

201030002B

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

# インターフェロンの抗肝線維化分子機構 の解明とその応用

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成23（2011）年 3月

I. 総合研究報告	
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、線維化における	
microRNAの関与についての検討	12
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	19
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線維化分子機構	
の解明とその応用に関する研究	31
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	41
村上 善基	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	59

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）

総合研究報告書

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

研究代表者 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）はB,C型肝炎ウイルス感染症に対する第一選択薬でありC型肝炎ウイルスの排除率は近年ジェノタイプ1b高ウイルス量の難治性群においても40-50%に到達するようになった。しかしながら、この数字から逆に言うと治療を受けた約半数の患者ではウイルスが排除できずに病態が進行することを意味する。しかしながらIFNにはウイルスが排除されなくとも線維化や発癌を抑制する効果が報告されている。従って、IFNの抗線維化作用を解明できれば、その情報を利用して、IFN治療が困難である高齢者や肝硬変患者における疾患進行を抑制できる可能性がある。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して、抗線維化に繋がる分子メカニズムを解明する必要がある。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）、これまでの研究手法ではその分子機構は未解明であった。MicroRNA（miR）はヒトゲノムから産生される遺伝子をコードしない、ノンコーディングRNAであり、種々の遺伝子発現を制御することで細胞の増殖、物質産生などに深く関与する。そこで、このmiRNAがIFNの抗線維化作用に関与する可能性を仮定して今回の研究を企画した。平成21年度までにHSC活性化に関与するmiRNA発現を網羅的に解析した後抽出し、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miRNA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、TGFβ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miR-92クラスターやmiR-195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miRNAの効果について in vivo解析した。

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miRNA（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検討した。また、この検討の過程で、miR-199、MiR-214、miR-222がヒトの肝線維化の病理学的分類と相関してヒト組織中で増加することを見出し、これらのmiRsの肝線維化バイオマーカーとしての有用性についても検討を行った。

研究分担者

池田一雄	名古屋市立大学大学院医学研究科機能解剖学	教授
小川智宏	大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学	研究員
田守昭博	大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学	准教授
榎本 大	大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学	准教授
鈴木知比古	東レ株式会社 医薬研究所 主任研究員	
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	

## A. 研究目的

2009年12月4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治療や核酸アナログ製剤を用いた治療の公的助成制度が始まり、また、肝炎医療の正しい知識の流布と肝炎治療を率先して行うための肝疾患連携拠点病院が全国に整備されてきた。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 $\beta$ 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)。miRNA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となってきた。研究開始当初HSC活性化に関与するmiRNA発現を網羅的に解析した後抽出し、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

マウスから初代培養星細胞を分離し、培養直後(静止期星細胞)と培養7日後(活性化星細胞)を作製した。それぞれの分画からtotal RNAを抽出後、Applied Biosystem社mirVana miRNA isolation kit、mirVana miRNA Array Systemと反応させ活性化により発現変動するmicroRNAを網羅的にスクリーニングした。一方、hMFBをIFN $\alpha/\beta$ 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した。抽出されたmicroRNAに関しては活性化に伴い、あるいは、IFN処理に伴う発現変動を定量的に解析するためにTaqMan MicroRNA Assayにて詳細に濃度・時間依存性を含め解析を行った。解析後重要と考えられる数個を選定し、hMFBに対してmicroRNAの強制発現を行った。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した。あるいは、microRNAのプレカーサーやmicroRNAインヒビターを用いてmicroRNAをそれぞれ過剰発現あるいは阻害して、MicroRNAの発現変動による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により解析した。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った。

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た。得られた情報から線維化進行群の効果改善方策を立案した。

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collagen 1 $\alpha$ 1, Sp1, E2F1, cyclin E1など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。

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。

平成22年度からは京都大学大学院医学研究科附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に分担研究者として参画いただき、microRNAの血清中肝線維化マーカーとしての有用性についての検討を共同で開始した。

### C. 研究結果

#### (I) 星細胞の活性化と伴に変動するmicroRNAの同定

マウスから星細胞を分離して培養し、静止期星細胞と活性化星細胞をそれぞれ作製した。Total RNAを用いて238個のmicroRNAを検出できるarray (サンガー研究所に登録済み) により、マウス星細胞の活性化とともに発現変動するmicroRNAを網羅的解析した。その結果、星細胞活性化と伴に発現上昇する8 microRNA (miR-23b, 34c, 125b, 210, 214, 218, 221, 222) と、発現低下する9 microRNA (miR-p2, 143, 195など) を同定した (池田)。

