陽性例 9 例, AFP 100ng/ml 以上 2 例, PIVKA-II 200mAU/ml 以上 16 例, 平均腫瘍径 60mm (20-155), 背景肝疾患ではアルコール性肝障害 5 例、非アルコール性脂肪沈着 3 例、PBC 1 例、原因不明の慢性肝疾患 6 例、正常肝 3 例であった。

D. 考察

SVR 症例においてどの位の期間、感染していた HCV の影響が持続するのかは明らかではない。今回、非 B 非 C 型肝癌例と抗ウイルス治療終了後 4 年以上経て発癌した SVR 肝癌例を比較したが、性

with chronic hepatitis C. Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. J Gastroenterol. 2010 46: 350-8.

5. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). Izumi N, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Hepatol Res. 2010 40: 347-68

2. 学会発表

1. セロタイプ 2 型に対するペグインターフェロン・リバビリン療法の治療期間とSVR率。山口康德、田守昭博、藤井英樹、小林佐和子、岩井

秀司、森川浩安、榎本大、坂口浩樹、木岡清英、倉井修、岡博子、河田則文。肝臓 2010;51:Supp.1 Page A251

2. ペグインターフェロン・リバビリン療法無効・再燃例に対する治療の現状。田守昭博、林健博、藤井英樹、黒岡浩子、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、坂口浩樹、河田則文。日消誌 2010;107:Supp. Page A272
3. 非B非C型肝炎の特徴とSVR肝癌との類似点に関する解析。田守昭博、河田則文。肝臓 2010;51:Supp.2 Page A523

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特になし。

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

C型慢性肝炎において肝線維化・治療抵抗性に関係するmicroRNAの網羅的解析

研究分担者 榎本大 大阪市立大学准教授

研究要旨：昨年度までのマイクロアレイによる研究で、C型慢性肝炎患者の肝組織において肝線維化進行例（F3/F4）では7種のmicroRNA発現が有意に低下（fold change, $-1.69 \sim -1.20$ ）し、17種の発現が有意に亢進（fold change, $1.21 \sim 2.59$ ）していた。このうち、miR-222は定量的PCRでも肝線維化の進行とともに増加した（F1~F4, $1.0 < 1.8 < 2.2 < 2.7$; $p < 0.01$ ）。

そこで今年度は、主として動物モデルと、培養細胞における検討を行った。線維化を来たすTAAマウスの肝臓におけるmiR-222発現は対照に比べ、8週目に1.4倍に増加した（ $p < 0.01$ ）。マウス肝臓より分離・培養した活性化星細胞のmiR-222発現は、培養1日目に比べ7日目では13.9倍に増加した（ $p < 0.01$ ）。ヒト不死化星細胞LX-2におけるmiR-222発現は肝癌細胞HepG2に比べ6.0倍と高値であった。

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75%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。C型慢性肝炎では10~20年以上の経過で肝線維化が進展し、肝硬変を母地として肝癌が発生することが知られている。肝線維化は星細胞と筋線維芽細胞が関与するI型コラーゲンの蓄積症候であるが、その分子機構には不明な点が多く残されている。

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。

昨年度までのマイクロアレイによる研究で、C型慢性肝炎患者の肝組織において肝線維化進行例（F3/F4）では7種のmicroRNA発現が有意に低下（fold change, $-1.69 \sim -1.20$ ）し、17種の発現が有意に亢進（fold change, $1.21 \sim 2.59$ ）していた。このうち、miR-222は定量的PCRでも肝線維化の進行とともに増加した（F1~F4, $1.0 < 1.8 < 2.2 < 2.7$; $p < 0.01$ ）。

今年度は、(1)マウス肝線維化モデルにおいて、(2)初代培養マウス星細胞とヒト不死化星細胞LX-2において、定量的microRNA発現解析を行った。

B. 研究方法

1) チオアセトアミド（TAA、Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO、USA）を体重20gあたり4mg、週3回投与したマウス（C57BL/6、雄）肝線維化モデルにおけるmicroRNA発現について、TaqMan® MicroRNA Assay（Applied Biosystems）と Applied Biosystems 7500 リアルタイムPCRシステムを用