

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「肝線維化における CTGF の意義と新規治療標的としての可能性」

平成 24 年度研究分担者氏名 : 竹原 徹郎

所属機関 : 大阪大学大学院医学系研究科 職名 : 教授

平成 25～26 年度研究分担者氏名 : 疋田 隼人

所属機関 : 大阪大学大学院医学系研究科 職名 : 特任助教

研究要旨 :

【目的】

肝線維化は慢性肝炎/肝硬変の中心的病態であるが、その制御機構は複雑で未だ不明な点が多い。我々は以前、肝線維化が自然発症する P53 が持続活性化したマウスの肝組織を用いてマイクロアレイ発現解析を行った結果、線維化の進行したマウスにおいて CTGF(connective tissue growth factor)の著しい上昇が認められた。そこで本研究では肝線維化における CTGF の意義と新規治療標的としての可能性について検討した。

【方法・成績】

野生型マウスに総胆管結紮術(BDL)や四塩化炭素(CCl₄)投与により肝線維化を誘導し、肝組織中 CTGF の発現を検討すると、いずれの線維化モデルでも CTGF の上昇が認められた。またヒト肝細胞癌切除例における非腫瘍部肝組織中の CTGF の発現量を評価すると、線維化の進展とともに CTGF の発現上昇を認めた。次に CTGF の産生源について検討するため、線維化刺激後のマウス肝臓から肝細胞と肝非実質細胞を単離すると、BDL/CCl₄ いずれのモデルにおいても、肝細胞、肝非実質細胞両者とも CTGF の発現上昇を認めた。そこで肝細胞特異的 CTGF 欠損マウス(*Alb-Cre CTGF^{fllox/fllox} ; CTGF Δ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス(*GFAP-Cre CTGF^{fllox/fllox} ; CTGF Δ HSC* マウス)、polyI:C 誘導性肝細胞・肝非実質細胞 CTGF 欠損マウス(*Mx1-Cre CTGF^{fllox/fllox} ; CTGF Δ hep+NPC* マウス)を作成し、BDL/CCl₄ による線維化刺激後の肝組織中 CTGF 発現レベルを評価すると、いずれの線維化モデルにおいても CTGF Δ hep+NPC マウスでのみコントロールマウスに比し有意な発現低下を認めた。肝線維化形成における CTGF の意義について検討するため、肝星細胞株 LX-2 細胞に対し recombinant CTGF を添加すると、 α -SMA、Colla1 の発現が上昇し、肝星細胞の活性化を認めた。また CTGF Δ hep マウス、CTGF Δ HSC マウス、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいて BDL 後の線維化レベルについて評価すると、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいてのみ線維化の軽減を認めた。

【考案】

CTGF は肝細胞と肝非実質細胞の両者から協調して産生され、線維化の進展とともに発現上昇し、肝星細胞を活性化して線維化に対し促進的に作用していることが示唆された。CTGF は肝線維化に対する有効な治療標的になり得ると考えられ、今後 CTGF を標的とした治療の開発が期待される。

H24 年度 ; 研究協力者 : 疋田隼人、小玉尚宏、川口司

H25 年度以降 ; 研究協力者 : 竹原徹郎、川口司、牧野祐紀

A. 研究目的

肝線維化は慢性肝炎/肝硬変の中心的病態であるが、その制御機構は複雑で未だ不明な点が多い。我々は以前、肝線維化が自然発症する P53 が持続活性化したマウスの肝組織を用いてマイクロアレイ発現解析を行った結果、線維化の進行したマウスにおいて CTGF(connective tissue growth factor)の著しい上昇が認められることを見出している。CTGF は肝線維化への関与も想定されているが、未だ十分な解析は行われていない。そこで今回、マウス肝線維化モデルを用いて肝線維化進展における CTGF の意義検討し、肝線維化抑制を目指した新規治療法の開発につなげることを目的とした。

B. 研究方法

マウス肝線維化モデルとして、総胆管結紮術(BDL)及び四塩化炭素(CCl₄)投与モデルを検討した。BDL モデルでは BDL 施行後 3 週間の時点で、四塩化炭素投与モデルでは、0.5mg/kg を週 2 回合計 6 週間投与して、最終投与後 24 時間の時点で評価を行った。各線維化モデルマウスにおいて肝組織中の CTGF 遺伝子発現、線維化の程度について評価したほか、線維化刺激後のマウスより初代培養肝細胞を採取し、コラゲナーゼ・プロナーゼ灌流法を用いて肝実質細胞・非実質細胞を単離し、各々の CTGF 発現量について評価した。

マウスは、*CTGF^{Ylox/flox}* と各 Cre トランスジェニックマウスを交配し、肝細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (*Alb-Cre CTGF^{Ylox/flox}* : CTGF Δ HEP)、polyI:C 誘導性に肝細胞及び肝非実質細胞で CTGF を欠

損するマウス (*MX1-Cre CTGF^{Ylox/flox}* : CTGF Δ LIV) 及び肝星細胞特異的に CTGF を欠損するマウス (*GFAP-Cre CTGF^{Ylox/flox}* : CTGF Δ HSC) を作成した。これらのマウスに BDL や四塩化炭素投与を行い、肝組織中の CTGF および線維化関連遺伝子発現、線維化の程度(Sirius Red 染色/ヒドロキシプロリン定量)について検討した。

細胞実験として肝癌細胞株 HepG2 および肝星細胞株 LX-2 を用いて、肝細胞および肝星細胞に対して recombinant TGF- β や recombinant CTGF で刺激した際の遺伝子発現の変化について検討した。

臨床検体を用いた検討として、ヒト肝細胞癌切除 93 例における背景肝組織(正常肝/慢性肝炎/肝硬変)と非腫瘍部 CTGF 発現レベルとの関連について検討した。

遺伝子組み換え実験は、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会の承認もと、インフォームドコンセントを得た上で行った。すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行った。

C. 研究結果

まず肝線維化と CTGF との関連について検討するため、BDL 及び CCl₄ 投与によるマウス線維化モデルで、線維化とともに CTGF が上昇するかを検討した。両モデルとも線維化刺激によりコラーゲン遺伝子 (Col1a1 及び Col1a2) の発現増強を伴い、シリウスレッド染色による検討で強い線維化の形成を認めたと同時に、肝組織中の

CTGF の発現上昇を認めた。またヒト肝細胞癌切除 93 例における背景肝組織(正常肝/慢性肝炎/肝硬変)と非腫瘍部 CTGF 発現レベルとの関連について検討すると、肝線維化の進展に伴い CTGF の発現上昇を認めた。

次に CTGF の産生源について検討するため、線維化刺激後のマウス肝臓から肝細胞と肝非実質細胞を単離すると、BDL/CC14 いずれのモデルにおいても、肝細胞、肝非実質細胞とも CTGF の発現量はコントロールマウスに比し有意に上昇した。肝細胞および肝非実質細胞が CTGF を産生することを確認するため、肝癌細胞株 HepG2 および肝星細胞株 LX-2 を用いて、CTGF の誘導因子である TGF- β を添加し刺激すると、HepG2・LX-2 いずれも CTGF の発現上昇を認め、肝細胞・肝星細胞ともに CTGF を産生することが示唆された。

そこで肝細胞特異的 CTGF 欠損マウス (*Alb-Cre CTGF^{flx/flx}:CTGF Δ hep* マウス)、肝星細胞特異的 CTGF 欠損マウス (*GFAP-Cre CTGF^{flx/flx}:CTGF Δ HSC* マウス)、polyI:C 誘導性肝細胞・肝非実質細胞 CTGF 欠損マウス (*Mx1-Cre CTGF^{flx/flx}:CTGF Δ hep+NPC* マウス) を作成し、BDL/CC14 投与後の肝組織中 CTGF 発現量についてコントロールマウス(Cre-)と欠損マウス(Cre+)で比較した。その結果、いずれの線維化モデルにおいても、CTGF Δ hep マウス、CTGF Δ HSC マウスでは CTGF の発現は低下せず、CTGF Δ hep+NPC マウスでのみ有意な発現低下を認め、CTGF の発現抑制のためには肝細胞・非実質細胞両者において CTGF を抑制する必要があることが示唆された。

最後に肝線維化形成における CTGF の意

義について検討した。肝星細胞株 LX-2 細胞に対し recombinant CTGF を添加すると、 α -SMA、Col1a1 の発現が上昇し、肝星細胞の活性化を認めた。また CTGF Δ hep マウス、CTGF Δ HSC マウス、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいて BDL 後の線維化レベルについてコントロールマウス(Cre-)と比較すると、各系統ともコントロールマウスと比較し、血清肝胆道系酵素値は同様に上昇を認め、胆汁うっ滞刺激は同程度負荷されたが、CTGF Δ hep+NPC マウスにおいてのみ肝組織中 Col1a1、Col1a2 発現量、シリウスレッド染色陽性領域、ヒドロキシプロリン含有量が有意に減少し、線維化が軽減した。

D. 考 察

今回の結果から、CTGF は線維化の進展とともに肝細胞と肝非実質細胞の両者から協調して産生され、肝星細胞を活性化して線維化に対し促進的に作用していることが示唆された。肝細胞・非実質細胞の両者において CTGF を阻害することで線維化改善効果が得られ、CTGF は肝線維化に対する有効な治療標的になり得ると考えられた。

E. 結 論

CTGF の抑制は線維化を抑制し、CTGF は肝線維化に対する有効な治療標的となり得る。

研究発表

1. 論文発表

1. [Hikita H](#), Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, [Takehara T](#). (2012)

Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol.** 57: 92-100.

2. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer.** 131: 548-557.

3. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. The Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins Bim and Bid are functionally active and restrained by anti-apoptotic B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2) family proteins in healthy liver. **J. Biol. Chem.** 2013; 288(42): 30009.

4. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. **J Hepatol.** 2013; 59(6): 1239-1245.

5. Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Shimizu S, Sakamori R, Miyagi T, Wada H, Nagano H, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful

anticancer therapy against hepatocellular carcinoma. **Hepatol Res.** 2014 Oct 9. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. **第71回日本癌学会学術総会**. 札幌, 9月19 - 21日. (oral presentation)

2. 正田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞障害が誘導する酸化ストレスと肝発癌. **第54回日本消化器病学会総会**. 神戸, 10月10 - 12日. (oral presentation)

3. 小玉尚宏, 正田隼人, 竹原徹郎. (2012) 血小板減少は肝線維化の増悪因子である. **第54回日本消化器病学会総会**. 神戸, 10月10 - 12日. (oral presentation)

4. Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease**. Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

5. Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru

Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2012) Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease**. Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

6. Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. Oxidative stress induced by continuous hepatocyte apoptosis drives liver carcinogenesis independently of regeneration and DNA methylation status. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1 – 5 2013.

7. Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Kaori Mukai, Satoshi Aono, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Wei Li, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. A novel hepato-proliferative effect of carbamazepine during liver regeneration. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1 – 5 2013.

8. Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Tsukasa Kawaguchi, Satoshi Tanaka, Satoshi Shimizu, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara. The 17th International Symposium on Cell of the Hepatic Sinusoid. Continuous apoptosis in hepatocytes induces oxidative stress and leads to liver carcinogenesis. Osaka, Japan, September 23 – 25 2013.

9. Hayato Hikita, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Kawaguchi Tsukawa, Satoshi Shimizu, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. The rheostat regulating hepatocyte apoptosis by BH3-only proteins in developing and adult liver. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells. Osaka, Japan, September 26 – 27 2013.

10. Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Takahiro Kodama, Minoru Shigekawa, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「Significance of Ras pathway and connective tissue growth factor in the development of hepatocellular carcinoma」 The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston USA, 2014年11月7日-11日 発表日 2014年11月9日.

11. Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「The impact of CTGF on liver fibrosis」 第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 10 月 23 日-24 日 発表日 10 月 23 日

12. 牧野祐紀 正田隼人 竹原徹郎 「肝発癌・進展における Ras 経路の活性化と CTGF」 第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 2014 年 10 月 23 日-24 日 発表日 2014 年 10 月 23 日.

13. Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「The impact of CTGF on liver fibrosis」 第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 10 月 23 日-24 日 発表日 10 月 23 日.

14. 牧野祐紀, 正田隼人, 竹原徹郎. 「肝発癌・進展における Ras 経路の活性化と CTGF」 第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW2014) 神戸, 2014 年 10 月 23 日-24 日 発表日 2014 年 10 月 23 日.

15. Yuki Makino, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Yugo Kai, Yasutoshi Nozaki, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 「Significance of connective tissue growth factor (CTGF) for the oncogenesis and progression of hepatocellular carcinoma」日本癌学会第 73 回総会 横浜, 2014 年 9 月 25-27 日 発表日 2014 年 9 月 26 日.

16. 正田隼人, 牧野祐紀, 巽智秀, 川口司, 重川稔, 小玉尚宏, 阪森亮太郎, 宮城琢也, 竹原徹郎. 「Ras 経路の活性化による肝発癌における CTGF の意義」 第 50 回日本肝臓学会総会 東京 2014 年 5 月 29-30 日

発表日 2014 年 5 月 29 日.

17. 牧野祐紀, 正田隼人, 齋藤義修, 川口司, 阪森亮太郎, 宮城琢也, 巽智秀, 竹原徹郎. 「肝線維化形成における CTGF の意義」第 50 回日本肝臓学会総会 東京 2014 年 5 月 29-30 日 発表日 2014 年 5 月 29 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし