

201423017A

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成27（2015）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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成27 (2015) 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	9
池田 一雄	
2. miRNAを利用した肝線維化治療法の開発	11
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	18
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	21
松原 勤	
5. ヒト肝星細胞におけるサイトグロビン遺伝子発現調節機構の分子解析	27
松原 三佐子	
6. サイトグロビンの発がんへの寄与のin vivo解析	22
LE THUY	
7. ヒトCYGB遺伝子プロモーター活性を利用した抗線維化薬の開発	40
大黒 敦子	
8. 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	43
祝迫 恵子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	46
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

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26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予想される。この発想に基づきハイスループットスクリーニングを行い、現在までにfibroblast growth factor 2（FGF2）ならびに低分子の2化合物をCygb誘導剤として同定した。現在その詳細な分子メカニズムを研究し、平成26年度でin vitro POCを確立しつつある。H27年度から順次in vivo POC獲得に向けたモデル実験を開始する。一方、かねてから研究を継続しているmicroRNAについてはmiR-29aが抗肝線維化に働くことを証明し、そのドラッグデリバリーシステムを構築して、脱線維化を達成できることをマウス肝線維化2モデルで証明した。本CygbやmicroRNA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。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	松原 勤 大阪市立大学大学院医学研究科
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 講師
機能細胞形態学 教授	松原三佐子 大阪市立大学大学院医学研究科
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 特任助教
肝胆膵病態内科学 准教授	Le Thuy 大阪市立大学大学院医学研究科
仲谷和記 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
機能細胞形態学 准教授	大黒敦子 大阪市立大学大学院医学研究科

肝胆膵病態内科学 研究補佐員  
祝迫恵子 京都大学大学院医学研究科  
標的治療腫瘍学 特定講師

#### 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, Am J Pathol 2015;185:1045)。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

前年度より引き続き[1]-[3]を平成27年度前半まで行い、[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 BAC クローンを用いて Cygb トランスジェニック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。大阪大学が所有する化合物ライブラリーを利用して 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 (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、CYGB 遺伝子プロモーター2kb 断片の下流に *Luciferase* 遺伝子をつなげた DNA (CYGB-2k-Luc) を持つレンチウイルスを作製し LX-2 細胞並びに HHStEC 細胞に感染させ、CYGB 遺伝子の発現に直接作用する物質をスクリーニングする実験系を確立した。一方、現在見出している *Cygb* 活性化薬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。(河田、池田、松原、松原、大黒)

③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。(村上)

[2] 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、松原)

[3] 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。(河田、池田、松原、松原 Le、村上)

## C. 研究結果

・研究代表者 (河田則文)

### (1) CDAA モデルにおける *Cygb* の関与

野生型ならびに *Cygb*<sup>-/-</sup>マウスに CDAA あるいは CSAA を与えてヒトの NASH に近いモデル動物を作製した。CDAA 投与後 16 週間までの観察では野生型に比較して *Cygb*<sup>-/-</sup>マウスで炎症ならびに線維化反応の増強が観察された。32 週間まで観察を継続したところ、*Cygb*<sup>-/-</sup>マウスでは肝臓が萎縮しており高度の線維化が生じていると同時に、100%のマウスで腫瘍形成が確認された。興味深い事に、腫瘍形成に抵抗性であるメスマウスでも同様の結果であった。以上から、*Cygb*<sup>-/-</sup>マウスは CDAA モデルにおいても易発がん性を呈することが改めて確認された。組織学的に CDAA 投与 *Cygb*<sup>-/-</sup>マウスでは肝線維化反応やマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤が増強した。星細胞活性化のマーカーである  $\alpha$  SMA 発現も増強していた。

*Cygb*<sup>-/-</sup>マウス肝では CDAA 投与後、IL-1, IL-6, TNF  $\alpha$  やケモカイン (Ccl-2, Ccl-3, Ccl-4) mRNA 発現が上昇していた。また、細胞周期関連遺伝子である Cyclin D1, cJun, cFos mRNA 発現も上昇し、関連する細胞内シグナル伝達経路である p-ERK, p-AKT, Cyclin D1 の活性化や蛋白発現が増加していた。さらに興味深い事に *Cygb*<sup>-/-</sup>マウス肝では DHE 染色が陽性で活性酸素(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) が組織で高発現していること、nitric oxide synthase や heme oxygenase-1 のようなフリーラジカル産生系が up-regulate されていること、また、活性酸素酸素系である myeloperoxidase の過剰発現があることが判明した。即ち、*Cygb*<sup>-/-</sup>マウス肝ではラジカル反応が強く生じている事が示され、*Cygb* の存在が肝臓を生理的状況を維持するのに不可欠である事が示された。解析の結果、

