

Lx-2 細胞に Sema6A の過剰発現及び発現抑制を行うことにより、COL1A2、COL4A1、 α -SMA の発現が有意に減少及び上昇することを確認した。更に、マウス初代星細胞を分離し Sema6A の精製蛋白を添加することによって、COL1A2、COL4A1、 α -SMA の発現が有意に減少することを確認した。

次に、肝特異的感染を示すアデノ随伴ウイルス 8 型の Sema6A 組み換えウイルス (AAV8-Sema6a) を作成し PDGF-C Tg への感染実験を行った。AAV8-Sema6a-GFP では感染後 21 日間にわたり、肝内での Sema6A の発現が確認された (図 3)。

図3. 肝特異的アデノ随伴ウイルス(8型)によるSema6Aの過剰発現

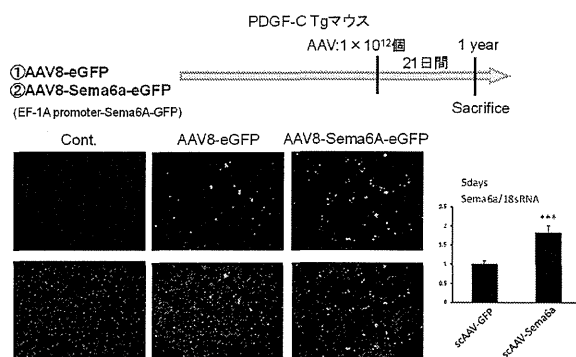
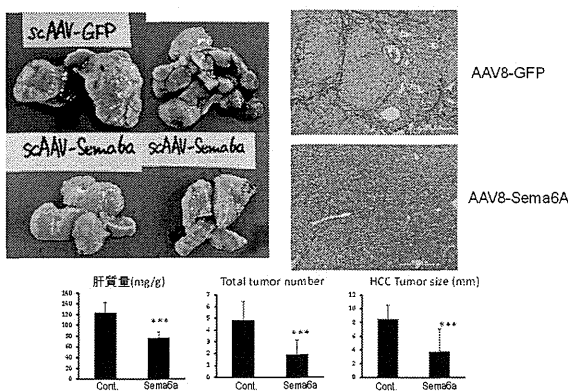


図4. AAV8-Sema6Aによる線維化抑制効果



次に、生後 11 月齢の PDGF-C Tg に AAV8-Sema6a を感染させ 21 日後の肝線維化・肝腫瘍発生を解析した (図 4)。AAV8-Sema6a 感染マウスでは肝線維化の改善、肝重量の低下、腫瘍径、腫瘍数の有意

な低下が認められた。また、COL1A2、COL4A1、 α -SMA、TGF- β 、CD34、AFP、Myc 及び IL1 β の発現低下を認め、線維化、血管新生、癌化シグナルの低下が示された。

Lx-2 細胞を用いた検討では Sema6A は PKC α の発現抑制により TGF- β による Smad3、PDGFR β 及び α -SMA の発現誘導を抑制していた。また Sema6A は Huh-7 細胞での Stat3 のリン酸化を抑制した。

D. 考察

Semaphorin 遺伝子ファミリーは神経軸索の伸長などの細胞移動を制御するガイダンス因子であり、標的細胞の受容体であるプレキシシンと相互作用し、免疫応答、器官形成、血管新生に関与するとされる。また、Sema6A は発生期の小脳細胞骨格の再編成、軸索伸長ガイダンスに重要であるとの報告がある。これまでに、Semaphorin 遺伝子と線維化進展に関する報告は無い。今回、Sema6A の肝に於ける線維形成に及ぼす影響を検討した。

Sema6A の Lx-2 細胞での過剰発現や初代星細胞への精製蛋白の添加により、線維化発現遺伝子の発現低下が認められた。さらに肝特異的 AAV8 型による Sema6A の遺伝子導入により PDGF-C Tg の肝線維化と腫瘍形成を有意に抑制した。Sema6A は Lx-2 細胞での PKC α 、Smad3、PDGFR β 及び α -SMA の発現を抑制した。また Sema6A は Huh-7 細胞での Stat3 のリン酸化を抑制した。Sema6A の線維化抑制・腫瘍発生抑制機序として、星細胞の活性化抑制、肝細胞の癌化シグナルの抑制が示唆される。

今後、さらに Sema6A の線維化・腫瘍抑

制の機序を明らかにするためには以下のような実験が必要と考えられる。

1) AAV8-Sema6A-GFP 組み替えウイルスをマウス肝に感染させ、肝細胞・肝星細胞・マクロファージを分画し、各分画での導入効率の解析を行う。2) 肝細胞及び肝星細胞 (Lx-2 細胞) のそれぞれの Sema6A 過剰発現細胞を樹立し、抗線維化シグナルの解析を行う。3) Sema6A トランスジェニックマウスを作成し、肝臓での線維化シグナルの解析を行う。4) Sema6A の細胞外ドメインを精製し、創薬としての可能性を検証する。

E. 結論

線維化関連 miR-214 のターゲット解析から、新たな線維化調節因子 Sema6A を同定した。Sema6A は抗線維化、抗腫瘍効果を有する新たな治療分子である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T Terashima, T Yamashita, N Iida, T Yamashita, H Nakagawa, K Arai, K Kitamura, T Kagaya, Y Sakai, E Mizukoshi, M Honda, S Kaneko. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Hepatol Res (in press)
- 2) K Yamada, E Mizukoshi, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, Y Takeshita, H Misu, T Takamura, S Kitamura, Y Zen, Y Nakanuma, M Honda, S Kaneko.

Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Liver Int (in press)

- 3) T Yamashita, A Kitao, O Matsui, T Hayashi, K Nio, M Kondo, N Ohno, T Miyati, H Okada, T Yamashita, E Mizukoshi, M Honda, Y Nakanuma, H Takamura, T Ohta, Y Nakamoto, M Yamamoto, T Takayama, S Arai, XW Wang, S Kaneko. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Hepatology 60(5):1674-85, 2014.
- 4) K Ishikura, H Misu, M Kumazaki, H Takayama, N Matsuzawa-Nagata, N Tajima, K Chikamoto, F Lan, H Ando, T Ota, M Sakurai, Y Takeshita, K Kato, A Fujimura, KI Miyamoto, Y Saito, S Kameo, Y Okamoto, Y Takuwa, K Takahashi, H Kidoya, N Takakura, S Kaneko, T Takamura. Selenoprotein P as a diabetes-associated hepatokine that impairs angiogenesis by inducing VEGF resistance in vascular endothelial cells. Diabetologia 57(9):1968-76, 2014.
- 5) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, K Murai, T Shiimoto, H Okada, R Takabatake, A Tokumaru, Y Sakai, T Yamashita, SM Lemon, S Murakami, S Kaneko. Impaired IFN signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the TGF- β signaling pathway. Hepatology 60(5):1519-30, 2014
- 6) T Yamashita, S Kaneko. Orchestration of hepatocellular carcinoma development by

- diverse liver cancer stem cells. J Gastroenterol 49(7):1105-10, 2014.
- 7) M Kitahara, E Mizukoshi, Y Nakamoto, N Mukaida, K Matsushima, S Kaneko. Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Int Immunopharmacol 21(2):346-353, 2014.
- 8) N Oishi, T Yamashita, S Kaneko. Molecular biology of liver cancer stem cells. Liver Cancer 3(2):71-84, 2014.
- 9) F Lan, H Misu, K Chikamoto, H Takayama, A Kikuchi, K Mohri, N Takata, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, Y Takeshita, H Noda, Y Matsumoto, T Ota, T Nagano, M Nakagen, KI Miyamoto, K Takatsuki, T Seo, K Iwayama, K Tokuyama, S Matsugo, H Tang, Y Saito, S Yamagoe, S Kaneko, T Takamura. LECT2 functions as a hepatokine that links obesity to skeletal muscle insulin resistance. Diabetes 63(5):1649-64, 2014.
- 10) Y Takeshita, T Takamura, M Honda, Y Kita, Y Zen, KI Kato, H Misu, T Ota, M Nakamura, K Yamada, H Sunagozaka, K Arai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Diabetologia 57(5):878-90, 2014.
- 11) T Shimakami, M Honda, T Shirasaki, R Takabatake, F Liu, K Murai, T Shiimoto, M Funaki, D Yamane, S Murakami, SM Lemon, S Kaneko. The acyclic retinoid Peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Sci Rep 4:4688, 2014.
- 12) H Nakagawa, E Mizukoshi, N Iida, T Terashima, M Kitahara, Y Marukawa, K Kitamura, Y Nakamoto, K Hiroishi, M Imawari, S Kaneko. In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. Cancer Immunol Immunother 63(4):347-56, 2014.
- 13) K Kato, T Takamura, Y Takeshita, Y Ryu, H Misu, T Ota, K Tokuyama, S Nagasaka, M Matsuhisa, O Matsui, S Kaneko. Ectopic fat accumulation and distant organ-specific insulin resistance in Japanese people with nonalcoholic Fatty liver disease. PLoS One 9(3): e92170, 2014.
2. 学会発表
なし
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

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

遺伝子改変マウスの作成と病態解析

研究分担者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

研究要旨：C型慢性肝は炎症・脂肪化・線維化を特徴とし肝がんを発症する。これまでに、非環式レチノイド（NIK-333, ペレチノイン）の肝発がん抑制機構として肝線維化抑制・脂肪抑制作用を有することを報告した（Cancer Research 2012）。本年度は動脈硬化高脂肪（Ath+HF）食NASHマウスモデルの系を用いて、HCVトランスジェニックマウス（HCV Tg）にAth+HF食を投与し、肝炎・肝がんにおけるPKM（pyruvate kinase, muscle）の発現意義について解析した。また、臨床検体PKL/PKM1/PKM2の発現を比較した。正常肝ではPKLの発現が優位であり、炎症・線維化進展に伴い、PKM1/PKM2の発現が上昇し、肝がんではPKM2の発現が上昇した。非がん部に於けるPKM2の発現上昇は肝星細胞の活性化と関連していた。また、がん部に於けるPKM2の発現上昇はがん幹細胞性と関連し、肝がんの悪性度・予後と関連すると考えられた。以上よりPKM2は、肝線維化・肝がんの新たな標的分子となり得る可能性が示唆された。

A. 研究目的

我が国におけるHCV感染患者数は多く、ウイルス排除後も肝がんの発生が予想される。本研究はC型慢性肝炎から肝がんに至る病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

本研究は動物モデルを用いてC型慢性肝炎から肝がんに至る病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

B. 研究方法

本年度は、動脈硬化高脂肪（Ath+HF）食をC57/B6マウス（WTマウス）及びHCVト

ランスジェニックマウス（HCV Tg）（Gastroenterology 2002）に与え肝脂肪化・線維化進行の評価を行った。また、筋型ピルビン酸キナーゼ pyruvate kinase, muscle（PKM）の肝線維化・肝がんにおける意義について解析した。

（倫理面への配慮）

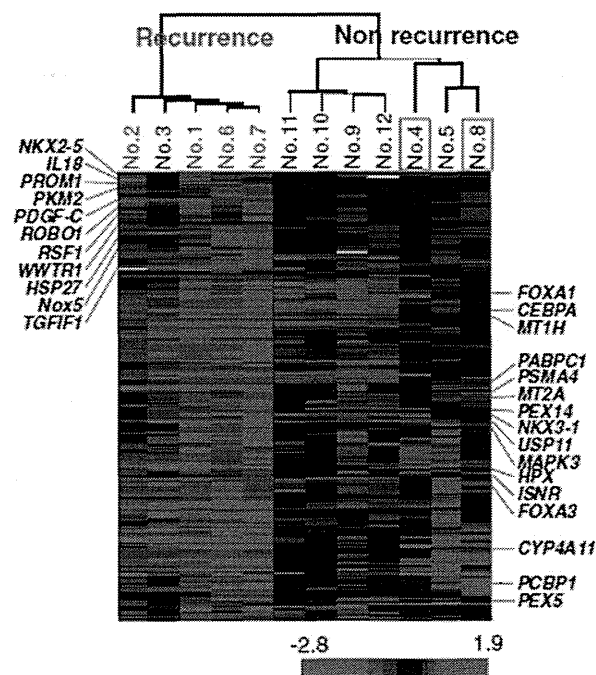
遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針（平成18年6月1日制定）に従った。倫理面、実験手技に関して金沢大学動物実験施設に申請し承認を得た。