#### (II) Human MFBのIFN $\alpha$ に対する反応性。

培養したヒト筋線維芽細胞 (human myofibroblast, hMFB) に天然型IFN  $\alpha$  を添加するとIFNの濃度依存的に細胞のDNA合成 (thymidine取り込み) が低下した。この反応は増殖因子であるplatelet-derived growth factor (PDGF) の存在下においても同様に観察できた。このメカニズムを調べるためにhMFBの細胞周期に関連する蛋白質であるcyclin D1、各種cyclin-dependent kinase-2, 4, 6, p21, p27, p53の発現、さらにはPDGF刺激下におけるMEK, MAPK, AKTのリン酸化を検討したがいずれも変動はなくIFN  $\alpha$  がどのレベルでhMFBの増殖を抑制するのか明らかにできなかった。一方、IFN  $\alpha$  の効果は増殖抑制ではなく細胞死を誘導する可能性も否定できなかったため、IFN  $\alpha$  及びtumor necrosis factor  $\alpha$

(TNF $\alpha$ )により細胞死を観察したところ、IFN $\alpha$ のみではアポトーシス誘導は見られなかったが、TNF $\alpha$ との共存下でhMFB数が激減することを見出した。この反応はIFN $\alpha$ とTNF $\alpha$ により細胞表面にAnnexin Vが表出する結果であることをFACS解析により確認した(河田、小川、池田)。以上の結果から、IFN $\alpha$ によるhMFBの増殖抑制は既存の細胞周期に対する阻害ではなく、現在は不明の細胞死誘導による可能性が示唆されたため、このメカニズムを解明するためにmicroRNAに着目した。

### (III) IFNの抗線維化作用の検討(鈴木)

I型IFN(IFN $\beta$ >IFN $\alpha$ )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- $\beta$ 抑制等の多様な効果をもたらすことを示した。

上記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 $\beta$ で誘導されることを明らかにした。

肝細胞癌株との比較で肝星細胞により特異的にIFN $\beta$ がIFN $\alpha$ 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 $\alpha$ やインターフェロン $\beta$ でも同様の傾向があることを明らかにした。

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。

チオアセタミド誘発マウス肝炎モデルにおいて、IFN $\beta$ 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、線維性コラー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。

(IV) IFNによる直接的肝星細胞機能制御抑のメカニズム解明:

(a) IFNとmiR-195について: 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。前述した様にmiR-195は星細胞の活性化と伴に発現低下するため、星細胞を静止期に留めて置くための制御因子である可能性がある。初代培養マウス星細胞を用いた検討の結果、miR-195は星細胞の活性化とともに経時的に低下することが再確認された。miR-195は各種腫瘍細胞では発現低下しており、その強制的過剰発現が癌細胞の増殖を抑制することが報告されていたので、IFNによる星細胞の増殖抑制効果はmiR-195を介するのではないかと推測した。事実IFN、特にIFN $\beta$ 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cell cycle遅延が誘導されることによることが示唆された。miR-195発現はIFNにより約1.5倍増加した。IFN $\beta$ の効果はmiR-195 precursorにより模倣され、LX-2細胞の増殖は抑制され、cyclin E1の発現低下とp21の発現が誘導された。事実、miR-195はcyclin E1の3'-UTR領域に結合できることがルシフェラーゼリポーターベクターを用いたアッセイで確認された。さらにIFN $\beta$ の星細胞への効果はmiR-195のインヒビターでキャンセルされることも判明した(河田、小川、池田)。

以上のことから、IFNによる星細胞増殖抑制効果の少なくとも一部はIFNによって誘導されるmiR-19

5を介することが示唆された。

(b) IFNによるコラーゲン産生抑制に関する検討：  
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。一方、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I型コラーゲン $\alpha$ 1鎖(Coll1a1)、I型コラーゲン $\alpha$ 2鎖(Coll1a2)およびSp1、miR-143はColl1a1およびSmad3、また、miR-218はColl1a1、Sp1およびSox3の3' UTRに予想結合領域が認められた。解析の結果、IFN添加により濃度依存的に、あるいは時間依存的にmiR-29bが誘導されることが判明した。ルシフェラーゼリポーターベクターを用いたマイクロRNAの結合実験では、miR-29bがcollagen 1A1とcollagen遺伝子の転写調節因子の一つである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-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。また、miR-29b処置はSP1蛋白の発現を有意に低下させたため、SP1の翻訳を抑制している可能性も示唆された(河田、小川、池田)。