myeloperoxidase 陽性の細胞は浸潤した好中球であることや肝臓内では抗酸化ストレス物質が減弱することが示された。

(2) 抗線維化物質の候補であったアルンジン酸はマウス肝線維化モデルでの効果が見られなかったため、さらなる検討を断念した。

(3) ヒト星細胞 (HHStEC 細胞) を用いる事で、HHStEC 内の *Cygb* 量を発現誘導する因子を新たに発見した。この因子は fibroblast growth factor 2 (FGF2) であることを同定し、その作用機序の解明を急いでいる。また、アルンジン酸以外の低分子化合物による *Cygb* 誘導を鋭意行なっている。

(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) 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.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言われているヒストンバリエーションの領域を Chip シークエ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に違いがあり、肝線維化領域に様々な heterogeneity を生み出すのかどうか明らかにする研究を行なった。ヒト肝星細胞の細胞株 (LX-2) とヒト皮膚線維芽細胞の細胞株 (RGB021) を用いて、Chip シークエンスを行った結果、LX2 細胞特異的に結合が認められた部位が、ヒストン 2A.Z で 11 部位、ヒストン 3.3 で 9 部位認められた。

・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、ヒト星細胞株 LX-2 を使った実験で過剰発現させた際に collagen 1a1 の発現を低下させる miRNA とし

て miR-29 ファミリーを同定した。

(2) マウス肝線維化モデルにおける miR-29a 治療の可能性を検討するために、miR-29a のキャリアとしてアテロコラゲンを利用することとした。

(3) 四塩化炭素あるいはチオアセトアミドを 5 週間腹腔内投与して肝に線維化を誘導し、これらの投与を中止した後の回復期に miR-29a-アテロコラゲン複合体をマウス尾静脈より投与した。その結果、シリウスレッド染色で半定量される肝線維化レベル、肝臓内のコラーゲン量を示すヒドロキシプロリンの両者が miR-29a の投与で優位に改善した。

(4) 以上の結果は miR-29a を用いた脱肝線維化に対する核酸医薬品開発の可能性を示唆し、さらに検討を進めている。

・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(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 HHStEC 細胞の *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 (*mCherry*) 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)この評価系がハイスループットスクリーニングに適用できると判断し、この評価系を用いて 1920 化合物について抗線維化能を検討した。その結果、10 化合物がサプリメントと同等の mCherry 蛍光シグナルを低下させた。さらに、HHSteC 細胞における  $\alpha$ SMA と CYGB の遺伝子発現変化を観察すると、化合物 2 と化合物 6 は、 $\alpha$ SMA 発現を容量依存的に抑制させ、CYGB 発現を容量依存的に亢進させた。これらの化合物について、in vitro POC を獲得すべき、多種類の遺伝子ならびに蛋白発現について検討を加えている。

(3) HHSteC 細胞を 18~22 回継代すると倍加時間が低下し、継代回数 20 回あたりから細胞形態が大きな紡錘形を示した。このときのテロメアシグナルおよび細胞老化関連  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性 (SA- $\beta$ Gal) を観察すると、テロメアシグナルが低下し、SA- $\beta$ Gal 陽性細胞数が顕著に増加していた。これら細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイで調べた結果、星細胞老化に関わる数種類の遺伝子を把握することができた。

・ 研究分担者 (松原三佐子)

(1) LX-2 (ATCC 社) および HHSteC 細胞 (ScienCell 社) という 2 種類のヒト肝星細胞から樹立された細胞株を用いた。LX-2 は 2%FBS 含有 DMEM 培地、HHSteC は同社推奨の 2%FBS 含有 SteCM 培養液に付属サプリメント (S) を添加し培養を行なった。

(2) その結果、付属サプリメント (S) には HHSteC 細胞の CYGB 発現を増強させること、ならびに、両細胞の  $\alpha$ -SMA 発現を減弱させる作

