

いて定量的解析を行った。

- 2) マウス (C57BL/6、雄) の肝臓から分離した初代培養星細胞における microRNA 発現をリアルタイム PCR により定量した。またヒト不死化星細胞 LX-2 (Gut 2005; 54: 142-51. Dr. Scott Friedman より提供)、マウス線維芽細胞 NIH3T3、ヒト肝癌細胞 Huh7、ヒト肝癌細胞 HepG2 における microRNA 発現をリアルタイム PCR により定量した。

### C. 研究結果

- 1) TAAを投与したマウスの肝臓では、miR-222の発現がコントロールに比べ、投与8週目に1.4倍にまで有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (図1)。
- 2) 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日目に比べて、培養4日目には4.1倍、培養7日目には13.9倍にまで有意に増加した ( $p < 0.01$ )。また、miR-222とクラスターを形成するmiR-221の発現は、培養4日目には6.1倍、培養7日目には26.8倍にまで有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (図2)。

ヒト不死化星細胞LX-2におけるmiR-222の発現はヒト肝癌細胞HepG2に比べて6.0倍、miR-221の発現は9.5倍と高値であった ( $p < 0.01$ ) (図3)。

### 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。

本研究により、ある種の microRNA が肝線維化診断マーカーとしての使用できる可能性が示唆された。特に

miR-222 と、それとクラスターを形成する miR-221 については、動物モデルにおいても、培養細胞においても有意な結果が得られた。miR-222 と miR-221 は Huh7 や HepG2 などの肝癌細胞でも発現していると報告されているが、それらの細胞に比べヒト不死化星細胞では更に高発現していることが判明した。miR-222 の標的遺伝子のひとつとして cyclin-dependent kinase inhibitor 1B ( $p27^{kip1}$ ) が挙げられ、miR-222 の増減は細胞周期を調節することによって星細胞の増殖に影響を与える可能性が考えられる。

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、microRNA に作用し得る低分子物質のスクリーニングを行ない、究極的には新たな治療薬の開発に繋がる可能性がある。近年、患者の高齢化が進む中、副作用の問題から IFN などの抗ウイルス治療が使用出来ない症例が増えている。安全で長期間服用可能な肝線維症予防薬の開発は、このような社会的なニーズにも貢献出来ることが期待される。

MicroRNA は 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も考えられる。C 型慢性肝炎に対する抗ウイルス剤としては、今秋にプロテアーゼ阻害剤が承認される予定である。ところがプロテアーゼ阻害剤の単剤使用では早期に薬剤耐性が出現することが判明しており、当面これらの薬剤は IFN・リバビリンと併用で使用される予定である。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。

### 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。特に miR-222 については肝線維化診断マーカーとしての有用性が示唆された。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、新たな治療薬の開発など治療成績の向上や、検査薬開発とそ

## F. 研究発表

### 論文発表

1. 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.
2. HBV関連クリオグロブリン血症における抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体の意義(原著論文). 榎本大, 根来伸夫, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文. 肝臓 51巻8号 Page454-456(2010.08)
3. 核酸アナログ/IFN sequential治療の有用性とその限界(解説/特集). 榎本大, 田守昭博, 西口修平, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌52巻1号 Page 115-119(2011.01)

### 学会発表

1. 第96回日本消化器病学会総会シンポジウム3「B型肝炎治療の最新戦略」HBeAg陽性B型肝炎に対する核酸誘導体/IFN sequential療法の有用性とその限界(会議録). 榎本大, 西口修平, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌 107 巻臨増総会 PageA86 (2010.03)
2. 18<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW). Sequential therapy with nucleoside analogues and interferon for Japanese patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. Enomoto M, Tamori A, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Kim SR, Enomoto H, Imanishi H, Nishiguchi S, Kawada N.

