

201320037A

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

肝星細胞脱活性化剤開発による  
肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成26 (2014) 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

肝星細胞脱活性化剤開発による  
肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成26（2014）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防	1
河田 則文	
II. 分担研究報告	
1. 肝星細胞に関するエピジェネティクス制御解析	6
池田 一雄	
2. 肝線維化を制御するマイクロRNAの同定	9
村上 善基	
3. ヒドロキシラジカルの選択的除去による 肝炎の治療および発がん予防に関する研究	14
仲谷 和記	
4. 抗線維化物質の探索と慢性肝炎が惹起する肝発がん分子機序解析	16
松原 勤	
5. 薬剤効果検討に用いる初代培養肝星細胞の分離法について	19
祝迫 恵子	
6. サイトグロビンの発がんへの寄与のin vivo解析	22
LE THUY	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

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）

平成25年度総合研究報告書

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

研究代表者：河田則文 大阪市立大学 教授

研究要旨：肝硬変では肝実質が活性化星細胞（HSC）や筋線維芽細胞（MFB）などの非実質細胞で置換されてI型コラーゲンを主とする細胞外マトリックス物質が蓄積し、年率8%で発がんする。近年、線維化反応の主体をなす活性化HSCが隣接する肝細胞機能を低下させる要因であり、サイトカインや活性酸素の持続産生により微小環境を攪乱し肝発がんに寄与することが示された。従って、活性化HSCを生理的状態へ戻し、類縁するMFB機能を制御することは脱線維化のみならず、肝細胞機能の復元と発がん抑制の大前提となる。我々は肝臓ではHSCのみに発現する哺乳類第4番目のグロビンであるサイトグロビン（Cygb）を発見した。Cygb欠損マウスを用いた2つのモデル実験から、Cygbの欠損が星細胞をプライミングさせ、肝臓の炎症・線維化反応を増幅させるのみならず、発がんに寄与することを見出した。従って肝内Cygb発現を増加させ得る物質はHSCの脱活性化を促し、同時にCygb陰性MFBの機能調節を通じて抗線維化的に働き、肝細胞再生に寄与し、発がん予防に繋がることと発想で、一物質として成長因子Xを同定した。現在その詳細な分子メカニズムを研究している。本Cygbを中心とする活性化HSCとMFBの機能制御による肝硬変治療法の開発は申請者らが発見した分子に基づき研究を展開しており極めて独創的である。平成25年度でin vitro POCを確立しつつあり、順次in vivo POC作製に向けた準備を行う。本研究は、ウイルス排除療法の適応にならない肝硬変患者や脂肪性肝炎による肝硬変の肝機能の改善ならびに発がん抑制に直結し、厚生労働行政上極めて意義深い。

研究分担者

池田一雄 大阪市立大学大学院医学研究科  
機能細胞形態学 教授  
村上善基 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  
仲谷和記 大阪市立大学大学院医学研究科  
機能細胞形態学 准教授  
松原 勤 大阪市立大学大学院医学研究科  
機能細胞形態学 講師  
祝迫恵子 京都大学大学院医学研究科  
標的治療腫瘍学講座 特定講師  
Le Thuy 大阪市立大学大学院医学研究科  
肝胆膵病態内科学 特任助教

A. 研究目的

肝硬変では肝実質が非実質細胞で置換されて細胞外マトリックス物質が蓄積し、年率8%で発がんする。即ち肝硬変の肝機能改善と発がん予防は密接に関係し、両者を達成する治療とは肝臓を脱線維化させ、残存成熟肝細胞を再生させつつ機能回復させ、発がん要因を排除する方法論となる。肝線維化は活性化HSCや類似するMFBが産生するI型コラーゲンやTGF $\beta$ が主体であるが、近年、HSCの持続活性化や実質に増加したMFBが肝細胞機能を低下させる要因であり（Nat Med 2011;17:1668）、肝発がんに寄与する

(Hepatology 2012;56:769)ことが示された。以上より本研究ではHSCの脱活性化とMFB制御により脱線維化を誘導し、残存成熟肝細胞を再生させて肝機能を回復させ、延いては発がん抑制に繋がる治療法の開発を目指す。申請者は本邦でHSCの機能研究を開始した先駆者であり、HSC活性化分子機構とその制御に関する先端的研究を行ってきた (Hepatology 1998;27:1265;J Biol Chem 2001;276:28274;Gut 2007;56:396;Hepatology Res 2011;41:199など)。研究過程で星細胞にユニークに発現し、MFBに存在しない、Cygbを発見した (J Biol Chem 2001;276:25318; Hepatology 2000;32:268)。本蛋白はミオグロビンと酷似し (J Mol Biol 2004;339:873)、局所の酸素センサーとして機能する。Cygb欠損マウスを作製して(特開2010-5127)解析したところ、本マウスは炎症・線維化反応が増強し、易発がん性を示した (Am J Pathol 2011;179:1050、特願2010-52244)。逆にCygb過剰発現はHSC活性化を抑制する。これらの事実はCygbが肝保護的グロビンであり、微小環境維持に重要で、その欠損は肝炎・線維化・発がんを悪化させることを示す。以上より、Cygb活性化薬、あるいは、Cygbに関連する代謝経路の制御剤は肝機能回復と発がん抑制の鍵となるため、本研究では2年間をかけてin vitro, in vivo POCを作り、3年目に臨床試験への準備に移行する。星細胞Cygbの研究は申請者らが国の内外で優先的に行っており、その成果を用いて独創的コンセプトに基づく画期的な肝硬変治療剤を誘導する。