用があることが判明した。

(3) 解析の結果、付属サプリメント (S) に含有される有効物として FGF2 を同定した。

(4) FGF2 に ERK および JNK 阻害剤を処理した細胞を 48 時間後に回収し、タンパク質の発現量を比較した結果、FGF2 による  $\alpha$ -SMA の発現減少は ERK 阻害剤の濃度依存的に抑制され、FGF2 による CYGB の発現増加は JNK 阻害剤の濃度依存的に抑えられた。これらの結果により、サプリメント中の FGF2 が ERK シグナルを介して  $\alpha$ -SMA の発現を減弱させ、JNK シグナルを介して CYGB の発現を亢進させることが明らかとなった。

・ 研究分担者 (Le Thuy)

(1) 星細胞の機能における Cygb 存在の意義  
Cygb は静止期の星細胞にも発現が見られるため、Cygb の有無により星細胞機能に差が生じるかどうかについて、野生型ならびに Cygb<sup>-/-</sup> マウス肝臓から初代培養星細胞を分離してその機能比較を行った。その結果、Cygb<sup>-/-</sup> マウス由来の星細胞では活性酸素産生が亢進していることが判明した。また、Cygb<sup>-/-</sup> マウス由来の星細胞では、IL-1, TNF  $\alpha$ , IL-6, Cxcl-1, Cxcl-2, Cxcl-7, Ccl-2, Ccl-3, Ccl-4 の mRNA 発現が有意に増強していた。 $\alpha$  SMA, Colla1, Timp-1 の mRNA 発現も増強した。また、野生型マウスから分離した星細胞を siCygb 処理して Cygb を発現低下させると、Cygb<sup>-/-</sup> マウス肝から分離した星細胞と同じフェノタイプを示した。以上のことから、Cygb<sup>-/-</sup> マウス由来の星細胞はプライミングを受けており、易刺激性であることが判明した。

(2) CDAA モデルの発がんならびに肝線維化における腸内細菌叢ならびに胆汁酸の関与



本モデルにおける病態形成に腸内細菌叢ならびに胆汁酸が関与するかどうかについて、抗生剤投与モデルを用いて現在検討中である。

・ 研究分担者(大黒敦子)

CYGB 遺伝子プロモーター2kb 断片の下流に *Luciferase* 遺伝子をつなげた DNA (CYGB-2k-Luc) を持つレンチウイルスを作製し、LX-2 細胞に導入した。ScienCell 社の SteCM 培養液に付属サプリメント(S) 添加によるレポーター活性の上昇を観察したが LX-2 細胞では認められなかった。LX-2 細胞は CYGB 発現が著しく低下していることが分かったので、CYGB の高発現が認められる HHSSteC 細胞に導入すると、サプリメント添加によるレポーター活性の上昇が観察された。現在、鋭意大阪大学産学連携化合物ライブラリーから候補化合物を選出する実験を行っている。

・ 研究分担者(祝迫恵子)

(1) 肝星細胞は活性化する際に、ビタミン A を含有する細胞質内の油滴を細胞外に放出する。これまでの *in vitro* の観察で、肝星細胞は活性化しても完全には油滴を失わない。また、線維肝からの肝星細胞の分離において、密度勾配遠心法によって肝星細胞の分離が行われており、油滴を失うことによる細胞の密度の変化については検討がなされていなかった。我々は、線維肝においては肝星細胞の油滴が減少し密度が変化していることを考慮して、遠心分離用密度媒体ナイコデントの濃度を上げて、純度の高い肝星細胞の分離を行った。今回は、LC-MAS によって *in vitro* で活性化させた肝星細胞がビタミン A を完全には失わないこと、このビタミン A は UV フローサイトメトリーでは検出が可能であることを確認した。

## 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 FGF2 や数種類の低分子化合物が星細胞の活性化制御に役立つことを見出した。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