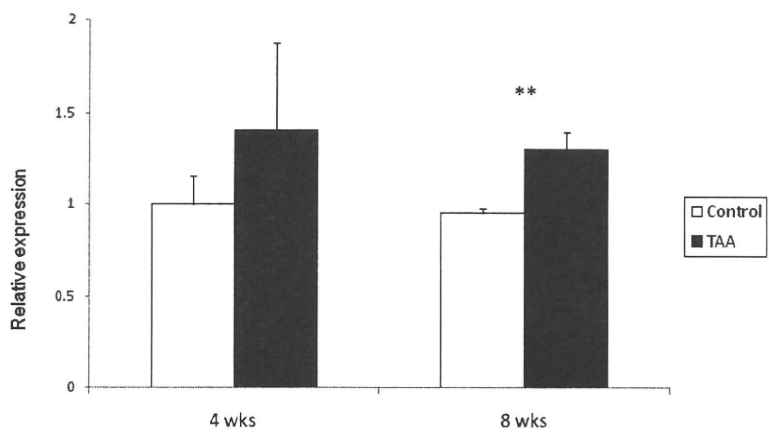


図1. TAAマウス肝臓におけるmiR-222発現の変化

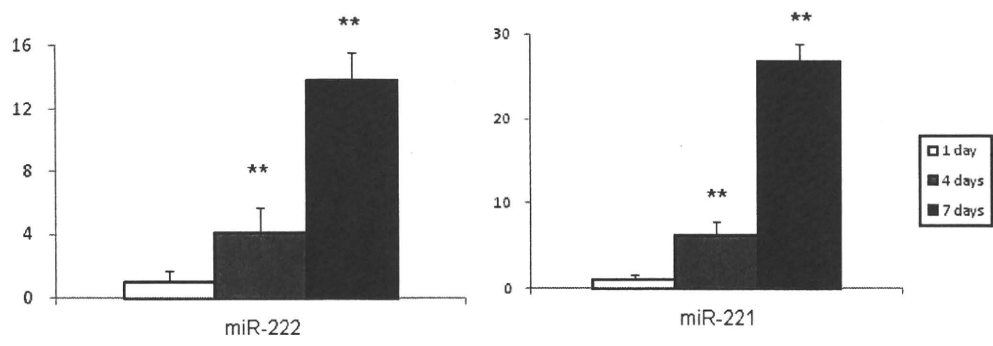


図2. 初代培養マウス星細胞におけるmiR-222、miR-221発現の変化

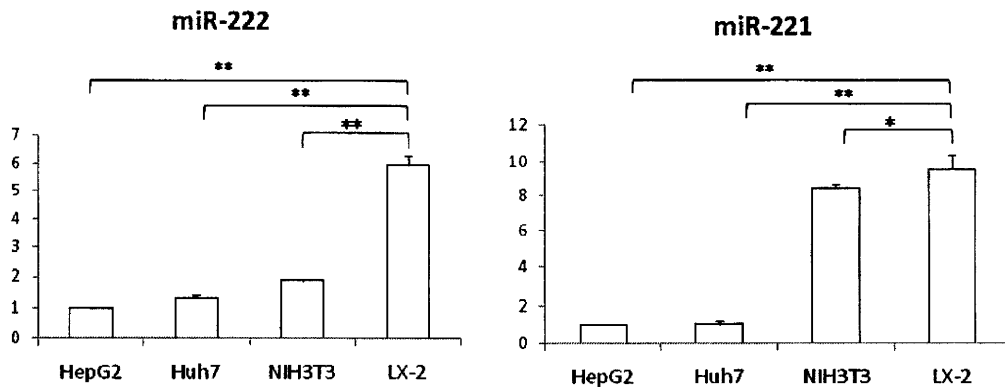


図 3. ヒト星細胞 LX-2、ヒト肝癌細胞 Huh7、HepG2、マウス線維芽細胞 NIH3T3 における miR-222、miR-221 の発現

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

インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用に関する研究

研究分担者 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ても、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）に着目し、I型IFNの直接的な作用について *in vitro* 培養ヒトHSCを用いて網羅的遺伝子発現解析法にて検討した。その結果、miRNAに関しては、今回行った条件では顕著な変化が認められなかった。一方、mRNAについては、肝細胞癌株との比較において、HSCに対して、より特異的にIFN-βがIFN-αよりもダイナミックにmRNAの発現変動を引き起こすことが明らかとなった。その発現変動遺伝子群には細胞周期関連およびアポトーシス関連遺伝子群が含まれ、同様な変動はペグ化したIFN-αとIFN-βの比較でも認められた。これらの結果は、以前示したIFN-βがIFN-αよりも細胞増殖・細胞周期抑制作用の効力が高いことと関連づけられると考えられた。更に抗線維化作用に共通の機序が存在するか、肺線維症治療薬であるPirfenidoneによるヒトHSCにおけるmRNA発現変動を同様に解析したが、顕著な変化は観察されなかった。

一方、*in vivo* レベルでチオアセタミド（TAA）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、その他のMMP群の発現を変化させることが確認された。これらの結果は、他の線維化モデルやヒトHSCでの検討結果と一致するが、一部異なる点が見られ、IFNがHSC以外の細胞を標的にしている可能性が示唆された。今後、IFNや他の抗線維化作用を有する薬物の標的細胞とその作用機序を更に明確にすることで、新たな治療・予防方法の開発が期待される。

#### A. 研究目的

日本、中国等の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。現在C型肝炎やC型代償性肝硬変の治療に用いられる、I型インターフェロン（IFN）は、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きた。

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、その分子基盤をもとに新たな肝線維化治療・予防薬や手法の開発を目指すことを目的とした。

#### B. 研究方法

ヒト培養HSC株であるTWNT4細胞(岡山大・小林より譲受)をI型IFNであるIFN-α, IFN-β

あるいは Pirfenidone で処理して、細胞から抽出した total RNA を材料とし microRNA (miRNA) または mRNA の発現変動をそれぞれ 3D-gene™ Human miRNA oligo chip または Human Oligo chip 25k (東レ)を用いて、網羅的にスクリーニング・解析した。IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  の mRNA 発現への影響に関しては、同時に対照として、ヒト肝細胞癌由来細胞株の Huh-7 を同様に処理し、網羅的解析を行った。