## B. 研究方法

[1]-[3]を平成25-27年度前半で行い、[4]の準

備を平成27年度後半から行なう。

### [1]前臨床試験

①Cygbの活性化 HSC や MFB 機能に対する効果 : HSC を野生型マウス、Cygb 欠損マウスから分離して機能比較を行う。構築した Cygb 発現ベクターを Cygb 陰性 MFB に感染させ、コラーゲンや TGF  $\beta$  mRNA 発現抑制などを検討する。一方、GMP 準拠の Cygb 製剤を準備し活性化 HSC や MFB への効果を検討する。また、HSC 機能への Cygb のさらなる in vivo 機能解析のため Lhx2 プロモーターを用いたコンディショナルノックアウトマウスを作製し実験を行う。(Le、祝迫)

②薬物スクリーニング : HSC や MFB 細胞内の Cygb を増加させ得る候補物質を見出す。例えば東京大学創薬オープンイノベーションセンター等を利用して Cygb 活性化薬を見出す。スクリーニング法としては染色体上の星細胞活性化指標遺伝子 (COL1A2 ; 分化、PPAR $\gamma$  ; 脱分化) プロモーターの下流にレポーター遺伝子 (ZsGreen1 や mCherry) を連結させてヒト星細胞株 LX-2 または HHS $\sigma$ C へ 組換え、その蛍光シグナルを指標とした In vitro 評価系を構築する。一方、現在見出している Cygb 活性化薬 X についてさらにその効果を詳細に調べると同時に、作用機序について受容体、細胞内シグナル伝達、関与する転写因子などを詳細に検討する。また、研究を継続している microRNA について核酸創薬を念頭に検討する。評価項目として : Cygb 遺伝子ならびに蛋白発現増加 ; MFB の増殖抑制 ; コラーゲンや TGF  $\beta$  mRNA 発現抑制 ; PPAR $\gamma$  発現誘導など。以上から in vitro での POC 取得と構造活性相関を行う。RNA を含む候補物質を 2~3 へと絞り込み、初期合成を

行う。(河田、池田、松原)

[2] in vivo POC: 候補となる化合物について、ヒト肝硬変に類似のマウスモデルを用いて、完成した線維化の復元がみられ、肝細胞の増殖と機能回復がみられるか、また、発がん抑制効果を検討する。一方、リコンビナント *Cygb* についても静脈内あるいは腹腔内投与で検討する。(Le)

### C. 研究結果

・研究代表者(河田則文)

(1) *Cygb*-null マウスを CDAA 食で飼育すると全マウスで腫瘍が形成された(野生型マウスでは腫瘍形成なし)。*Cygb*-null マウスの背景肝ではマクロファージなどの炎症細胞浸潤が著明で、I 型コラーゲン沈着が顕著であった。線維化やがん関連遺伝子発現が *Cygb*-null マウスで有意に高かった。この反応はマクロファージを除去することや N-アセチルシステイン投与で予防できた。

(2) アルンジン酸はヒト星細胞株 HHStcC に対して予想通り細胞増殖を抑制し、平滑筋アクチン発現を濃度依存性に低下させ、逆に *Cygb* 発現を増加させた。

(3) HHStcC を用いる事で、HHStcC 内の *Cygb* 量を発現誘導する因子 X を新たに発見した。この因子はペプチドであることを見出し、その同定を急いでいる。アルンジン酸に変わるペプチド性因子による *Cygb* 誘導分子機構を検討することで新たな抗線維化治療戦略が見出される可能性がある。

(4) ヒト肝組織において *Cygb* を発現する細胞は HSC だけであり、MFB は陰性であった。

・研究分担者(池田一雄)

(1) HSC や MFB のエピジェネティック変化が、細胞分化、脱分化あるいは老化過程で変化するかどうかを検討するために、転写因子 PPAR $\gamma$  を強制発現させるアデノウイルスベクターを作製し、LX2 細胞での発現を確認した。

・研究分担者(村上善基)

(1) C 型慢性肝炎の線維化の程度別に発現の異なる miRNA を 20 種程度同定し、LX2 を使った実験で過剰発現させた際に alpha-1 procollagen の発現を亢進するものを 2 種、低下するものを 3 種同定。

(2) 肝細胞と肝星細胞の相互作用を明らかにするために、肝癌細胞株の上清、エクソソーム、エクソソーム除去上清のそれぞれを回収し、それに含まれるサイトカイン、miRNA の発現を解析した。

・研究分担者(松原 勤)

(1) 脱線維化候補化合物の効率よい選定のために、ヒト星細胞株 LX-2 細胞ならびに HHStcC 細胞の PPAR・遺伝子と COL1A2 遺伝子の発現変動を基盤とした脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を構築している。本系は、星細胞活性化に伴い発現減弱する PPAR・遺伝子と発現亢進する COL1A2 遺伝子に着目し、最近報告された遺伝子組み換え技術(Cell 2013, 154, 1380-1389)に基づいて星細胞株の両遺伝子上に蛍光タンパク遺伝子を直接かつ配列特異的に導入して構築され、従来のスクリーニング系では評価できないエピジェネティック変化も追跡可能である。

(2) 肝細胞の癌化における星細胞の細胞老化の影響を検討するため、現在、LX-2 細胞、HHStcC 細胞、マウス星細胞を増殖させ、各々の細胞老化状態を構築中である。

- ・ 研究分担者(祝迫恵子)

(1) 肝構成細胞の主分画である肝細胞、肝非実質細胞(肝星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞)をマウスより採取し、フローサイトメトリーおよび磁気細胞分離法により分離し、純度を確認した。

(2) 分離初代培養細胞に対する薬剤の影響を検討するため、培養条件、薬剤濃度などの検討を進めている。

- ・ 研究分担者(仲谷和記)

(1) HSCはCygbなどの分子発現により、肝小葉内でのフリーラジカル種の発生を制御する可能性が示唆されている。研究分担者は、肝組織内におけるヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )を除去し発がんを予防する目的でLECラットを用いた実験を進め、 $\text{H}_2$ の肝がん抑制効果を検討中である。

- ・ 研究分担者(Le Thuy)

(1) HSCを野生型マウス、Cygb欠損マウスから分離して機能比較を行った結果、Cygb欠損によりHSCがプライミングを受け、野生型HSCに比較して活性酸素やケモカインを過剰産生することが判明した。野生型HSCにsiCygbを作用させてCygbを発現低下させると、同様の現象が確認できた。

(2) アルンジン酸のin vivo抗線維化効果についてマウスモデルで検討を進めている。

#### D. 考察

厚生労働省が進める肝炎総合対策の推進によりC型肝炎では1b型高ウイルス症例でも約80%の根治率が得られるようになりB型肝炎でも種々の取り組みがなされている。しかしながら肝硬変まで病状が進行した場合はウイルス排

除率が低く、例えウイルスが排除されたとしても残存活性化HSCやMFBにより肝機能を回復できず、発がんする。従って予後改善のためには肝硬変を脱却させる新治療薬の開発が急務である。本現状のもと、Cygbを主軸として肝硬変を分子・細胞レベルで再評価しつつ本病態に関わるHSCやMFBの機能調節剤を開発することは、正に、肝硬変対策に不可欠で、肝炎関連厚生労働施策へ直接反映させ得る。申請者らは既にCygbがHSCを静止期状態に保つ重要な蛋白質であること、この蛋白質の発現を増加させるアルンジン酸が肝線維化に役立つことを見出した。同様の手法を用いてCygb研究を展開させ有効化合物を見出す。肝硬変治療薬に対するUnmet Medical Needは高く、『治療満足度が低い疾患』であるため、有効な肝硬変治療薬が開発されれば、患者QOLの向上や医療費の削減など社会に与えるインパクトは大きく、医学的価値は極めて高い。さらにそのシーズを産業応用できれば、HSCに直接作用して脱線維化させる事により肝細胞再生を促し組織を正常化させ、発がんを抑制するという新しいコンセプトに基づく創薬研究が期待でき、優位性が高い。

#### E. 結論

肝星細胞の活性化制御に関してCygbが重要な因子であることが解明されつつある。Cygbの発現量を星細胞特異的に変動させ、星細胞をビタミンA貯蔵型に分化させることが肝細胞再生の素地形成にも繋がりをうる。

#### F. 研究発表

論文発表

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>1. <u>河田則文</u> サイトグロビン研究の現状と展望 日本臨床 2013;71:927-103</p> <p>2. <u>河田則文</u> 肝線維化と星細胞 Surgery Frontier 2013;20:72-75</p> <p>3. <u>河田則文</u> 肝線維化機序研究の進歩 臨床消化器科 2014;29:421-427</p> <p>4. <u>河田則文</u> サイトグロビン研究の現況 細胞 2013;45:598-600</p> <p>5. 元山宏行、Le Thi Thanh Thuy、<u>河田則文</u> 肝臓とサイトグロビン 細胞 2013;45:609-612</p> <p>6. 吉里勝利、<u>河田則文</u> 哺乳類第4番目のグロビン、サイトグロビンの発見 細胞 2013;45:601-604</p> <p>7. <u>河田則文</u> 肝硬変 第2章 病理・病態生理 病因 最新医学社 2014 (別冊) p31-38</p> <p>8. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Motoyama H, Komiya T, Thuy le TT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, <u>Kawada N</u>. Lab Invest. 2014;94:192-207.</p> | <p>Hepatic Sinusoid. 2013, September 23-25, Osaka, Japan</p> <p>2. Accelerated liver cancer development in Cytoglobin-deficient mice treated with chemicals/diet via the priming of stellate cells and activation of local fibrosis, inflammation, and oxidative stress. Le TT, Matsumoto Y, Hai H, Yoshizato K, <u>Kawada N</u>. AASLD-The Liver Meeting 2013, November 2-5, Washington DC, USA</p> <p>G. 知的所得権の取得状況</p> <p>1. 特許取得<br/>なし</p> <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3. その他<br/>なし。</p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### 学会発表