1. 河田則文 肝線維化機序研究の進歩 臨床消化器科 2014;29:421-427
2. 河田則文 肝硬変 第2章 病理・病態生理 病因 最新医学社 2014 (別冊) p31-38
3. 河田則文 細胞増殖 miRNA-195によるサイクリンE1の発現抑制
4. 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, Kawada N. Lab Invest. 2014;94:192-207.
5. Interferon- $\beta$  Mediates Signaling Pathways Uniquely Regulated in Hepatic Stellate Cells and Attenuates the Progression of Hepatic Fibrosis in a Dietary Mouse Model. Shimozono R, Nishimura K, Akiyama H, Funamoto S, Izawa A, Sai T, Kunita K, Kainoh M, Suzuki T, Kawada N. J Interferon Cytokine Res. 2015 Feb 25. [Epub ahead of print]
6. Involvement of hepatic stellate cell cytoglobin in acute hepatocyte damage through the regulation of CYP2E1-mediated xenobiotic metabolism. Teranishi Y, Matsubara T, Krausz KW, Le TT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Lab Invest. 2015;95:515-24.
7. Cytoglobin Deficiency Promotes Liver Cancer Development from Hepatosteatosis through Activation of the Oxidative Stress Pathway. Thuy le TT, Matsumoto Y, Thuy TT, Hai H, Suoh M, Urahara Y, Motoyama H, Fujii H, Tamori A, Kubo S, Takemura S, Morita T, Yoshizato K, Kawada N. Am J Pathol. 2015;185:1045-60.
8. Fibrogenesis in alcoholic liver disease. Fujii H, Kawada N. World J Gastroenterol. 2014;20:8048-54.
9. Kawada N, Parola M. Interactions of Stellate Cells with Other Non-Parenchymal Cells. In "Stellate Cells in Health and Disease", edited by Chandrashenker R. Gandhi and Massimo Pinzani, Academic Press, pp185-208, 2015.

### 学会発表

1. Kawada N. The role of cytoglobin, the fourth globin in mammals, in hepatic stellate cell activation, fibrogenesis, and cancer development. Cold Spring Harbor Asia Conference, "Liver Metabolism, Disease and Cancer", May 19-23, 2014, Suzhou, China.
2. Kawada N. The role of cytoglobin, the fourth globin in mammals, in hepatic stellate cell activation, fibrogenesis, and cancer development. XVIII International Conference on O2BiP, The

University of Sheffield, July 6-10, 2014,  
Sheffield, UK.

3. Kawada N. Evolution of hepatic fibrosis  
research. APASL, March 12-15, 2015,  
Istanbul. Turkey.

#### G. 知的所得権の取得状況

##### 1. 特許取得

特開 2011-185789 : 「サイトグロビ  
ン遺伝子ノックアウト非ヒト癌モデル動物」 :  
河田則文、Le TT Thuy

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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 26 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. 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ヒストンバリエーション領域を Chip シークエ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に違いがあり、肝線維化領域に様々な heterogeneity を生み出すのかどうか明らかにすることを目的としている。今年度は、ヒト肝星細胞の細胞株（LX-2）とヒト皮膚線維芽細胞の細胞株（RGB021）を用いて、Chip シークエンスを行った結果、LX2 細胞特異的に結合が認められた部位が、ヒストン 2A. Z で 11 部位、ヒストン 3.3 で 9 部位認められた。

#### 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。そのため、特に遺伝

子発現に直接関与するといわれているヒストンバリエーション、H2A. Z と H3.3 の chip-シークエンスを肝星細胞をもちいて行った。

#### B. 研究方法

使用した細胞は、ヒト肝星細胞の細胞株（LX-2）とヒト皮膚線維芽細胞の細胞株（RGB021）で、これらの細胞は 10% FBS 含 DMEM にて培養し、chip-sequence assay に用いられた。

##### Chip-Sequence Assay

ホルムアルデヒドを用い、タンパク質と DNA をクロスリンクさせた後、断片化には超音波処理と Micrococcal nuclease 処理の両方を用いた。クロマチンの免疫沈降には、抗 H2A. Z 抗体（Active Motif）、抗 H3.3 抗体（UBI）、simple Chip Enzymatic Chromatin IP Kit（Cell Signaling）を用いた。シークエンス解析には、イルミナ MiSeq をもちい、その後、統合部位のマッピングを行った。

### C. D. 研究結果と考察

Chip-Seqにより、ヒストン 2A. Z の結合領域として同定した部位は、ヒト皮膚線維芽細胞 RGB021 で 389 部位、ヒト肝星細胞 LX2 で 485 部位の領域があり、その中で、LX2 特異的に結合が認められた領域は 11 部位存在した。また、ヒストン 3.3 の結合領域として同定した部位は、ヒト皮膚線維芽細胞 RGB021 で 419 部位、ヒト肝星細胞 LX2 で 398 部位の領域があり、その中で、LX2 特異的に結合が認められた領域は 9 部位存在した。

LX-2 に特異的な領域に直接 coding region を含む遺伝子は、H2A. Z, H3.3 の解析で、RP11-413E6.7, ANKRD30BL, RNU2-64P, LINC00486 といった遺伝子で、我々が強く関心を引くものではなく、さらに、転写領域の解析や、LX-2 細胞の全体の data から再度解析が必要である。

また、ヒト肝臓組織での線維化領域での heterogeneity とエピジェネティクスの関連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

論文発表

1. Kawasaki K, Ushioda R, Ito S, Ikeda K, Masago Y, Nagata K. Deletion of the

Collagen-specific Molecular Chaperone Hsp47 Causes Endoplasmic Reticulum Stress-mediated Apoptosis of Hepatic Stellate Cells. J Biol Chem. 2015;290:3639-46.