#### (V) 星細胞活性化とmiR-92クラスター

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、その中で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。

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(池田)。

#### (VI) ヒト肝組織を用いた病態解析

(a) 肝臓の線維化進展とmicroRNA：遺伝子型1bのC型慢性肝炎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(榎本)。

#### (b) IFN反応性とmicroRNA

C型慢性肝炎における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(榎本)。

#### (VII) 線維化マーカーとしてのmicroRNA

##### (a) 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。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。S



VR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。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(村上)。

#### (b) 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例を用いて線維化の程度別に肝組織中マイクロRNA発現プロファイルを作成した。その結果線維化の程度に応じて発現の変化するマイクロRNAを数種同定した。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て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。

またF0/F1、F1/F2、F2/F3それぞれの肝線維化ステージをleave one out cross-validationを用いて分別すると80%以上の確率でそれぞれを識別する事ができた(村上)。

#### (c) 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(村上)。

#### (VII) 肝発癌とIFN (田守)

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。

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。

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。

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。

#### 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

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

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

Prospective study of reactivation of hepatitis B virus in patients with rheumatoid arthritis who received immunosuppressive therapy: evaluation of both HBsAg-positive and HBsAg-negative cohorts. Tamori A, Koike T, Goto H, Wakitani S, Tada M, Morikawa H, Enomoto M, Inaba M, Nakatani T, Hino M, Kawada N. J Gastroenterol. 2011;46:556-64.

Down-regulation of cyclin E1 expression by mi

croRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. J Cell Physiol. 2010, in press.

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.

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. 2011;46:350-8.

A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. Am J Pathol. 2010;177:153-65.

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;39:1008-15.

Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Rev Recent Clin Trials. 2009;4:179-84.

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;9

0:245-56.

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.

Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus. T

amori 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.

Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. *Hepatol Int.* 2009;3:378-83.

Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. *Hepatol Int.* 2009, in press.

Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus. Tamori A, Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N. *J Med Virol.* 2009;81:1009-14.

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.

G. 知的所得権の取得状況

特許取得

「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)