C. 研究結果

現在、HCV関連肝がんの再発抑制を目的として非環式レチノイド (NIK-333, ペレチノイン) の臨床試験が行われている。これまでに肝線維化からの肝発がんモデルマウスであるPDGF-C Tg マウスを用い、ペレチノインの肝線維化・肝発がん抑制効果を明らかにした。(Cancer Research 2012)。さらに、ペレチノインはオートファジーを活性化させることで肝脂肪化・炎症を抑制し肝発がんを抑制することを昨年度の班会議で報告した(論文投稿中)。

また、ペレチノイン投与前と投与中の肝組織の遺伝子発現から、肝がん再発に関連する遺伝子群を同定した(BMC Cancer 2013)(図1)。

図1 ペレチノイン投与中の肝内遺伝子発現再発群と非再発群で遺伝子発現が異なる。



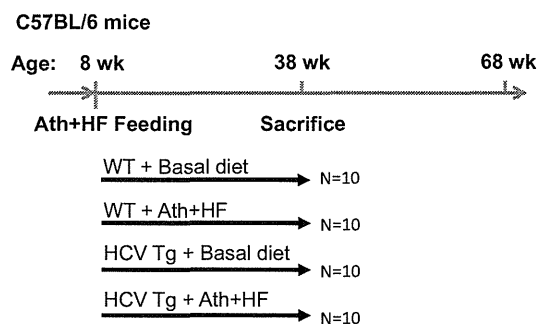
再発群で発現上昇する遺伝子としてPDGF-C、Prom1(CD133)などに加えPKM(pyruvate kinase, muscle)の発現上昇が認められた。PKMは解糖系の最終段階の

律速酵素(ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸の反応)であり、選択的スプライシングによりExon10を欠損したPKM1とExon9を欠損したPKM2の2種類のアイソフォームを形成する。正常肝組織は、PKMではなくPKL(liver)が発現している。PKM2はがん細胞に於けるWarburg effectを担う解糖系の酵素として注目され、各種がん細胞での発現上昇が報告されている。また、PKM2は解糖系酵素としての役割の他に転写因子としての機能を有し、Wnt/ β -cateninの活性化、STAT3の活性化を介しがん化シグナルの一翼を担っている。これまでに、肝炎・肝がんにおけるPKM2の意義は明らかではない。

今回、以前に報告した食餌性NASHマウスモデル(Hepatology 2007)の系を用いて、動脈硬化高脂肪(Ath+HF)食をHCV Tgに与え、肝炎状態に於けるPKM2の発現意義を解析した。更に、臨床検体、肝がん培養細胞を用いて肝がん組織に於けるPKM2の意義を検討した。

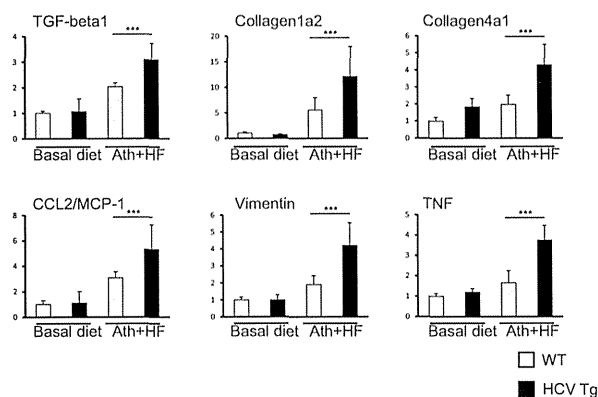
マウス実験プロトコルを図2に示した。Ath+HF食をHCV Tgに投与すると、劇症肝炎を発症し、死亡するマウスが認められた(詳細につき解析中)。今回、生存したマウスを用いて解析を行った。

図2 実験プロトコル



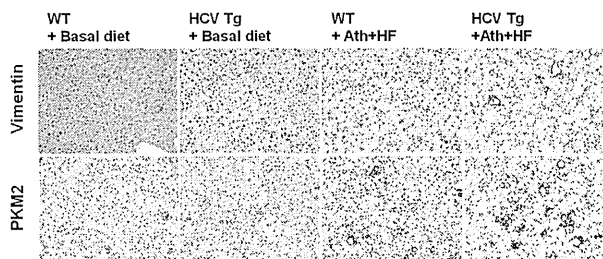
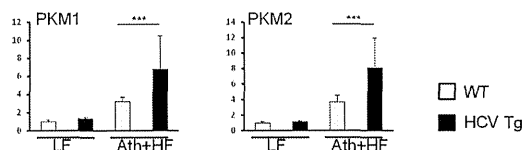
コントロール食では WT マウス及び HCV Tg 群で炎症・線維化シグナルに差は見られなかった。Ath+HF 食では HCV Tg で WT マウスに比し、TGF- β 、COLA1A、COLA4A1、CCL2、Vimentin 及び TNF の有意な亢進を認めた(図3)。