1. Thuy Le, Suoh M, Matsumoto Y, Hirano Y, Motoyama H, Hai H, Tuong T, Urajara Y, Yoshizato K, Kawada N. Progression from NASH to liver cancer in the absent of cytoglobin. International Society for Hepatic Sinusoidal Research, 17<sup>th</sup> International Symposium on Cells of the



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）

分担研究報告書（平成 25 年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

分担研究者：池田一雄 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

分担研究課題：肝星細胞に関するエピジェネティクス制御解析

研究要旨：本研究では、エピジェネティクス制御の観点から肝線維化に関わる細胞を特にヒストン2A.2やヒストン3.3といった遺伝子発現に直接関与するといわれている領域をChipシーケンスを用いて解析し、細胞の可塑性、線維化の責任細胞のオリジンを明らかにすることを目的としている。iPS細胞作製でも明らかのように様々な細胞で、転写因子の強制発現により細胞が分化誘導されることが知られている。今年度は、肝星細胞の分化誘導にKeyとなる転写因子のひとつであるPPAR $\gamma$ を発現させるアデノウイルスベクターを作製した。このウイルスを用いて肝星細胞にPPAR $\gamma$ を強発現させることができた。

#### A. 研究背景・目的

ヒトゲノム配列の決定、多能性幹細胞、マイクロRNAを代表とするRNAの新しい機能の発見など、近年、メディカルサイエンスには大きな進展が見られる。肝線維化の研究分野においても骨髄細胞移植により、肝線維化が制御される可能性が示され、また、線維化を引き起こす線維芽細胞は、肝星細胞が筋線維芽細胞に変化する以外に、グリソン鞘周囲の線維芽細胞、骨髄細胞由来の可能性もあることがわかってきた。

我々は、これまで、肝星細胞活性化に関連する因子を Suppression Subtractive Hybridization 法、Receptor Tyrosine Kinase に対する Homology PCR 法、プロテオーム解析、micro RNA アレイ等様々な手法により蛋白レベル、遺伝子レベルで網羅的に解析を進めてきたが、今回は、エピジェネティクス制御の観点から肝線維化に関わる細胞を解析し、細胞の可塑性、線維化の責任細胞のオリジンを明らかに

できるかどうか検討したい。

#### B. 研究方法

脂肪細胞の分化誘導の Key となる転写因子のひとつである PPAR $\gamma$ を発現させるアデノウイルスベクター作製のため cosmid pAxCALNLw (TAKARA) に PPAR $\gamma$  cDNA を挿入し、既報のごとく PPAR $\gamma$  発現アデノウイルスベクターを作製した。

ラットおよびマウス肝臓よりコラーゲナーゼ、プロナーゼ還流法とナイコデント密度勾配遠心法により肝星細胞を分離培養した。ウイルスベクター発現には、分離培養細胞と LX-2 細胞株を用いた。

#### C. D. 研究結果と考察

PPAR $\gamma$  発現アデノウイルス作製において、cosmid への PPAR $\gamma$  cDNA 挿入を確認後、ウイルス作製課程で5つのクローンを pick up し、DNA 解析で異常のない2つのクローンを3次

ウイルスを作製した。

2つのクローンを Cre-CAG アデノウイルスと共に分離培養肝星細胞、LX-2 に共感染させたところ、ウエスタンブロッティングの蛋白発現解析では、1クローンだけに PPAR $\cdot$  の共発現が確認できた。また、細胞の形態的観察では、PPAR $\cdot$  発現とコントロールとの間においても特別な差は認められなかった。

分化誘導の Key となる転写因子 PPAR $\cdot$  を発現させることで、肝星細胞のエピジェネティクス制御に変化を見ることができるとかが現時点での最大の関心事であり、特にヒストン 2A.Z やヒストン 3.3 といった遺伝子発現に直接関与するといわれている領域を Chip シークエンスを用いて解析する予定である。また、ヒト肝臓組織での線維化領域での SM $\cdot\cdot$ actin は、均一ではなく、SM $\cdot\cdot$ actin の発現の有無によるヒストン 2A.Z やヒストン 3.3 の領域を検討することも今後の検討としたいが、Chip シークエンスを行うための特異的な部位の組織量を如何に確保できるのか、あるいは、Chip 後の DNA を増幅することによってシークエンス可能であるか検討したい。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived

hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. Cell Transplantation, 2014 in press.

2. Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K., Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbontetrachloride-induced liver fibrosis. Hepatol Res. 2014 in press

### 2. 学会発表

1. Matsubara T, Kitamura K, Teranishi Y, Kawada N, Ikeda K. Stress influences on bile acid homeostasis in development of diet-induced steatohepatitis. AASLD November, 2013, Boston

2. Teranishi Y, Matsubara T, Iwaisako K, Nakatani K, Thuy LT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K., Kawada N. Unexpected influence of oxygen-binding cytoglobin expressed in stellate cells on acetaminophen-induced acute hepatocyte damage; in vivo and in culture studies. AASLD November, 2013, Boston

3. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana K, Ikeda K., Tanaka Y, Mizuguchi

H. Over-expression of Bcl-xl mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society

for the Research of Hepatic Cells. Sep, なし  
2013, Osaka

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）

分担研究報告書（平成 25 年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

分担研究者：村上善基 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

分担研究課題：肝線維化を制御するマイクロ RNA の同定

研究要旨：慢性肝疾患の最たる原因である B 型(HBV)、C 型(HCV)肝炎ウイルス感染者は本邦で全人口の約 3.5%である。肝炎ウイルスに感染すると高率に慢性化して、最終的に肝硬変、肝(細胞)癌へと進行する。肝硬変からの発癌は年率 8%に上り、その制圧は厚生労働行政上重要な課題である。抗ウイルス薬は最近の進歩で難知性であった HCV genotype 1b であっても奏効率 80%以上期待出来る疾患となった、しかし慢性 B 型肝炎や既に線維化が進行している肝硬変に対しては十分にコントロールできているとは言えない状況である。今回マイクロ RNA(miRNA)による肝線維化進展メカニズムを明らかにし、miRNA を使った肝線維化を標的とした創薬を試みる。

#### A. 研究目的

慢性肝疾患とそれに引き続く肝線維化の主な原因として HBV と HCV の感染、アルコール摂取、NASH などがある。ウイルス性肝炎は徐々に減少しているが本邦では約 350 万人の感染者があり、アルコール肝炎は減少しているが、NASH は徐々に増加している。慢性 C 型肝炎についてはウイルスタンパクを標的とする薬剤が開発されたことがあり、奏効率は 80%以上となっている。一方それ以外の疾患は十分制御できているとは言えず、肝硬変など既に線維化が高度に進行している症例には有用な肝発癌防止策が取れないのが現状である。本邦における慢性肝疾患の年間死亡者数は約 3.4 万人に上り、前癌状態の肝硬変、つまり肝線維化を制御することは厚生労働行政上急務である。

miRNA は 20-24bp の蛋白をコードしていない

小分子 RNA で現在ヒト miRNA は約 2500 種類同定されている (miRBase Ver. 20 <http://www.mirbase.org>)。miRNA は生物の発生、細胞の分化など生命現象に深く関与しており、その発現異常は疾患と深く関係しており、特に発癌、ウイルス感染との関連が注目されている。我々はマイクロアレイ解析を行い、ウイルス性肝炎の線維化の進展、肝発癌に miRNA の発現異常が深く関係している事を今までに明らかにした (Murakami Y et al. PLoS ONE 2011)。

本研究班では。肝線維化の主たる役割を果たしている肝星細胞の活性をコントロールする miRNA を明らかにし、異常な miRNA の発現が肝星細胞に与える影響を解析する、また活動性のある星細胞を制御できるよう慢性肝疾患マウスを用い、線維化を制御できる方法を明らかに

し、肝線維化の制御を目標とした遺伝子治療の開発を試みる。

## B. 研究方法

### 肝線維化に関与する miRNA の同定

慢性 C 型肝炎の治療前肝生検組織 105 例より miRNA の解析をマイクロアレイでおこなった。また、マウス肝線維化モデルである四塩化炭素投与群とコントロールとしてオリーブオイル投与群の肝組織の miRNA を、マイクロアレイによって解析した。マイクロアレイ解析結果は統計解析支援環境の R を用いた。

標的遺伝子同定には miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) を用いてスクリーニングを行い、肝星細胞株 (LX-2) に該当する miRNA を過剰発現し、標的遺伝子候補の発現が低下することを確認した。さらに、該当する miRNA を過剰発現した LX-2 を RISC (RNA induced silencing complex) の主成分である Argonaute 2 の抗体で免疫沈降し、標的遺伝子候補が Argonaute 2 と親和性があることを確認した。

### 肝星細胞の活性解析

肝星細胞株の LX-2 に miRNA をトランスフェクションし、細胞増殖マーカーとして XTT アッセイを行った。また星細胞が活性化する際に collagen 1 が発現することを受けて、その前駆体である procollagen alpha-1 遺伝子発現をリアルタイム PCR で確認した。

### 慢性肝疾患マウスモデルの作成と in vivo 実験

5 週間四塩化炭素を投与したマウス、5 週間投

与後さらに 1 週間経過観察したマウス、それぞれより肝、腎、脾、心、肺、脂肪組織、精巣、の変化を明らかにした。またマウス尾静脈より該当する miRNA を投与し、1 週間後に屠殺し線維化抑制に対する miRNA の効果を確認した。

### (倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究は、大阪市立大学大学院医学研究科倫理委員会の承認のもと解析を行った (1358「肝臓病におけるマイクロ RNA の解析」、1646「肝臓病における炎症・線維化・発癌に関与する遺伝子の探索」)。

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など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

### 肝線維化に関係する miRNA

線維化が亢進するにつれて発現が亢進している miRNA と発現が低下している miRNA をカタロ

グ化した。その中で発現比が大きく、肝線維化だけではなく、皮膚、肺など他の臓器の線維化について報告のあるmiRNAを選択したところ、この基準で線維化の亢進に応じて発現が亢進するmiRNAは2種 (miR-122, miR-199a-3p)、発現が低下するものは3種 (miR-29a, miR-150, let-7f) 選択することが出来た。

またこれらのmiRNAの標的遺伝子候補はmiRTarBaseを用いそれぞれ数種選択することが出来た。mirTarBaseに掲載しているmiRNA-標的遺伝子候補は、既にレポータージーンアッセイ、ウエスタンブロット法などで標的であることを確認され、文献として利用できるものが選択されている。今回LX-2を用いた過剰発現による標的遺伝子発現解析実験とArgonaute 2による免疫沈降実験で、miR-29aとmiR-150はprocollagen alpha-1を標的としていることを明らかにした。

#### 肝星細胞活性の検討

LX-2にTGF-betaを投与するとprocollagen alpha-1の発現が亢進し、星細胞の活性化が誘導されることを確認した。LX-2をTGF-betaであらかじめ活性化させた後にmiR-29a、miR-150、let-7fを過剰発現させるとprocollagen alpha-1の発現が抑制された。これらのmiRNAの効果は量依存ではなく、またこれらのmiRNAをカクテルにしてもその効果は著明に現れなかった。またmiR-122、miR-199a-3pを過剰発現するとprocollagen alpha-1の発現は亢進した。細胞増殖活性についてXTTアッセイを行なったところ、これら5種のmiRNAの発現を変化させてもXTTの取り込みには影響がなかった。

#### 慢性肝疾患モデルマウスを使ったmiRNAの抗線維化抑制効果の検討

四塩化炭素を5週間投与したマウスの尾静脈より(1)トランスフェクション試薬のみ、(2)miRNAのnegative control、(3)miR-29a、(4)miR-150を1週間に二回投与し、何も投与していない自然経過群と比較した。肝組織をHE染色とsirius red染色で病理組織的に評価した。miRNAを投与した群では、肝の炎症などはコントロール群と比較して変化はなかったが、線維成分が減少していることが明らかになった。また肝組織中のprocollagen alpha-1の発現も低下していた。

#### D. 考察

慢性C型肝炎の肝線維化の程度に応じて発現が異なっているmiRNAの機能を*in vitro*と*in vivo*実験で確認した。線維化の程度に応じて発現が低下しているmiRNAを過剰発現すると星細胞に毒性を与えずに活性が低下していることが明らかになり、慢性肝炎モデルでもmiRNAを投与することにより肝細胞毒性なく、肝線維化の改善を促進することが分かった。

#### E. 結論

正常に比べある疾患の際に発現が低下しているmiRNAを補充することにより、その疾患の改善が期待できることが明らかになった。今後そのメカニズムを明らかにし、miRNAを使った肝線維化治療確立を目指す。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 論文発表

1. Motoyama H, Kawada N, Komiya T, Le Thuy, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, and Yoshizato K. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. *Lab Invest.* 2013 Dec 2. doi: 10.1038/labinvest.2013.135.
2. Y-h Taguchi, Murakami Y. Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers. *PLoS ONE* 2013; 8: e66714
3. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y. Association between Hepatic Steatosis and Hepatic Expression of Genes Involved in Innate Immunity in Patients with Chronic Hepatitis C. *Cytokine* 2013 Aug;63(2):145-50.
4. Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis *BMC Cancer.* 2013;13:99
5. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y. Higher Hepatic Gene

Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Biomarkers.* 2013;18:82-7.

6. 松本佳也、伊丹沙織、村上善基 ウイルス感染と分泌型 microRNA 肝疾患 review 2014
7. 村上善基、河田則文、棚橋俊仁、田口善弘 エクソソーム中マイクロRNAを利用した慢性肝疾患診断法の開発 *肝胆膵*67巻1号 (2013年7月号)

### 学会・研究会発表

1. 村上善基 マイクロ RNA 発現解析による慢性肝疾患診断 第34回日本臨床薬理学会学術総会シンポジウム 平成25年12月5日 東京都
2. 伊丹沙織、村上善基、黒田雅彦、落谷孝広、恵口豊、河田則文. miR-122 に対する iMIR はC型肝炎ウイルス複製抑制に効果的である. 第72回日本癌学会学術総会 平成25年10月3日 横浜市
3. Murakami Y, Itami S, Mizutani T, Kuroda M, Ochiya T, Kato N, Eguchi Y, Suzuki H, Novel RNAi agent can control HCV replication. *Keystone Symposia RNA silencing* 2014 Feb 2, Seattle WA
4. Itami S, Matsumoto Y, Yoshida K, Motoyama H, Fujii H, Kawada N, Murakami Y. The profiling of miRNA expression in liver fibrosis. 17<sup>th</sup> International Society for Hepatic Sinusoidal Research 2013 Sep 23 Osaka Japan

## H. 知的財産権の出願、登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

分担研究者：仲谷和記 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

分担研究課題：ヒドロキシラジカルの選択的除去による肝炎の治療および発がん予防に関する研究

研究要旨：肝星細胞はサイトクロビンなどの分子を発現することにより、肝小葉内でのフリーラジカル種の発生を制御する可能性が示唆されている。本研究では、肝組織内におけるヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）類を除去して、肝炎の治療および発がんの予防を行う目的で、銅代謝異常により急性肝炎を発症し、次いで肝腫瘍を自然発症するモデル動物である LEC ラットを用いた実験を行った。 $\cdot\text{OH}$  類の選択的除去分子である水素分子を LEC ラットに投与したところ、急性肝障害の抑制効果は認められなかったものの、予備的実験群において肝腫瘍の発生が抑制された。

#### A. 研究目的

肝星細胞は、サイトクロビンなどの分子を発現することにより、肝小葉内でのフリーラジカル種の発生を制御している可能性が示唆されている。フリーラジカル種には様々なものが含まれるが、組織における酸化ストレスの主たる原因となっているのはヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）類であり、この  $\cdot\text{OH}$  を選択的に除去する物質として水素分子が注目されている。

本研究では、水素分子による肝炎の治療効果と発がん予防効果を明らかにし、星細胞機能に対する作用を含めた、水素分子の治療・予防効果の分子機構を明らかにすることを目的とする。

#### B. 研究方法

銅代謝異常によって肝臓をはじめとする複数の臓器に障害が発生する、ヒトのウイルソン病の疾患モデル動物である Long-Evans cinnamon

(LEC) ラットとその正常対照動物である Long-Evans agouti (LEA) ラットを用いて実験を行った。LEC ラット、LEA ラットとも高価であるため、それぞれを交配させて殖やし、実験に用いた。

LEC ラット、LEA ラットをそれぞれ 2 群にわけ、飽和水素水（エコモ・インターナショナル社製 アキューエラ・ブルーにて調製）と脱水素水（超音波洗浄機を用いるなどして、飽和水素水より水素分子を取り除いたもの）を自由飲水させた。処置・臓器等採取は麻酔下にて行い、安楽死には炭酸ガスを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は、「大阪市立大学動物実験管理規程」及び「大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会」の定める倫理規程に基づき実験計画を策定している。そして、「動物実験計画審査小委員

会」の審査を合格した動物実験計画の一部として実施の承認を得ている。本研究の動物実験は、基本的に「大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会」の定める動物実験施設内で行っているが、所属研究室内で行わなければならない場合に関しては、同委員会の承認を得た「動物実験室」で行っている。

### C. 研究結果

LEC ラットは、肝臓に蓄積した銅から生じるフリーラジカル種（主に・OH 類）による肝細胞障害のため、生後 4～6 ヶ月齢（16～26 週齢）で急性肝炎を発症し、雄では 2～4 割が、雌では約 8 割が死亡するとされている。そして生存した個体も慢性肝障害のために、生後 1 年～1 年半（52～78 週齢）の間で大部分が肝臓癌を発症すると報告されている。実験計画段階では、飽和水素水投与により LEC ラットの急性肝炎が予防もしくは軽減され、死亡率が減少すると予想していたが、それに反して、雄雌ともに死亡率の減少が認められなかった。

本研究では、急性臓器障害による脱落分が多いことと、繁殖が比較的難しい（新生仔に対する母親ラットの食害、妊娠・授乳中の母親ラットの死亡などによる）ことから十分な個体数を確保できず、発がん予防効果の検討に関しては予備的実験群で検討を行った。予備的実験群では、71 週齢で死亡した脱水素水投与 LEC ラットにおいて肝臓に著名な腫瘍形成が認められたのに対して、71 週齢で犠牲死させた飽和水素水投与 LEC ラットでは肝臓における腫瘍形成が著しく抑制されていた。

### D. 考察

水素分子を用いた・OH 類の選択的除去によって酸化ストレスより細胞・臓器を保護しようという試みは、2007年に日本医大の太田成男らの研究グループが報告（Ohsawa, Ohta, et al. Nature Med, 2007）して以来、様々な病態に対して研究が行われ、現在まで、数多くの学術的報告がなされてきている。本研究では残念ながら、水素分子によるLECラットの急性肝障害抑制作用は認められなかったが、予備的実験群において肝腫瘍形成が水素分子投与によって抑制されたことより、引き続き、水素分子の発がん抑制効果を検討していきたい。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

仲谷和記、池田一雄. 肝星細胞研究の変遷とその成果. 日本医事新報. 第 4660 号. 66-67, 2013

### F. 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）

分担研究報告書（平成 25 年度）

肝星細胞脱活性化剤開発による肝硬変の肝機能改善と肝発がん予防

分担研究者：松原勤 大阪市立大学大学院医学研究科 講師

分担研究課題：抗線維化物質の探索と慢性肝炎が惹起する肝発がん分子機序解析

研究要旨：脱線維化薬の候補化合物を効率よく選定するために、ヒト星細胞株 LX-2 細胞の *PPAR*・遺伝子ならびに *COL1A2* 遺伝子の発現変動を基盤とした脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を構築しており、構築に必要なベクターは確立された。また、予備検討でヒト星細胞株 HHS<sub>te</sub>C 細胞の細胞老化が観察された。今後、脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を用いた脱線維化化合物の選定ならびに肝細胞の癌化における星細胞の細胞老化の影響を HHS<sub>te</sub>C 細胞のセクレトームの視点から解析する。

#### 研究協力者

松原 三佐子

大阪市立大学大学院医学研究科

#### A. 研究目的

肝硬変は、肝実質が活性化した星細胞（HSC）や筋線維芽細胞（MFB）などの非実質細胞で置換されて細胞外マトリックス物質が蓄積した状態であり、年率8%で発がんする。

近年線維化反応の主体をなす活性化 HSC が隣接する肝細胞機能を低下させる要因であり、サイトカインや活性酸素の持続産生により微小環境を攪乱し肝発がんに寄与することが示された。従って、活性化 HSC を生理的状态へ戻し類縁する MFB 機能を制御することで、脱線維化を促し、肝細胞機能の復元ならびに発がん抑制が達成される。

即ち肝硬変の肝機能改善と発がん予防は密接に関係しており、両者を達成する治療とは肝臓を

脱線維化させ、残存成熟肝細胞を再生させて発がん要因を排除する方法論となる。

本研究は、新規肝硬変・肝がん治療薬の開発に貢献するために、(1) 脱線維化物質を探索し、(2) 肝発がんにおける持続的 HSC 活性化の影響をセクレトームの視点から解析する。

#### B. 研究方法（計画）

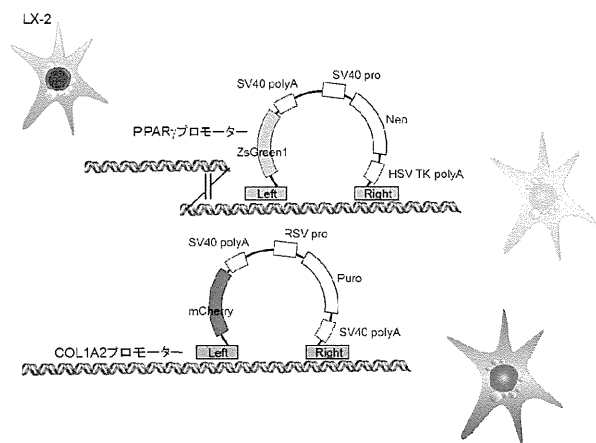
(1) 脱線維化薬の候補化合物を効率よく選定するために、ヒト星細胞株 LX-2 細胞の *PPAR*・遺伝子ならびに *COL1A2* 遺伝子の発現変動を基盤とした脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を構築する。本スクリーニング系は、星細胞の活性化(肝線維化)に伴って発現が減弱する *PPAR*・遺伝子と発現が亢進する *COL1A2* 遺伝子に着目し、最近報告された遺伝子組み換え技術 (Cell 2013, 154, 1380-1389)に基づいて星細胞株 (LX-2 ならびに HHS<sub>te</sub>C) の *PPA*・・遺伝子ならびに *COL1A2* 遺伝子上に蛍光タンパク遺伝子を直接

かつ配列特異的に導入して構築され、従来のスクリーニング系では評価できないエピジェネティック変化も追跡可能である利点を持つ。

(2) 持続的HSC活性化はHSCの細胞老化を招く。近年、脂肪肝炎モデルマウスではあるものの、HSCの細胞老化と肝発がんの関連性が示された。そこで、HSCが細胞老化をすると分泌物(セクレトーム)が影響を検討するため、HHStcC細胞の静止期、活性化期、細胞老化期のセクレトームを解析して、セクレトームの違いから肝発がんを惹起する因子の同定に挑戦する。

### C. 研究結果

(1) *PPAR*・遺伝子に緑蛍光タンパク *Green1* 遺伝子を導入するためのベクター(pGreen1-PPARg)ならびに *COL1A2* 遺伝子に赤蛍光タンパク *mCherry* 遺伝子を導入するためのベクター(pmCherry-COL1A2)を構築した(図1)。

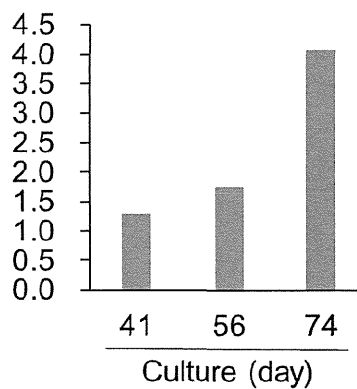


現在、LX-1 細胞または LX-2 細胞に構築したベクターを導入して脱線維化評価系を樹立中である。また、この手法は挑戦的であるため、その代替系として従来の手法である *PPAR*・遺伝子プロモーター断片の下流に *Green1* 遺伝子をつなげた DNA

を持つレンチウイルスと *COL1A2* 遺伝子プロモーター断片の下流に *mCherry* 遺伝子をつなげた DNA を持つレンチウイルスを作製し LX-2 細胞に導入した脱線維化評価系も同時に樹立している。

(2) 肝細胞の癌化における星細胞の細胞老化の影響を検討するため、現在、LX-2細胞、HHStcC細胞、マウス星細胞を増殖させ、各々の細胞老化状態を構築中である。予備検討ではあるが、HHStcC細胞を連続74日間培養すると増殖能が著しく低下し(図2)、細胞老化状態になると推定された。

### Doubling time (day)



現在、再現実験をしており、再現性を確認したのち、テロメア長や酸性βガラクトシダーゼ活性などを測定して細胞老化であることを確認する。今後、培地中のタンパクおよび代謝物を測定し、HHStcC細胞の静止期、活性化期、細胞老化期のセクレトームの違いを探索する。

### D. 考察

脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を構築できれば、脱線維化化合物を効率よく選定できる。