実用新案登録

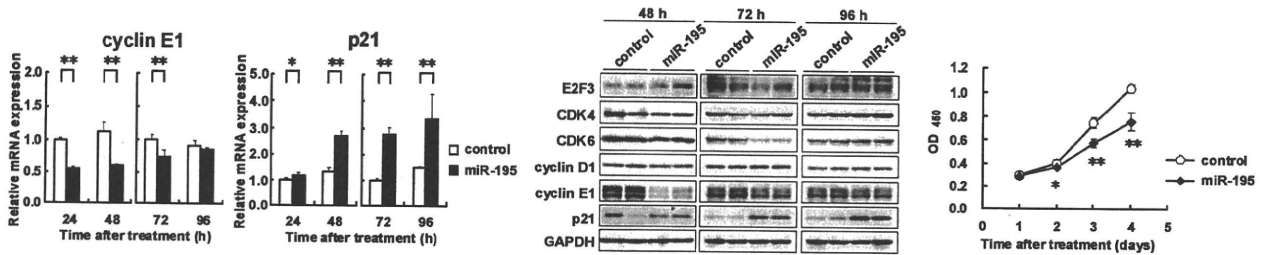
なし。

その他

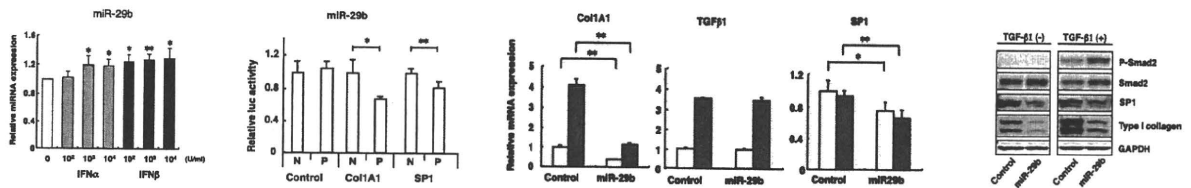
なし。

### 3年間の研究成果の概要図

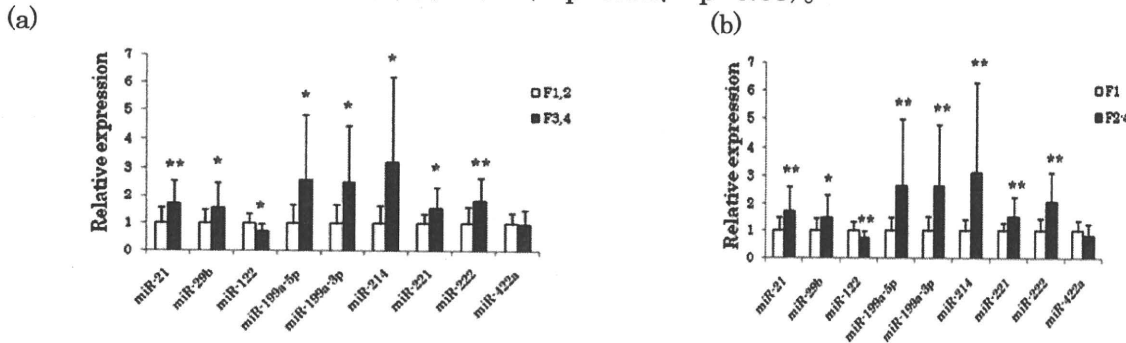
(1) IFN はヒト星細胞株 (LX-2) の増殖 (細胞周期進行) を抑制する。そのメカニズムを解析したところ IFN 処理により LX-2 細胞内の miR-195 が上昇することが判明した。miR-195 は IFN による p21 の発現増加と cyclin E1 の発現減少に特異的に寄与することが明らかとなった。



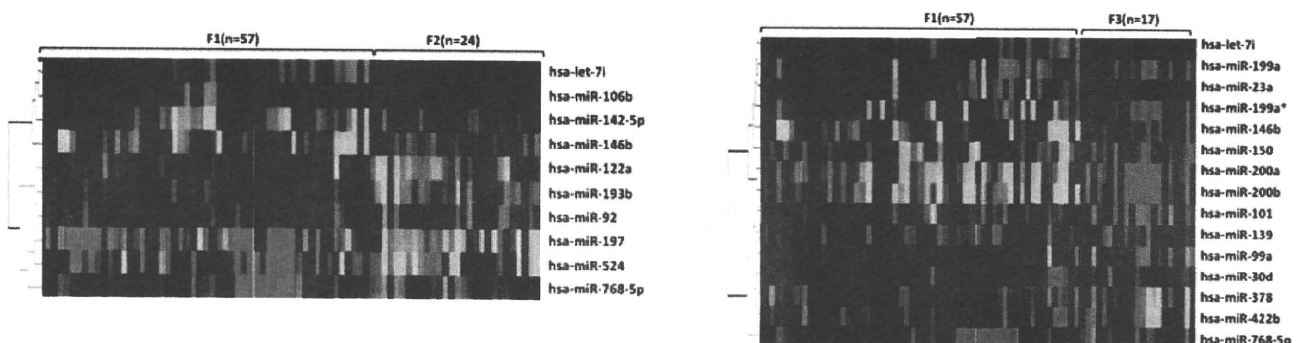
(2) LX-2 細胞を IFN で処理すると miR-29b 発現レベルが増加した。レポーターアッセイでは、miR-29b が *coll1a1* と *Sp1* の 3' UTR に結合することが確認された。miR-29b の precursor を細胞導入した結果、miR-29b の導入で I 型コラーゲンと *Sp1* の発現が遺伝子およびタンパク質レベルで抑制されることが判明した。



(3) ヒト軽度線維化群と高度線維化群における miR 発現の比較。(a) miR-222 の発現は F1 に比べ、F2 以上の線維化ステージ群 (F2-4) と比較して有意に高かった (\*\* $p < 0.01$ )。同様の結果は miR-21, miR-29b, miR-199a-5p, miR-199-3p, miR-214 でも見られたが、miR-422a は変化なく、miR-122 ではむしろ低下した。(b) また、miR-222 の発現は F1/F2 に比べ、F3/F4 で有意に高かった (\*\* $p < 0.01$ )。同様の結果は miR-21, miR-29b, miR-199a-5p, miR-199-3p, miR-214 でも見られたが、miR-422a は変化なく、miR-122 ではむしろ低下した (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )。



(4) 肝線維化ステージ別のマイクロ RNA 発現パターン。マイクロアレイによる発現解析を Bonferroni 補正により  $p < 0.05$  の有意差を持つマイクロ RNA を抽出した (F2 vs F3 ではこの条件に入るマイクロ RNA は存在しない)。それぞれの図の上段に示したものは各線維化の程度別の解析サンプル数を示す。



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、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、増殖、線維化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。また、線維化と深く関連する因子TGFβの偽受容体であるBAMBIの発現を制御していることを明らかにすることができた。

A. 研究目的： 肝臓の線維化には星細胞の活性化が重要な役割を演じていることが知られている。正常の星細胞(hepatic stellate cell; HSC)は Disse 腔に存在する細胞で、ビタミン A を成分とする脂肪滴を有している。しかし、肝臓が何らかの障害を受けると、この細胞は、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：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、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。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。

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ると、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。

肝線維化との関連については、我々のこれまでの研究で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の領域をpGlo-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、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。

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影響を与え、星細胞の活性化、増殖、線維化へ関与することが示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表：

##### 論文発表

1. 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]
2. 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.
3. 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.
4. Ogawa T, Kawada K, Ikeda K. Effect of natural interferon  $\alpha$  on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Hepatology Int.* 2009, 3(3):497-503.
5. Otagawa 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.* 2008;294:R311-20.

##### 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 秋田アトリエ

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

3: 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回肝臓細胞研究会 大阪, 平成21年12月12日

4: 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回肝臓細胞研究会 大阪, 平成21年12月12日

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

6: 金井美晴、村田義夫、池田一雄、曾爾彊。肝疾患の治療を目的とするドラッグデリバリーシステムの開発と形態学。解剖学雑誌 2009;84巻 S18-2, Page107 第114回日本解剖学会総会 岡山 平成21年3月30日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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

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、アプライドバイオシステムズ社のTaqMan MicroRNA Assayにより調べた。1) コラーゲンの発現に関与するマイクロRNAの同定：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、ヒト星細胞株LX-2にTGFβおよびIFNα, βを培地中にそれぞれ添加した際、発現が変化するか調べた。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。2) 星細胞の増殖に関与するマイクロRNAの同定：IFNの作用によりヒト星細胞株LX-2の増殖が抑制された。同条件



下で発現の変動が見られるマイクロRNA (miR-195) を同定した。このマイクロRNAが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、星細胞の増殖に変化が見られるかをWST-1により解析した。また、細胞の増殖に関連する遺伝子およびタンパク質の発現が変化するかをReal-time PCRおよびWestern blotにより調べた。

### C. 研究結果

1) 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 左)。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。

2) IFN $\alpha, \beta$ 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 右)。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-195の発現が濃度依存的に減少することがわかった (Fig. 4)。このマイクロRNAは、TargetScanにより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-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。また、miR-195のprecursorを細胞導入した結果、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、細胞の増殖も抑制することがわかった (Fig. 5)。

### 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行った。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TGF $\beta$ やIFN添加によって発現に変動の見られるマイクロRNAを数種同定した。その中でもcollagen 1A1の3'UTRに結合する可能性の高いmiR-218とmiR-29b、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-218と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。miRNAのprecursorの細胞導入実験では、miR-218とmiR-29bを導入した場合、I型コラーゲンの発現がタンパク質レベルで抑制された。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かったが、これはmiRNAのタンパク質の翻訳の抑制作用によって引き起こされたと考えられた。また、miR-218とmiR-29bがコラーゲンの発現制御に関与する転写因子SP1の翻訳を抑制している可能性も示唆された。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。これらのことから、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、これらのマイクロ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- $\beta$ -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.
6. Ogawa T, Kawada K, Ikeda K. Effect of natural interferon

a on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Hepatology Int*. 2009, in press

7. Otagawa 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*. 2009;3(2):378-383.
8. 小川智弘, 河田則文。【肝の線維化を探る】線維化の Mechanism 肝線維化と細胞間ネットワーク。 *肝・胆・膵* 査読無2008;57:Page 205-209.

##### 学会発表

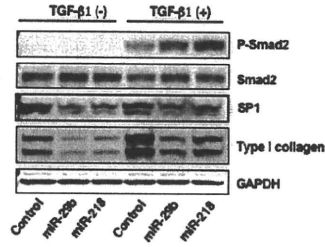
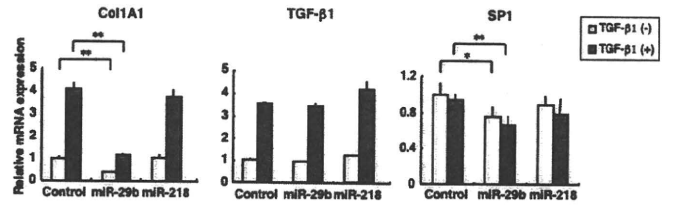
1. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、吉里勝利、池田一雄、河田則文・Type I interferon inhibits hepatic stellate cell proliferation via downregulation of cyclin E1 by microRNA-195・15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (2010)
2. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、吉里勝利、池田一雄、河田則文・星細胞活性化に関与するマイクロ RNA についての検討・第 6 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム (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)
6. 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・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 (2010)