TAA 誘発肝炎モデルは常法に準じて作製し、マウス IFN- $\beta$ (3000, 30000 U/匹)を皮下投与し、対照溶媒投与群との比較で肝臓における種々遺伝子の発現を定量 PCR 法または 3D-gene™ Mouse Oligo chip 24k (東レ)を用いて解析した。

なお動物実験は、東レ株式会社研究本部動物実験指針を遵守し実施した。

## C. 研究結果

### 1. I型 IFN 処置ヒト HSC 細胞株における miRNA 発現の網羅的解析

IFN- $\alpha$  または IFN- $\beta$  処置ヒト HSC 細胞株 TWNT-4 における網羅的 miRNA および mRNA アレイ解析を行った。

その結果、定常状態で発現の高い miRNA に関しては、IFN 処理によって顕著な発現量変化は検出されず、IFN- $\alpha$  と IFN- $\beta$  との差も認められなかった(図 1)。定常状態で低発現の miRNA に関しては、IFN 処理によって発現量が 2 倍以上あるいは 1/2 以下に変動しているものが見られたが、定量 PCR による確認実験で再現性が認められなかった。

### 2. I型 IFN 処置ヒト HSC 細胞株における mRNA 発現の網羅的解析

mRNA 解析では、Global Normalization 値を散

布図としてプロットしたところ、肝癌由来 Huh-7 の散布図は IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  ともに発現誘導遺伝子が多数確認される、同じようなプロット形状を示したのに対し、HSC 細胞株 TWNT-4 では、IFN- $\alpha$  と比較して IFN- $\beta$  処置による遺伝子発現変動がダイナミックであることが明らかとなった(図 2)。同様の作用はペグ化された IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  処置でも観察された(data not shown)。

続いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA : Broad Institute) により、機能遺伝子解析を行った結果、TWNT-4 に対する IFN- $\beta$  処置で IFN- $\alpha$  よりも有意に変動する遺伝子群として、アポトーシス関連遺伝子群を同定した。更に前年度、I 型 IFN 処置により遺伝子およびたん白質レベルでの発現増強を認めた p21 を含む、細胞周期関連遺伝子に注目して解析を行ったところ、IFN- $\beta$  処置で IFN- $\alpha$  処置よりも変動が顕著な遺伝子として、p21, p19, IRF-1, Cyclin E1 の 4 遺伝子が同定された(図 3)。

### 3. 線維化抑制薬 Pirfenidone 処置ヒト HSC 細胞株における mRNA 発現解析

線維化抑制作用が既に知られ、肺線維症治療薬として承認・販売されている Pirfenidone を処置したヒト HSC 細胞株の網羅的 mRNA アレイ解析を行ったが、今回検討した条件では顕著な発現変動は認められなかった(data not shown)。

### 4. TAA 誘発肝炎モデルにおける IFN- $\beta$ 処置肝臓の mRNA 発現の解析

TAA 誘発マウス肝炎モデルの肝臓組織におけるマウス IFN- $\beta$  投与による mRNA 発現変動解析を行った。肝臓中の COL1a2 遺伝子、 $\alpha$ -SMA 遺伝子およびマウスにおける I 型コラーゲン分解酵素である MMP-13 の遺伝子発現を定量 PCR により

測定した結果、IFN- $\beta$  投与群は、対照群に比較して、COL1a2 および $\alpha$ -SMA 遺伝子が用量に依存して発現が減少する傾向を示し、MMP-13 遺伝子は有意な発現増加が認められた (図 4)。

網羅的解析では、既に前年度、ヒト HSC 株の IFN- $\beta$  処置によって、遺伝子とたん白質レベルで発現増強を認めた、コラーゲン分解酵素の Matrix metalloproteinase (MMP)-1 関連遺伝子にフォーカスして解析を行ったところ、IFN- $\beta$  投与により MMP-13 に加え、MMP-3 遺伝子の発現増加が確認された。また、MMP-2, MMP-12, MMP-14, TIMP-2, Prtn3 については、TAA 誘発で遺伝子発現が増加するが、IFN- $\beta$  投与によりその発現増加が抑制されていることが明らかとなった (図 5)。

#### D. 考察

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 が直接的に作用し遺伝子発現変化を引き起こすことが確認され、しかも I 型 IFN の中で IFN- $\beta$  が IFN- $\alpha$  よりも HSC への反応性が高く、アポトーシス関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現を変動させることにより、その細胞の増殖や生存維持に関与している可能性が示された。

線維化抑制作用をもつ Pirfenidone も IFN と同じく作用機序は明確になっていないが、炎症性サイトカインの産生抑制等の複合的な作用によるものと現時点では考えられている。今回の遺伝子発現に関する検討では、残念ながら IFN と共通の作用機序を見出すには至らなかった。今後メインの標的細胞が異なる可能性も含めて継続して検討を行っていく予定である。