2. Teranishi Y, Matsubara T, Krausz KW, Le TT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Involvement of hepatic stellate cell cytoglobin in acute hepatocyte damage through the regulation of CYP2E1-mediated xenobiotic metabolism. Lab Invest. 2015, in press.

学会発表

1. 斎藤千恵子、松原勤、河田則文、池田一雄 肝星細胞のエピジェネティクス制御解析 第 28 回肝類洞壁細胞研究会 (岡山) 平成 26 年 12 月 13-14 日
2. 大石敦子、松原三佐子、松原勤、吉里勝利、池田一雄、河田則文 ヒト肝星細胞におけるサイトグロビン遺伝子発現調節機構の分子解析 第 28 回肝類洞壁細胞研究会 (岡山) 平成 26 年 12 月 13-14 日
3. 北村賢治、松原勤、寺西優雅、仲谷和記、河田則文、池田一雄 アセトアミノフェン誘導性肝障害における小胞体ストレス応答因子 CHOP の役割 第 28 回肝類洞壁細胞研究会 (岡山) 平成 26 年 12 月 13-14 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）

分担研究報告書（平成 26 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：miRNA を利用した肝線維化治療法の開発

**研究要旨：**本邦において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全人口の約 3.5% である。慢性ウイルス性肝炎は長期に亘る持続的な炎症の結果、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。現在、慢性 C 型肝炎に対する抗ウイルス薬は最近の進歩で 90% 以上の奏功率が期待出来る。しかし HCV でも薬剤耐性株に感染している症例や肝予備能の悪い肝硬変症例、慢性 B 型肝炎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。本研究では、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 万人の感染者がおり、アルコール性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の直接的機能阻害剤の開発により肝予備能の良い肝硬変を含め、奏功率は 90% 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対策を講じることが出来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、塩基配列特異的に標的遺伝子の発現を制御する。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も深く関係しており、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 (Murakami Y et al. PLoS ONE 2011) や肝発癌に miRNA の発現異常 (Murakami Y et al. Oncogene 2006, BMC cancer 2013) が深く関係している事を今までに明らかにした。

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化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、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

### (1) 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例を用いて miRNA 発現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 を過剰発現させ、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。

### (2) 肝星細胞の活性解析

肝星細胞株の LX-2 に活性化マーカーとして collagen・1・1 mRNA の発現と XTT を用いて細胞増殖を検討した。

### (3) 慢性肝疾患マウスモデルの作成

四塩化炭素 (CC14) あるいはチオアセトアミド (TAA) の腹腔内投与マウスを慢性肝疾患モデルマウスとして使用した (図1)。マウスの miRNA 発現はアテロコラーゲンと double strand mature miRNA を混ぜマウス尾静脈より投与した (図2)。マウス肝組織を HE 染色、sirius red 染色を用いて形態的な変化を評価

し、sirius red 染色ではその染色されている部位を数値化して客観的な評価とした。また肝組織より total RNA を抽出し遺伝子発現をリアルタイム qPCR にて行った。

(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 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

### (1) miR-29a は肝線維化を改善する

昨年度までの解析で肝線維化に関与している miRNA として miR-29a を解析対象に選択した。解析対象に選択した理由として、(1) miR-29a は collagen 1・1 を標的としている、(2) 肝星細胞株の LX2 を TGF- $\beta$  を用いて活性化した後



miR-29aを過剰発現するとcollagen 1・1の発現を制御した、(3) XTTアッセイにてmiR-29aの過剰発現は細胞毒性、細胞増殖に影響を与えなかった、ことによる。CC14あるいはTAAをそれぞれ5週投与したところ、それぞれのモデルで肝線維化が進行していることを確認した。その後図2のスケジュールでアテロコラーゲンとmiR-29aの複合体を尾静脈より投与をした。1週目でCC14、TAAモデルともmiR-29aを投与すると自然経過群やNC投与群に比較して有意に線維化が改善することがsirius red染色より明らかになった。その際にヒドロキシプロリンも同様に有意に低下した。組織中のcollagen 1・1の発現はCC14群で有意に低下したが、TAA群では低下傾向にあった。2週の経過観察群ではCC14群ではsirius red陽性面積は低下傾向にあったのに対し、TAA群では有意に低下した。ヒドロキシプロリンは両群とも有意に低下した。さらにcollagen 1・1はCC14群では有意に低下したが、TAAでは低下傾向は見られなかった。