7. 陳輝、小川智弘、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(2009)

G.知的財産権の出願・登録状況

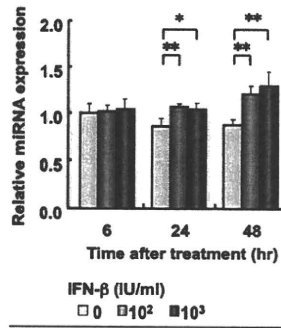
特許出願

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）



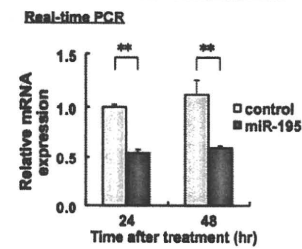
(Fig. 4)

miR-195

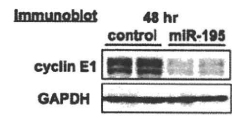
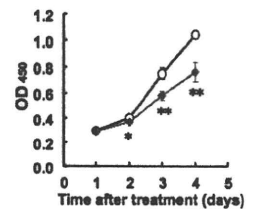


(Fig. 5)

Effect on cyclin E1 expression

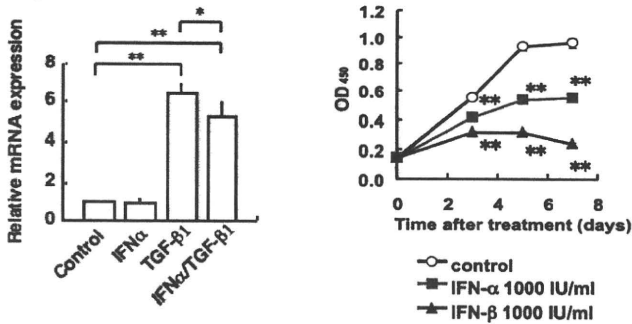


Effect on cell proliferation

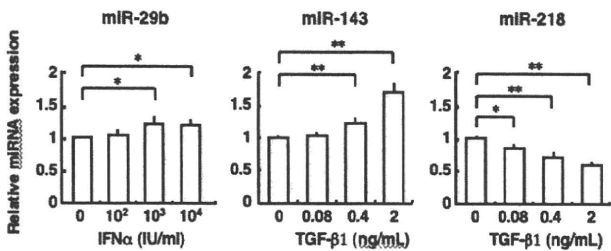


\*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. control

(Fig. 1)



(Fig. 2)



(Fig. 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）

## 総括研究報告書

### インターフェロン著効（SVR）例の肝発癌因子の解析

分担研究者 田守 昭博 大阪市立大学准教授

研究要旨：C型慢性肝炎に対する根治療法はインターフェロン（interferon, IFN）によるウイルス駆除であり、持続的にウイルス陰性化（Sustained virologic response, SVR）することにより肝疾患の進行は阻止され、肝発癌も制御できると考えられている。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。本研究では、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。最終年度にはSVR肝発癌と非B非C型肝炎との臨床的類似点を明らかにした。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提示した。

#### 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（interferon, IFN）療法の関する国の補助が開始され、近い将来には癌患者の抑止が期待されている。さてIFNにより持続的なウイルス陰性化（Sustained virologic response, SVR）となった患者では肝発癌が制御されることは明らかであるが、完全に発癌を制圧できるわけではない。我が国の多くの施設からウイルス排除後の肝発癌に関する報告があり、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。現在では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。そこで本研究では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。また非B非C型肝炎と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

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

- 1) SVR肝発癌とHCV肝発癌の比較。肝組織からDNA, RNAを抽出し解析に供した。癌抑制遺伝子p53, beta-cateninの変異はdirect sequence法にて検討した。またミトコンドリアDNAの変異についてはC-loop領域をdirect sequenceにて解析した。DNAのメチル化はp14, p15, p16, PTENについてはBisulfite処理後にmethylation specific PCRにて解析した。またRB遺伝子は制限酵素Hap II 処理後にPCRを行い評価した。さらにB型肝炎ウイルス（HBV）に関する感染既往を評価するために肝組織内のHBV DNAの存在有無をPCRにて解析した。
- 2) これまでに登録されたSVR症例の内、肝発癌を認めていない71例と肝発癌症例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肝発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。
- 4) 2006年1月以降当院にて初めて診断された非B