図3 線維化関連シグナルの遺伝子発現



PKM1/PKM2 の発現は Ath+HF 食を HCV Tg に投与した群で有意に高発現しており、免疫組織学的染色では肝の間質に多く発現していた(図4)。

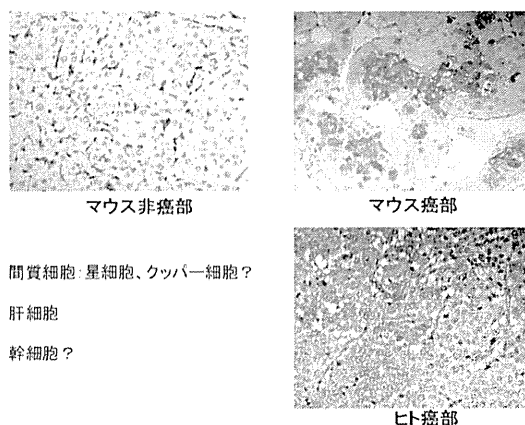
図4 肝線維化進展とPKM2発現



一方、マウス肝がん組織及びヒト臨床検体でのがん部での PKM2 の発現は肝実質細胞や核で発現しており、非がん部とがん部での PKM2 の発現意義が異なっていると考えられた(図5)。

マウス初代星細胞を分離し、PKM1/PKM2 の発現をみると筋線維芽様細胞へ形質転換

図5 非癌部・癌部におけるPKM2発現の意義

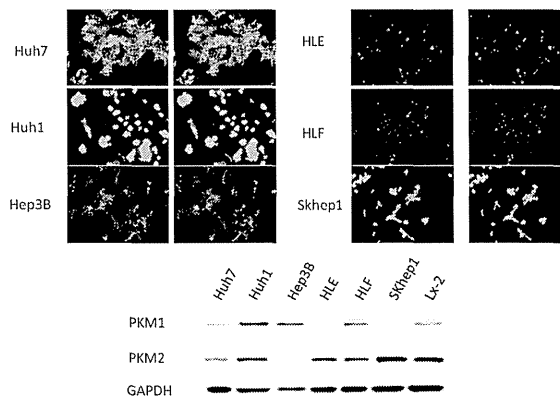


間質細胞・星細胞、クッパー細胞?
肝細胞
幹細胞?

に伴い PKM1/PKM2 の発現上昇が認められた。また、ヒト星細胞由来培養細胞(Lx-2細胞)において PKM2 の発現抑制を行うと、線維化関連遺伝子の発現抑制が認められた。以上より、肝星細胞の活性化に伴い PKM1/PKM2 の発現上昇が認められることが明らかとなり、非がん部における PKM1/PKM2 は肝線維化進行と関連していると考えられた。

がん部における PKM2 の発現は肝実質細胞や核であり、各種、肝がん培養細胞でも同様の知見が得られた(図6)。

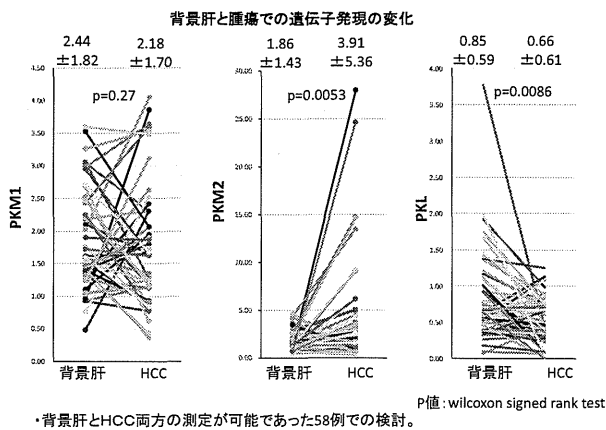
図6 肝癌細胞株におけるPKMの発現



58例のC型肝がん症例のがん部と非がん部で PKM1/PKM2/PKL の遺伝子発現を比較した。PKM2 はがん部で有意に発現亢進し、PKL はがん部で有意な発現の低下を認めた。

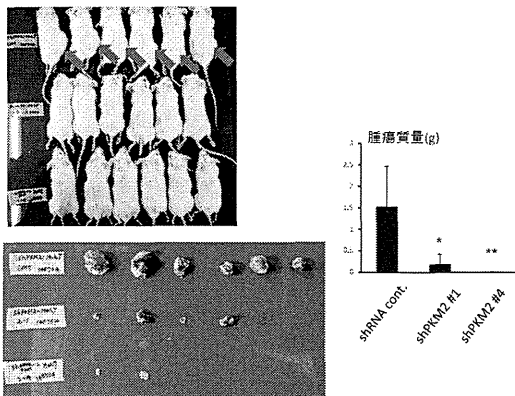
また、PKM2 高発現群では予後不良であった。一方、PKM1 の発現はがん部・非がん部で有意差を認めなかった (図 7)。

図 7 肝癌組織に於けるPKM2の意義



次に、マウス xenograft モデルにて PKM2 の肝癌細胞での発現意義を解析した。PKM2-Sh-RNA を恒常的に発現する Huh-7 細胞を樹立し SOD/SCID マウスに移植した。PKM2 発現抑制により著明な腫瘍形成が認められた (図 8)。

図 8 PKM2ノックダウンによる腫瘍形成能の低下



また、PKM2発現抑制によりEpCAMやCD133 の発現低下が認められ、PKM2は肝癌の幹細胞性維持に関与していると考えられた。

D. 考察

PKM2 はがん細胞に於ける Warburg effect を担う解糖系の酵素として注目さ

れ、各種がん細胞での発現上昇が報告されている。また、PKM2 は解糖系酵素としての役割の他に転写因子としての機能を有し、Wnt/ β -catenin の活性化、STAT3 の活性化を介したがん化シグナルの一翼を担っている。今回、肝炎・肝癌における PKM2 の意義を解析した。

Ath+HF 食を HCV Tg に投与すると、WT マウスに比し、より強い脂肪化・線維化の進行が認められ、TGF- β 、COLA1A、TNF などの有意な発現亢進を認めた (図 3)。また、PKM1/PKM2 の発現は Ath+HF 食を HCV Tg に投与した群で有意に高値であり、肝の間質に多く発現していた (図 4)。さらに、マウス初代星細胞を分離し PKM1/PKM2 の発現をみると筋線維芽様細胞へ形質転換に伴い PKM1/PKM2 の発現上昇が認められた。臨床サンプルを用いた解析では、がん部で PKL の発現低下、PKM2 の発現上昇を認め、PKM1 はがん部・非がん部で差を認めなかった。これらのことから、正常肝では PKL の発現が優位であり、炎症・線維化進展に伴い、PKM1/PKM2 の発現が上昇し、肝癌では PKM2 の発現が上昇すると考えられた。しかしながら、肝癌細胞株のなかでも PKM1 が過剰発現している細胞も認められ、PKM1/PKM2 の肝癌における役割について、更に解析する必要があると考えられる。

今回の検討で、炎症・線維化進展に伴い、PKM1/PKM2 の発現が上昇したことから、PKM をターゲットとした抗炎症・線維化治療の可能性が示唆される。また、マウス xenograft モデルの結果から、PKM2 が肝癌細胞に対する新たな治療標的となり得る可能性が示され、更なる検討が必要と考え

られた。

E. 結論

PKM2 の肝炎・肝がんにおける意義について検討した。

- 1) 非がん部に於けるPKM2の発現上昇は線維化・星細胞の活性化と関連する可能性が示唆された。
- 2) がん部に於ける PKM2 の発現上昇はがん幹細胞性と関連し、肝がんの悪性度・予後と関連すると考えられた。
- 3) PKM2 は、肝線維化・肝がんの標的分子となり得る可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. Selitsky SR, Baran-Gale J, **Honda M**, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. *Sci Rep*. 2015 Jan 8;5:7675. doi: 10.1038/srep07675.
- 2) Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. Hum Genet. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsunashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, **Honda M**, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S,

Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. 2014 Dec 17. [Epub ahead of print]

- 3) Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatol Res*. 2014 Oct 16. doi:10.1111/hepr.12436. [Epub ahead of print]
- 4) Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. *Hepatology*. 2014. Nov;60(5):1519-30. doi: 10.1002/hep.27277.
- 5) Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Hashimoto E, **Honda M**, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Harada K, Arai K, Miyake Y, Abe M, Taniyai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. *Hepatol Res*. 2014 Sep 14. doi: 10.1111/hepr.12423. [Epub ahead of print]

- 6) Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int.* 2014 Sep 15. doi: 10.1111/liv.12685. [Epub ahead of print]
- 7) The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Diabetologia.* 2014 May;57(5):878-90. doi: 10.1007/s00125-013-3149-9.
- 8) P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, **Honda M**, Kaneko S. *Cancer Immunol Immunother.* 2014 May;63(5):479-89. doi: 10.1007/s00262-014-1529-8.
- 9) The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, **Honda M**, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. *Sci Rep.* 2014 Apr 15;4:4688. doi: 10.1038/srep04688.
- 10) Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi M, **Honda M**, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology.* 2014 Nov;60(5):1674-85. doi: 10.1002/hep.27093.
- 11) New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, **Honda M**, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. *PLoS One.* 2014 Feb 10;9(2):e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.
2. 学会発表
なし
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

3. その他
特になし

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

病態進展と幹細胞との関連解析

研究分担者：出澤 真理 東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：我々の研究グループは間葉系幹細胞の数パーセントの比率で多能性幹細胞 Multilineage-differentiating stress enduring (Muse)細胞が含まれていることを見出した。この細胞は1細胞から3胚葉性の細胞への分化能と自己複製能を有し、かつ腫瘍性を持たない。骨髄や脂肪、皮膚、臍帯などの間葉系組織から多能性 (SSEA-3) と間葉系 (CD105) マーカー二重陽性細胞として精製可能である。すなわち生体に存在する腫瘍性を持たない多能性幹細胞である。本プロジェクトでは急性および慢性肝障害モデルにおけるMuse細胞の有効性を検討し、さらに生体内に投与したときの体内動態や分化能を探る。

A. 研究目的

幹細胞の解析を行い新規治療法の開発を目指す。ヒト臨床サンプルを用いて標的分子、および幹細胞の動態を解析し、実験モデルから得られた結果の検証を行う。

B. 研究方法

SCID マウス (10-12 週齢, 雄)の急性肝障害モデルとして腹腔内に四塩化炭素 1.5 ml/Kg 投与し劇症肝炎を作成する。投与 1 日後にヒト骨髄由来 Muse 細胞と 2 万細胞、尾静脈に投与した。慢性肝障害モデルとして四塩化炭素 0.5 ml/Kg を週に 2 回腹腔内投与を 8 週間続け、平行してモデル作成開始から 2 週、4 週、6 週でそれぞれ 5 万細胞のヒト骨髄由来 Muse 細胞と尾静脈から投与した。Muse 細胞は GFP-lentivirus で標識したヒト骨髄間葉系幹

細胞を SSEA-3 を用いて FACS で Muse 細胞を陽性細胞として、また陰性細胞を Muse 細胞以外の間葉系幹細胞 (非 Muse 細胞) として分けて投与した。動物の体重等一般状態の他、肝機能酵素を計測し、組織学的検討を行う。

(倫理面への配慮)

実験におけるヒト細胞使用に関しては「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会」より「ヒト骨髄および臍帯組織由来間葉系細胞の解析研究 (2008-82 号)」で承認をすでに受けている。遺伝子導入実験は「東北大学遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている (研研 76-20-35 号)。また動物実験委員会の承認に関しては 2011 医動-282、2011 医動-283、2011 医動-284、2011 医動-285 にて承認を得た上で実験を行っている。

C. 研究結果

急性モデル（劇症肝炎モデル）：移植30日後、組織評価を行ったところMuse群では肝臓内にヒトゴルジ体、およびヒトミトコンドリア陽性のヒトMuse細胞を示唆する細胞が $\sim 2\%/1\text{mm}^2$ 視野中の全細胞数として計測された、非Muse群では細胞の生着がほとんど見られなかった。Muse群における生着したMuse細胞はHeppar1, human albumin陽性の肝細胞マーカー陽性細胞として肝臓内に生着していた他、Cytokeratin-7陽性の胆管系細胞としても生着していることが確認された。血液中の総蛋白、アルブミン、ビリルビン、AST, ALTはそもそも、急性モデルでは9日ほどで自然に健常レベルに回復してしまうため、細胞移植による機能回復を計ることができなかった。これらのパラメーターはMuse群、非Muse群、PBS群間で有意差が無かった。このことからMuse細胞は血管に投与されたのち、傷害された肝組織を認識し、生着の後、胚葉を超えて中胚葉から内胚葉系の自発的分化を行い、肝組織を構成する細胞に分化すると考えられた。

慢性モデル（肝線維化モデル）：移植8週で評価を行ったところ、 $\sim 6\%/1\text{mm}^2$ 視野中の全細胞数のヒトMuse細胞生着が確認された。一方非Muse細胞の生着はほとんど見られなかった。生着したMuse細胞はHepPar-1, human albumin, human anti-trypsinを発現し、さらには機能的マーカーであるhuman CYP1A2, human Glc-6-Paseの発現も確認された。機能においても統計的有意差を持って非Muse群、PBS群と比較しMuse細胞

における総ビリルビン、アルブミンの回復が確認された。またSirius red, Masson trichrome染色において線維化の有意な抑制がMuse群で見られた。このことから傷害肝臓に生着したMuse細胞は自発的に肝細胞に分化し、機能回復をもたらすことができることが示唆された。

D. 考察

肝組織に生着した Muse 細胞は肝細胞のマーカーである Albumin, Heppar1 を発現していた。一方非 Muse 細胞は 移植の初期段階から肝臓での生着が見られなかった。このことから、傷害組織を認識する能力に Muse 細胞と非 Muse 細胞の間に差があることが示唆された。また Muse 細胞は多能性を持ち、肝細胞への分化能力を示すが非 Muse 細胞にはそのような能力が無いことが分かっている（PNAS, 2010; PNAS, 2011）。従って間葉系幹細胞の中で数パーセントを占める多能性の Muse 細胞は肝組織再建に直接寄与すると期待される。今後は機能評価がより明確な他のモデル（脂肪肝、慢性肝硬変モデルなど）によって機能的評価を行うことが必要であると考えられる。

E. 結論

Muse 細胞は肝細胞などの肝構成細胞に自発的に分化することによって肝修復に寄与する一方、Muse 細胞以外の間葉系幹細胞にこのような能力は無いことが急性肝障害モデル（劇症肝炎）、慢性肝障害モデル（肝線維化モデル）において示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wakao S, Akashi H, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, that reside in human mesenchymal tissues. Spinal Surgery (in press).
- 2) Okano T, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. Anat. Rec (Hoboken). 297(1):4-5, 2014.
- 3) Albertine KH, Dezawa M. A new age of regenerative medicine: fusion of tissue engineering and stem cell research. Anat. Rec (Hoboken). 297(1):1-3, 2014.
- 4) Wakao S, Akashi H, Kushida Y, Dezawa M. Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, reside in human mesenchymal tissues. Pathology International. 64(1):1-9, 2014.
- 5) Y. Kuroda, M. Dezawa. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent Muse cells, in basic research and regenerative medicine. Anat Rec. 297(1):98-110, 2014.
- 6) Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with non-tumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. Stem Cells Dev. 23(7):717-28, 2014.

2. 学会発表

- 1) Mari Dezawa Discovery of Muse Cells

shifts the Paradigm of Mesenchymal Stem Cells, 日仏再生医学シンポジウム, 2014年11月20日, 東京

- 2) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第56回日本先天代謝異常学会, 2014年11月14日, 仙台
- 3) 出澤真理, 再生医学の現状とMuse細胞の将来展望, 弘前大学整形外科学講義, 2014年11月11日, 弘前大学
- 4) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 弘前再生医療講演会, 2014年11月10日, 弘前大学
- 5) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 第31回細胞療法研究会, 2014年11月4日, 愛知医科大学
- 6) 出澤真理, Muse細胞の発見によってもたらされる間葉系幹細胞移植のパラダイムシフト, 未来医療開発プロジェクト (M I A S T) シンポジウム, 2014年8月8日, 岩手医科大学
- 7) 出澤真理, 腫瘍性の無い生体由来多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 第14回日本外傷歯学会, 2014年7月26日, 大阪歯科大学
- 8) 出澤真理, 再生医療研究の現状とMuse細胞の将来展望, 特許庁 平成26年度先端技術研修, 2014年6月20日, 東京
- 9) 出澤真理, 腫瘍性の無い新しい多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, 経和会総会, 2014年6月14日, 東京
- 10) 出澤真理, 生体に内在する多能性幹細胞

胞 Muse細胞の担う機能 ; Regenerative homeostasisとstem cell failureの提唱, 第20回神戸全体会議, 2014年6月13日, 神戸

2014, 2014年4月12日, 台北 (台湾)

11) 出澤真理, 骨髄と結合組織を足場とする多能性幹細胞 Muse細胞の担う生体内修復機能, 第46回日本結合組織学会学術大会/第61回マトリックス研究会大会合同学術集会, 2014年6月6日, 名古屋

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

12) 出澤真理, Muse細胞発見のもたらす間葉系幹細胞のパラダイムシフト, 第55回日本神経学会, 2014年5月24日, 福岡

13) 出澤真理, 腫瘍性の無い新しい多能性幹細胞 Muse細胞の発見: ヒトは失われた機能を取り戻せるのか, Medical Cooperation Meeting of Hepatitis (MCH), 2014年5月14日, 宮城県石巻市

14) Mari Dezawa Discovery of Muse cells, novel pluripotent stem cells that reside in human mesenchymal tissues: implications for new concepts of regenerative homeostasis and stem cell failure, Seminar at Nelson Biological Labs in Rutgers, 2014年4月30日, Rutgers, The State University of New Jersey, USA

15) Mari Dezawa Making three dimensional human colored skin by using Muse cells, a novel type of non-tumorigenic pluripotent stem cells, Stem Cells and Tissue Injury Platform Session at EB 2014, 2014年4月28日, San Diego, USA

16) Mari Dezawa Discovery of Muse Cells, Novel Pluripotent Stem Cells That Reside in Human Mesenchymal Tissues: Implications for New Concepts of Regenerative Homeostasis and Stem Cell Failure, PPSSC

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

病態進展の病理学的解析と制御法の開発

研究分担者：坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部 教授

研究要旨：肝細胞癌並びに背景肝の分子病理学的多様性を解明することで、発癌初期の分子異常を明らかにする。具体的には、背景肝障害の定量的評価、癌関連遺伝子異常・シグナル伝達異常・幹細胞マーカー発現に着目した解析を行う。本年度は、背景肝における線維成分の定量解析を行い、エラスチンはコラーゲンに比して後期に蓄積を認め、線維化進展例における独立した発癌リスク因子となることが示された。Wnt/ β -catenin, LGR5に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析において、OATP1B3の発現が、Wnt/ β -catenin 標的遺伝子群の発現との間に強い関連がある事を示した。EOB-MRIの肝細胞相において、Wnt/ β -catenin activated HCCを、感度78.9%、特異度81.7%で予測できることを示した。

A. 研究目的

肝細胞癌の多くは肝炎ウイルスの持続感染による慢性障害肝を背景に生じるが、中でもHCVからの発癌の多くが、前癌病変の異型結節ないし血管新生を伴わない早期肝細胞癌、その脱分化過程に相当する結節内結節型の肝細胞癌、そして転移能を有する進行肝細胞癌へと多段階的に発生・進展することが示されてきている。しかし、その詳細な分子機構、特に発癌初期の分子異常についてはほとんど明らかにされていない。本研究では、そのような肝細胞癌の分子病理学的多様性を解明することで、ウイルス陰性化後も肝細胞癌が顕在化することをより正確に予測、診断し、さらには適切な予防、治療を可能とすることを目指す。

B. 研究方法

1) 背景肝障害の定量と発癌リスク評価

1. 生検標本における膠原線維・弾性線維定量とリスク評価

2) がん関連遺伝子異常・シグナル伝達異常と発癌・進展

1. Bmi-1、c-Myc の発現亢進・動態解析
2. その他癌関連遺伝子異常・シグナル伝達異常の分子病理学的検討

3) 幹細胞マーカー発現と発癌・進展

1. Wnt/ β -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析
2. 各種幹細胞マーカーの発現パターンの解析と上記遺伝子変異・シグナル伝達異常との関連性の検討

(倫理面への配慮)

本研究計画では、癌組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析を目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号16-34-4）。

C. 研究結果

1) 肝線維化の定量と発癌リスク評価

C型慢性肝炎肝生検標本をEVG染色後デジタル化し、コラーゲンとエラスチンの定量的な解析を行った（武蔵野赤十字病院との共同研究）。各線維成分の組織占有率は、Fステージと相関することが示された。特にエラスチンはコラーゲンに比して後期に蓄積を認め、F3、F4の鑑別に有用である事が示された。さらに、発癌の有無との比較解析を行い、エラスチンが発癌リスクの指標として有用であることを示した。特に線維化進展例においては、独立したリスク因子であることが示された。

2) Wnt/ β -catenin, LGR5 に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析

β -catenin の遺伝子変異は約40%と、C型肝炎を背景とする肝細胞癌で最も高率に見られる。まず、OATP1B3がEOB-MRIの肝細胞相における腫瘍の増強効果と最も強く相関するトランスポーターである事を示した。次に、OATP1B3の発現が、Wnt/ β -catenin

標的遺伝子群の発現との間に強い関連がある事を示した。また、ヒト肝細胞癌株KYN-2細胞にLiCl処理を行う事で、Wnt/ β -catenin signalの活性化が見られると共にOATP1B3の遺伝子発現が上昇することをin vitroにおいて示した。さらに、EOB-MRIの肝細胞相において増強される腫瘍を検出することにより、Wnt/ β -catenin activated HCCを、感度78.9%、特異度81.7%で予測できることを示した。

D. 考察

・エラスチンは、独立した発癌リスク因子となることが示されたが、SVR後の発癌予測への有用性の検討など、その意義についてより多数例での解析が望まれる。

・OATP1B3陽性肝細胞癌は、Wnt/ β -catenin activated subclassに属することが示され、MRIにてその診断の可能性が示された。Wnt/ β -catenin activated subclassは、Biliary/stem cell marker positive subclassと異なるサブクラスに分類されることから、悪性度の予測に有用と考えられる。

E. 結論

背景肝におけるコラーゲン、エラスチン成分の定量的な評価が発癌リスク予測に有用である可能性が示唆された。Wnt/ β -catenin, LGR5に着目した典型的肝細胞癌の発生進展機構解析において、OATP1B3の発現が、LGR5を含むWnt/ β -catenin 標的遺伝子群の発現との間に強い関連がある事、MRIにてサブクラス診断の可能性を示した。来年度は、発癌早期における

遺伝子変異、癌関連分子発現異常の詳細な病理学的解析、LGR5 の機能解析を含めた、Wnt/ β -catenin activated HCC と、Biliary/stem マーカー陽性 HCC との関連性の検討を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ueno A, Masugi Y, Yamazaki K, Komuta M, Effendi K, Tanami Y, Tsujikawa H, Tanimoto A, Okuda S, Itano O, Kitagawa Y, Kuribayashi S, Sakamoto M. OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/ β -catenin signalling and represents the transporter of gadoxetic acid in hepatocellular carcinoma. J Hepatol. 61; 1080-1087, 2014.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

ヒトRNA依存性RNAポリメラーゼを標的としたがん幹細胞研究

研究分担者：増富 健吉 国立がん研究センター研究所 がん幹細胞研究分野 分野長

研究要旨：最近の報告によると、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase:以下TERT)は肝細胞がんにおけるドライバー遺伝子の中でも最も重要な分子であることが明らかとなった (Nature Genetics 2014, Totoki *et al.*)。我々のグループは、これまでに、TERTが従来から知られていた逆転写酵素活性以外に、RNA dependent RNA Polymerase (RdRP)活性を有することを見出し、TERTのRdRP活性ががん幹細胞の機能維持に関わることを報告してきた。本研究では、肝細胞がん発がんプロセスにおけるTERT-RdRP活性の役割を解明しTERT-RdRPの新たな治療標的としての可能性を検討することを目的とした。

A. 研究目的

ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase:以下TERT)が肝がん発がんにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。本分担研究では肝細胞がん発がんプロセスにおけるTERT-RdRP活性の意義の検討を行うことにより、肝細胞がん治療戦略としてTERT-RdRP標的治療の可能性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

1. 本分担研究開始前に既に同定していたRdRP 特異的阻害作用を有するエリブリンに対する感受性と TERT 発現量の相関の検討を行った。(細胞株入手の手配が迅速に進んだ卵巣がん細胞株を用いての検討を行った。)

2. TERT の発現量を規定するとされている TERT プロモーター領域の変異の有無の検討を肝細胞がん株を用いて行った。

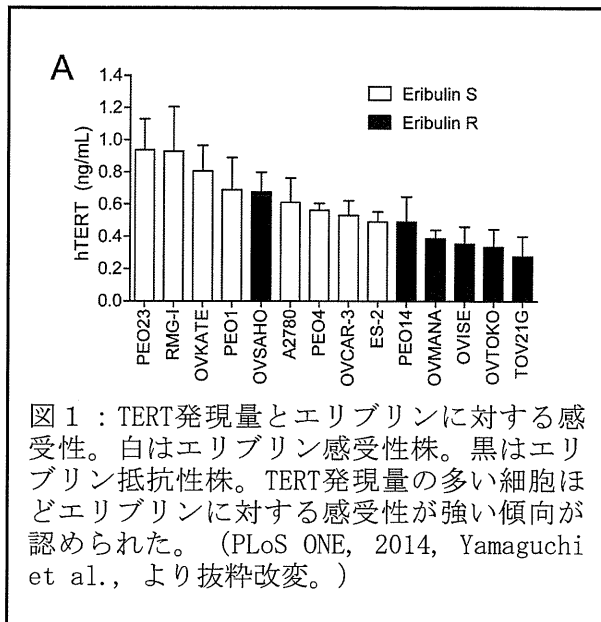
(倫理面への配慮)

該当事項なしのため特記なし

C. 研究結果

1. 14 種類の卵巣がん細胞株を用いた検討では TERT 発現量が多い細胞のほうが TERT-RdRP 活性阻害作用をもつエリブリンに対する感受性が高いことが見出された(図1)。

2. 5 種類の肝細胞がん細胞株を用いた検討では、3 種類の細胞株で TERT プロモーター領域の変異が見出された。



D. 考察

TERT 発現量とエリブリンに対する感受性に相関が認められたことより、がん種を問わず、TERT 高発現群に対する TERT-RdRP 阻害剤であるエリブリン投与という治療戦略の可能性が示唆された。肝細胞がん患者では約 7 割程度に TERT プロモーター領域の変異が同定され、TERT プロモーター領域の変異は TERT 発現量の増加に繋がることが示唆されていることより、肝細胞がんにおける TERT-RdRP 阻害による治療戦略の展開が有望であることが推測される。本研究でも、肝細胞がん細胞株 5 種類中 3 種類に TERT プロモーター領域の変異が見出された。今後は、これらの細胞株を用いて、hTERT 発現量、RdRP 活性、RdRP 阻害剤への感受性の検討を行うことで、肝細胞がんにおける TERT-RdRP 活性阻害剤を用いての治療戦略の意義が明確となると考えられた。

E. 結論

TERT-RdRP が肝細胞がん発がん過程にど

のような関与をしているかあるいは、TERT-RdRP 阻害が新たな肝がん治療戦略となり得るかの検討を引き続き進めることの重要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Lassmann T, Maida Y, Tomaru Y, Yasukawa M, Ando Y, Kojima M, Kasim V, Simon C, Daub C, Carninci P, Hayashizaki Y, Masutomi K. TERT regulates microRNAs; *Int J Mol Sci*, in press
- 2) Yamaguchi S, Maida Y, Yasukawa M, Kato T, Yoshida M, Masutomi K. Eribulin mesylate targets human telomerase reverse transcriptase in ovarian cancer cells; *PLoS ONE*, 9: e112438, 2014
- 3) Kobayashi T, Masutomi K, Tamura K, Moriya T, Yamasaki T, Fujiwara Y, Takahashi S, Yamamoto J, Tsuda H. Nucleostemin expression in invasive breast cancer; *BMC Cancer*, 14: 215, 2014
- 4) Maida Y, Yasukawa M, Okamoto N, Ohka S, Kinoshita K, Totoki Y, Ito TK, Minamino T, Nakamura H, Yamaguchi S, Shibata T, Masutomi K. Involvement of TERT in heterochromatin maintenance; *Mol Cell Biol*, 34: 1576-1593, 2014

2. 学会発表

- 1) Analysis of human RNA dependent RNA polymerase JSTさきがけ国際シンポジウム「哺乳類における小分子RNA」 増富健吉 2014年2月21日 JST東京本部
- 2) hTERT regulates heterochromatin maintenance via its RNA-dependent RNA

polymerase activity. Maida Y, Yasukawa M, Yamaguchi S, Masutomi K. 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25日-27日 パシフィコ横浜

3) hTERT contributes to heterochromatin maintenance via its RNA-dependent RNA polymerase activity. Maida Y, Yasukawa M, Yamaguchi S, Masutomi K. 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-27日 パシフィコ横浜

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし