

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を生理的状态へ戻し、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との発想で、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; Hepatol 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

Cygb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 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)

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 γ ; 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 HHSteC 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 mRNA 発現抑制 ; PPAR 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 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) 肝構成細胞の主成分である肝細胞、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、 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らう。

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> |
|---|--|

G. 知的所得権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし。

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, 17th International Symposium on Cells of the