これまでに *in vivo* 肝線維化病態モデルにおける I

型 IFN の線維化抑制作用は幾つかの種類の動物モデルで明らかにされている。今回用いた TAA モデルは線維化が進行していない、炎症誘発の初期線維化モデルとして考えられるが、既知の報告同様に IFN 投与によって、肝線維化マーカー遺伝子の発現抑制が確認された。また、ヒト HSC に直接 IFN を作用させたときの結果と比べ、変動する MMP 関連遺伝子は多く、また増減も大きいように見えることから、動物個体レベルでは IFN が HSC 以外の細胞に作用している可能性が考えられた。今回得られた IFN 投与による MMP 関連遺伝子の発現変化が実際にどのような生理学的意義をもつのか非常に興味深い。これまで一方向性と考えられてきた線維化の進行がリバーシブル、すなわち、線維が分解・融解される可能性が近年示唆されており、経時的な変化を含む、これら蛋白分解酵素群に関する詳細な解析を今後行う必要がある。

#### E. 結論

以上、I 型 IFN である IFN- $\beta$  が IFN- $\alpha$  と比較し、HSC における遺伝子発現変化をダイナミックに引き起こすことが明らかになったことから、I 型 IFN の抗線維化作用における標的の一つは HSC であり、直接的抗線維化作用の分子機構の一部を解明したと言える。一方、マウス肝臓においても IFN- $\beta$  が抗線維化作用を示唆する遺伝子発現の変化を引き起こすことが明らかとなったが、HSC ではない標的の存在も示唆された。IFN の抗線維化メカニズムの分子基盤を他の抗線維化薬と共に更に検討を続けることで新たな肝線維化治療薬や予防薬、手法の開発の手がかりを得ることが期待される。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

木綿しのぶ, 鈴木知比古. IL-1 $\beta$  とその内在性アンタゴニスト IL-1Ra のバランスから考える I 型インターフェロンの作用の違い(The difference between Type I Interferons in the balance of IL-1 $\beta$  and IL-1Ra). 細胞 2010;42: 349-52.

### 2. 学会発表

木綿しのぶ, 倉橋香菜, 鈴木知比古. IL-1 $\beta$  と IL-1Ra レベルにおけるインターフェロン  $\beta$  およびインターフェロン  $\alpha$  の比較—インターフェロン (IFN) によるうつ発症頻度への考察—. 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会; 2009 年 11 月; 京都. 同合同学会プログラム・抄録集 p249 (2009 年)  
鈴木知比古, 西村和美, 下菌利恵子. 肝星細胞における I 型インターフェロンの抗線維化メカニズム解析. 第 23 回肝類洞壁細胞研究会学術集会; 2009 年 12 月; 大阪. 同学術集会プログラム・抄

録集 p52 (2009 年)

下菌利恵子, 西村和美, 鈴木知比古. 肝星細胞に対する IFN- $\beta$  抗線維化メカニズム解析. 第 46 回日本肝臓学会総会; 2010 年 5 月; 山形. 肝臓 51 巻 suppl(1) A127 (2010 年)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

「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」(特許公開番号 2010-227030 発明者: 鳥居裕一, 鈴木知比古, 下菌利恵子)。

「インターフェロン感受性又は応答性の予測方法」(特許出願番号 2010-083724 発明者: 鈴木知比古, 倉橋香菜, 木綿しのぶ)。

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

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型慢性肝炎における肝内マイクロ RNA 発現解析

分担研究者 村上善基 京都大学・ゲノム医学センター 産学官連携准教授

#### 研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。治療前の慢性C型肝炎患者肝組織中のマイクロRNA発現、マウス慢性肝障害モデルによる肝組織マイクロRNA発現解析を用いて肝線維化が進展する際のマイクロRNA発現変化を包括的に解析し、新規に肝線維化を治療への基盤を構築する。またこのRNA情報基盤を用いて肝線維化を定量化した、新規バイオマーカーの作成を試みる。

#### A. 研究目的

我が国のHCV感染者は約300万人と推定されている、HCVは感染すると高率に慢性化し年余をへて結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する事が知られている。肝の線維化は病期の進展に深く関係するだけでなく、線維化の程度は肝疾患の最終段階である肝細胞癌発生の素因となっている。特に肝硬変からの発癌は年率8%に上っている。本邦における慢性肝疾患の年間死亡者数は約3.4万人に至っている事から感染対策や、肝線維化の制御策は急務である。しかし現状では満足のいくHCV感染者に対する治療結果が得られていない。この原因としてウイルスの増殖メカニズムが十分に解明されていないことがある。また慢性肝炎において炎症を持続するメカニズム、線維化を進展するメカニズムを明らかにする事、または抗ウイルス剤に対する応答を規定する宿主、ウイルス側因

子それぞれを明らかにし、慢性肝疾患を制御方法の確立が必要である。我々は今までに慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌に至る慢性肝疾患のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。これらのデータを基盤として、本解析では(1)慢性C型肝炎の薬剤応答に関与するマイクロRNAを同定し、治療効果予測アルゴリズムの作成する事、(2)肝線維化の程度と相関するマイクロRNAを明らかにし、線維化進展に関係するマイクロRNA発現プロファイルの作成、(3)末梢血マイクロRNAを利用して、肝疾患の新たなバイオマーカーの作成、これらの解析を行い、包括的に慢性肝疾患を制御する治療方法、診断方法を開発する事を目標としている。

#### B. 研究方法

C型肝炎患者肝組織におけるマイクロRNA発現解析

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織99例よりからマイクロRNA発現プロファイルをマイクロアレイ解析にて治療効果別に作成した。

さらに今までに抗ウイルス療法を行っていない慢性C型肝炎患者105例よりマイクロRNA発現プロファイルをマイクロアレイ解析で取得した。

肝細胞癌に関係する末梢血マイクロRNA発現解析  
肝細胞癌患者22例の血清を肝細胞癌の治療前と治療後からそれぞれ採取した。末梢血より血清を分離しtotal RNAを抽出しリアルタイムPCR法にてマイクロRNAの発現を解析した。平行してがん組織標本においてマイクロRNAの発現をin situ hybridizationにて解析した。

#### (倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成18年、G-188「肝発癌に関与しているmiRNAをコードしている領域のSNP解析」承認]、平成19年、G-219「miRNA発現プロファイルを利用したC型肝炎ウイルス遺伝子型別治療法の新規開発」、組み換えDNA実験計画平成19年、070102「マイクロを用いたHCV複製制御の試み」について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成19-23)。

この中で肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に

申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人情報を適正に管理保存する。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」及び「大学等における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該所属機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後、実施している。

#### C. 結果

##### マイクロRNAによるC型肝炎治療効果予測

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果別のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。マイクロアレイ解析によりペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果を著効例(SVR)、再発例(R)、無効例(NR)の3群にわけ、それぞれマイクロRNA発現プロファイルを作成した。SVR、R、NRになるにつれ発現が有意に上昇しているマイクロRNAが20種、低下しているものが8種あった。NRとSVR症例で比較した場合3種のマイクロRNA(miR-27、miR-422b、miR-378)がSVRで発現が亢進しており、5種のマイクロRNA(miR-18a、miR-652、miR-34b、miR-143、miR-145)がNRで発現が亢進していた。

発現プロファイル結果をMonte Carlo Cross Validationを用いて治療効果をシミュレーションした。SVRとnon-SVRの予測は70.5%、RとNRの予測は70.0%と高い確率で行なう事が出来た。肝線維化の低いものと、そうでないものに分けてSVRとNRを分別したところその正確性は差がみられなかった。さらに治療効果別に発現に差が見られたマイクロRNAの標的遺伝子候補を数種同定した。

#### 肝線維化と関係するマイクロRNAの解析

慢性C型肝炎患者105例を用いて肝の線維化の軽度なものから順にF0:7例、F1:56例、F2:24例、F3:17例を解析しそれぞれにマイクロRNA発現プロファイルを作成した。これを用いて二群間分別を行なった所F0/F1 84.3%、F1/F2 82.7%、F2/F3 87.8%の確率で分別できた。また線維化の程度が進行するにつれて発現の亢進しているマイクロRNAは22種、低下しているマイクロRNAは16種であった。

ヒト肝組織のデータを検証するためにマウス慢性肝疾患モデルを用い線維化を四塩化炭素で誘導し線維化進展に関与しているマイクロRNAを解析した。対照としてオリーブオイルと投与し、組織学的に肝線維化を誘導していないマウスを用いた。ヒトとマウス共通して線維化のステージが進行するにつれて、発現が亢進するマイクロRNAを4種得た(miR-199a、miR-199a\*、miR-200a、miR-200b)。この4種のマイクロRNAはヒト肝星細胞株のLX-2に過剰発現した所、線維化に関係する遺伝子(procollagen  $\alpha$ 1、MMP13、TIMP1)の発現を亢進させた。ウイルス感染などで肝に炎症が起きると肝組織はTGF $\alpha$ を放出し肝星細胞は刺激を受け線維化が亢進するが、その際にもprocollagen  $\alpha$ 1、MMP13、TIMP1の発現は亢進したため、miR-199a、miR-199a\*、miR-200a、miR-200bの過剰発現は肝線維化を亢進するマイクロRNAであると考えられた。

#### 肝発癌と関係する末梢血マイクロRNAの解析

肝細胞癌22例の治療前後の血清より抽出したtotal RNAを用いて解析した所miR-92a/miR-638の比が癌のある場合には値が低く、癌の切除または

ラジオ波などで治療した後にはその値が亢進している事を明らかにした。外科的に切除したがん組織を用いてmiR-92aの発現をin situ hybridization法を用いて解析した所、miR-92aの発現は癌部で亢進していた。miR-92a/miR-638の発現比を肝細胞癌患者と慢性肝炎患者で比較すると、がん患者で発現比が低下していた。さらに肝癌細胞株にmiR-92aを過剰発現すると細胞株の増殖能が亢進し、miR-92aの機能を抑制すると細胞の増殖能は亢進しなかった。

#### D. 考察

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果に関係したマイクロRNAはプロファイル解析より治療効果予測を行う事ができる。またマイクロRNAの機能解析を行う事により従来の解析で明らかにならなかった生体の抗ウイルス作用のメカニズムにアプローチできる可能性があり、その事は新たな治療方法を作成する事ができる。またマイクロRNAはHCVの複製を制御する事を示した(Murakami Y et al. 2009. J. Hepatol)。この事はマイクロRNAそのものが抗ウイルス薬としてのポテンシャルが有る事を示しており、マイクロRNAはウイルス側、宿主側の両面からウイルス感染を制御する可能性がある。

線維化の程度別にマイクロRNA発現が異なり、in vitro解析で肝線維化の際に最も活動する肝星細胞の活性を増殖する事が明らかになった。慢性炎症とそれにより続発する肝線維化に対してマイクロRNAもこの一連の現象に関与しており、肝線維化そのものを制御する可能性をもっていると考えられる。

末梢血のマイクロ RNA は現在の所その存在意義は十分に明らかになっていないが、肝細胞癌と相関してその発現が変化している事がわかった。従来  
の腫瘍マーカーとの感度、特異性と比較する必要  
が有るが、新たなバイオマーカーとしての利用が  
期待される。

## E. 結論

慢性肝疾患の状態においてマイクロ RNA 発現プロ  
ファイルはそれぞれ固有のものをもっている事  
が明らかになった。この情報を利用した新たな診  
断ツールとして用いる事ができる可能性を示し  
た。患者別に治療効果、副作用回避を元に治療方  
法の選択ができ、テーラーメイド医療として期待  
される。また肝線維化や肝炎、肝発癌などのと  
きに見られる生体内の、またはウイルスの情報伝  
達をマイクロ RNA 発現が深く関与しているために、  
情報伝達経路を制御する新たな遺伝子治療の開  
発の布石となる事が期待される。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. 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.  
Dysregulation of IFN system can lead to poor  
response to pegylated interferon and ribavirin  
therapy in chronic hepatitis C. PLoS One. (in

press).

2. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M,  
Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya  
T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and  
200 families is associated with the  
progression of liver fibrosis. PLoS One. 2011  
Jan 24;6(1):e16081.

3. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K,  
Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic  
microRNA expression is associated with the  
response to interferon treatment of chronic  
hepatitis C. BMC Medical Genomics. 2010; 3: 48  
4. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa  
K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno  
K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23  
is critical in antiviral defense. PNAS 2010;  
107: 15856-61

5. 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. Deregulation of miR-92a  
expression is implicated in hepatocellular  
carcinoma development. Pathol Int. 2010; 60:  
351-357

6. 村上善基 マイクロ RNA の発現異常と肝発癌の  
関与 細胞 42 (6) 2010

### 2) 学会発表

1. 村上善基、Over expression of miR-199 and 200  
families is associated to the progression of  
liver fibrosis 第 69 回日本癌学会学術総会

平成 22 年 9 月 22 日 大阪市

2. 村上善基、インターフェロン関連遺伝子解析発  
現パターンを利用した慢性 C 型肝炎治療効果予測  
第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学  
会学術集会

平成 22 年 6 月 25 日 北九州市

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

##### 1. 特許取得

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. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 河田 則文

書籍 なし

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
<u>Kawada N.</u>	Evolution of hepatic fibrosis research.	Hepatol Res.	41	199-208	2011
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, <u>Kawada N</u>	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	J Cell Physiology		In press	
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, <u>Kawada N</u>	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun	391	316-21	2010
Ogawa T, <u>Kawada N</u> , Ikeda K	Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatol Int.		In press	

研究分担者 池田 一雄

書籍 なし

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
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, <u>Ikeda K</u> , <u>Kawada N</u>	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	Hepatol Res.		In press	
Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, <u>Ikeda K</u> , Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y	Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice.	Gastroenterology	137	1459-66	2009

研究分担者 小川 智弘

書籍 なし

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
Sekiya Y, <u>Ogawa T</u> , 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 Physiology		In press	
Enomoto M, Mori M, <u>Ogawa T</u> , Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habuda 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.	40	853-61	2010
<u>Ogawa T</u> , Fujii H, Yoshizato K, and Kawada N.	A human-type non-alcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits.	Am J Pathol	177	153-65	2010
Mu YP, <u>Ogawa T</u> , and Kawada N	Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet.	Laboratory Investigation	90	245-56	2010
<u>Ogawa T</u> , 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.	391	316-21	2010

研究分担者 田守 昭博

書籍 なし

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
-------	---------	------	----	-----	-----

Noguchi N, <u>Tamori A</u> , Ogura N, Hori Y, Ikeda S, Nishiguchi S.	Investigation of Interferon- $\alpha$ Response by a Single Amino Acid Substitution of Nonstructural Protein 5A in Hepatitis C Virus Infected Patients.	J Interferon Cytokine Res.		in press	2011
Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, <u>Tamori A</u> , 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.	Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C.	J Med Virol.	83	871-878	2011
Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, <u>Tamori A</u> , Nakagawa M, Izumi N.	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.	J Med Virol.	83	445-52	2011
Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, <u>Tamori A</u> , Sakaguchi H, Kawada N.	Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C.	J Gastroenterol.	46	350-358	2011
Izumi N, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, <u>Tamori A</u> , Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M.	Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009).	Hepatol Res.	40	347-368	2010

研究分担者 榎本 大

書籍 なし



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, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habuda 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.	40	853-61	2010
榎本大, 根来伸夫, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文	HBV 関連クリオグロブリン血症における抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体の意義	肝臓	51	454-456	2010
榎本大, 田守昭博, 西口修平, 河田則文	核酸アナログ /IFN sequential 治療の有用性とその限界	日本消化器病学会雑誌	52	115-119	2011

研究分担者 鈴木 知比古

書籍 なし

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
木綿しのぶ, 鈴木知比古	IL-18とその内在性アンタゴニストIL-1Ra のバランスから考える I 型インターフェロンの作用の違い(The difference between Type I Interferons in the balance of IL-18 and IL-1Ra).	細胞	42	349-52	2010

研究分担者 村上 善基

書籍 なし

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
-------	---------	------	----	-----	-----

Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and <u>Murakami Y</u>	Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.	PLoS One.		in press	
<u>Murakami Y</u> , Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K	Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis.	PLoS One.	6(1)	e16081	2011
<u>Murakami Y</u> , Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K	Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C.	BMC Medical Genomics.	3	48	2010
Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, <u>Murakami Y</u> , Shimotohno K	Polyubiquitination to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense.	PNAS	107	15856-61	2010
Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, <u>Murakami Y</u> , Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M	Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development.	Pathol Int.	60	351-357	2010
村上善基	マイクロRNAの発現異常と肝発癌の関与	細胞	42(6)	244-247	2010

## Review Article

# Evolution of hepatic fibrosis research

Norifumi Kawada

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

Molecular analysis of hepatic fibrogenesis has progressed with respect to both fibrosis progression and regression by using cell biological, molecular biological and (epi)genetic approaches. Recent researches have revealed sources of collagen-producing cells other than hepatic stellate cells in the liver, and the involvement of the innate immune system and oxidative stress in the fibrotic process has attracted new attention. Together with these advancements in basic knowledge on the cellular and molecular biology of hepatic fibrosis, clinical researches have linked the clarification of the relationship between progression of the fibrosis stage and therapeutic efficacy for chronic viral hepatitis and non-alcoholic

steatohepatitis and validation of the regression of advanced fibrosis, even cirrhosis, of appropriate therapies using modern medicines. Furthermore, non-invasive assessment of liver fibrosis using an ultrasound-based modality has become a focus in the clinical diagnosis of liver fibrosis instead of liver biopsy. Taken together, liver fibrosis research has been evolving both basically and clinically in the past three decades.

**Key words:** collagen, cytokine, growth factor, stellate cell, transient elastography

## INTRODUCTION

LIVER FIBROSIS HAS been investigated actively since hepatic stellate cells (HSC) were identified by Dr Scott Friedman in 1985<sup>1</sup> as the principal collagen producing cells in the liver. According to a PubMed search, 3304 related papers were published in 2009 and 15 377 have appeared in the past 5 years. In particular, the latest investigation on liver fibrosis introduced information on epithelial–mesenchymal transition, the innate immune response, and genetic and epigenetic mutations and single nucleotide polymorphisms (SNP) of genes, particularly for the analysis of human liver fibrosis.<sup>2</sup> Liver fibrosis research has gained global attention because of its close relationship with disease progression triggered by hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) infection, which leads to end-stage liver cirrhosis and ultimately to hepatocellular carcinoma (HCC).<sup>3</sup> Although the number of deaths from HCC has tended to gradually decrease, it still exceeds 30 000 cases in Japan and its incidence has been increasing in the

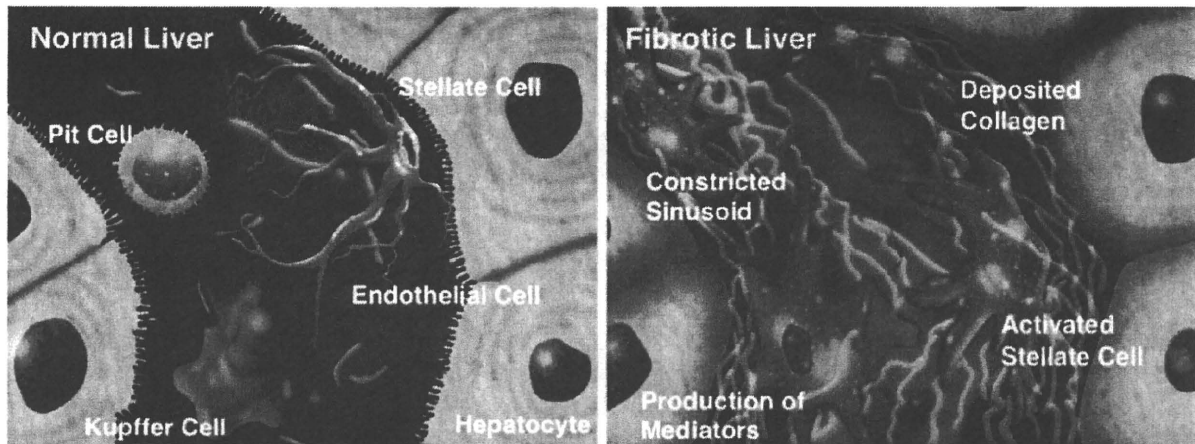
USA and Europe, presumably by the spread of HCV infection and the occurrence of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus, resulting in enthusiastic research on liver fibrosis as the origin of HCC development.<sup>4</sup> In particular, it is an urgent problem for future health care in Asia and Africa where a huge number of patients are infected with HCV and/or HBV. However, in spite of the progression of basic liver fibrosis research, effective medicines for liver fibrosis that can be applied in clinical practice have not yet been developed while the eradication of hepatitis viruses, in particular HCV, has greatly progressed.<sup>5</sup> In contrast, clinical diagnosis of the stage of liver fibrosis has evolved in the area of non-invasive assessment of liver fibrosis using serum markers and ultrasound-based technology instead of the “gold standard” liver biopsy. In this review, the recent evolution of hepatic fibrosis investigation will be discussed.

## Evolution of molecular analyses of liver fibrosis

Liver fibrosis is initiated by the accumulation of extracellular matrix materials (ECM), including type I collagen which are generated by activated HSC and hepatic myofibroblasts (MFB). Accordingly, their regulation of ECM production is logical with respect to developing therapeutic strategies for liver fibrosis.

Correspondence: Dr Norifumi Kawada, Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan. Email: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp

Received 1 December 2010; revision 20 December 2010; accepted 23 December 2010.



**Figure 1** Illustrative demonstration of normal and fibrotic liver. (Left) Hepatic sinusoid of intact liver is composed of endothelial cells with sieve plate, to which Kupffer cells (liver-specific macrophages) and pit cells (natural killer cells) adhere. Stellate cells with vitamin A-droplets in the space of Disse attach to both endothelial cells and hepatocytes with their cytoplasmic processes. (Right) In fibrotic liver, stellate cells become activated and secrete type I collagen that is deposited in the space of Disse and profibrogenic and inflammatory mediators. Activated stellate cells constrict sinusoids, leading to microcirculatory disturbance in advanced fibrosis and ultimately to portal hypertension.

Hepatic stellate cells, which are also called Ito cells, fat-storing cells, lipocytes or perisinusoidal cells, are located in the Disse space in the hepatic sinusoid, encapsulate sinusoidal endothelial cells with their well-developed dendritic processes on one side, and face hepatocytes on the other side.<sup>6</sup> The principal function of HSC is storing vitamin A in their cytoplasm; 50–80% of vitamin A in the body is accumulated in the liver and 90% is stored in HSC, which secrete retinol to portal blood flow when required. Because HSC function also as liver-specific pericytes, their contraction and relaxation in response to vasoactive substances, such as endothelin-1, nitric oxide and angiotensin-II, control the diameter of the sinusoidal lumen, resulting in regulation of the local microcirculation.<sup>7</sup> When liver injury takes place, HSC undergo activation and change their function and morphology to myofibroblast-like cells (Fig. 1).<sup>8</sup> Activated Kupffer cells, infiltrating circulating monocytes, activated and aggregated platelets, and damaged hepatocytes are sources of platelet-derived growth factor (PDGF) and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) that trigger the initiation of intracellular signaling cascades after their binding to cell surface receptors. Activated HSC lose vitamin A droplets and in contrast increase the expression of cytoskeletal proteins, such as desmin and  $\alpha$ -smooth muscle actin, which are associated with their augmented contractile activity, and generate ECM, including types I and III collagens.

Activation of HSC is controlled by transcription factors, such as activated protein-1 (AP-1), Jun D, Sp1, Krueppel-like factor 6 (KLF6) and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, leading to transcriptional upregulation of latent TGF- $\beta$ . In the process, intracellular signaling molecules, such as Smad, Ras, Raf-1 and mitogen-activated protein (MAP) kinase, play important roles.<sup>9</sup> In addition, augmented production of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP) hampers the degradation of ECM and conversely stimulates their accumulation in the inflamed liver. Involvement of leptin and other adipocytokines in the HSC activation process is also notable.<sup>10</sup> Activated HSC are characterized by an increased expression of receptors for PDGF, TGF- $\beta$ , vascular endothelial growth factor (VEGF), angiotensin-II, endothelin-1, and so on (Fig. 2).<sup>8,9</sup>

Although the involvement of HSC in the hepatic fibrotic process has been reported in a large number of publications since the 1980s, recent investigations have revealed the participation of mesenchymal cells originating from bone marrow using rodent models and human damaged livers.<sup>11</sup> Similarly, fibrocytes in the circulation and portal fibroblasts are acknowledged as fibrotic players.<sup>12,13</sup> Furthermore, epithelial–mesenchymal transition (EMT) may be involved in the fibrotic process in the liver as well as in the kidney and lung,<sup>14</sup> although there have been controversial discussions on this issue.<sup>15,16</sup>