#### D. 考察

肝線維化が進展している際に発現が低下しているmiR-29aを肝線維化マウスに投与すると肝線維化が自然経過群に比較して有意に改善することが明らかになった。即ち、miR-29aの補充は脱線維化を誘導した。この結果から、核酸創薬のモデルとしてmiRNAの補充療法は有用であることを示すことが出来た。

#### E. 結論

マウスの二系統の慢性肝疾患モデルを用いてmiR-29aの投与は肝線維化を改善させること

が判明した。miR-29aは肝組織に炎症を誘導することはなく、内因性の遺伝子であることより、安全に治療が出来ることが期待される。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

論文発表

1. Arimoto K, Hishiki T, Kiyonari H, Abe T, Cheng C, Yan M, Fan J, Futakuchi M, Tsuda H, Murakami Y, Suzuki H, Zhang D, Shimotohno K. Murine Herc6 plays a critical role in protein ISGylation in vivo and has an ISGylation independent function in seminal vesicles. J Interferon Cytokine Res. 2014 Nov 19. [Epub ahead of print]
2. Taguchi Y-h and Murakami Y. Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases? BMC Res Notes. 2014;7:581. doi: 10.1186/1756-0500-7-581.
3. Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kumada T, Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Taguchi Y-h, and Azuma T. High-throughput Analysis of miRNA Expression Profile in Hepatocellular Carcinoma using Next Generation Sequencing. PLoS One. 2014;9:e106314. doi: 10.1371/journal.pone.0106314. eCollection 2014.

学会・研究会発表

1. 藤井英樹、豊田秀徳、村上善基、エクソ

ソーム中のマイクロ RNA 発現解析は脂肪  
肝診断に有用である. 第18回 日本肝臓  
学会大会 シンポジウム 平成26年10月  
23日 神戸市

2. 村上善基 miRNAによる肝線維化の抑制  
第41回日本毒性学会学術集会 シンポジ  
ウム 平成26年7月3日 神戸市
3. 村上善基、松本佳也、伊丹沙織、元山宏  
行、吉里勝利、河田則文. miR-29 による  
肝線維化制御の検討. 第28回肝類洞壁細

胞研究会学術集会 平成26年12月13日  
岡山市

#### 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

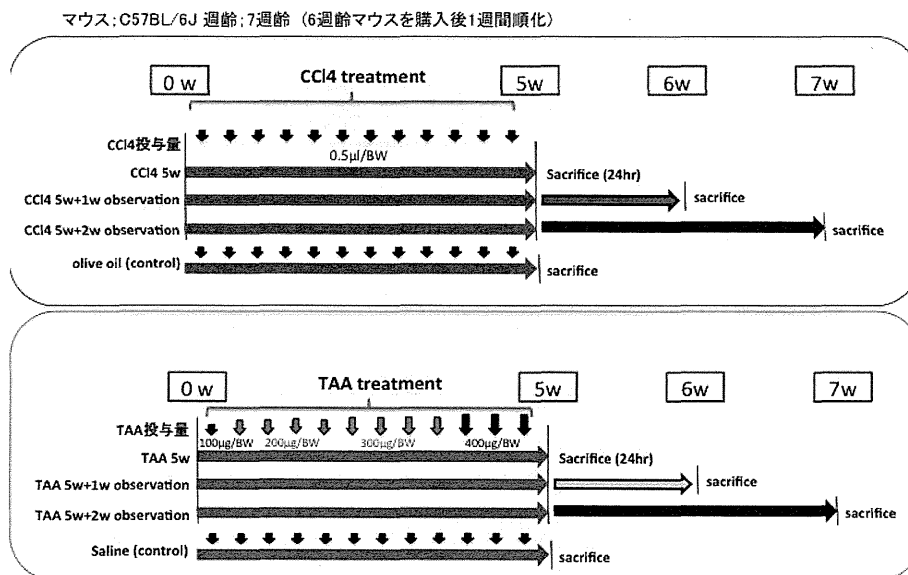
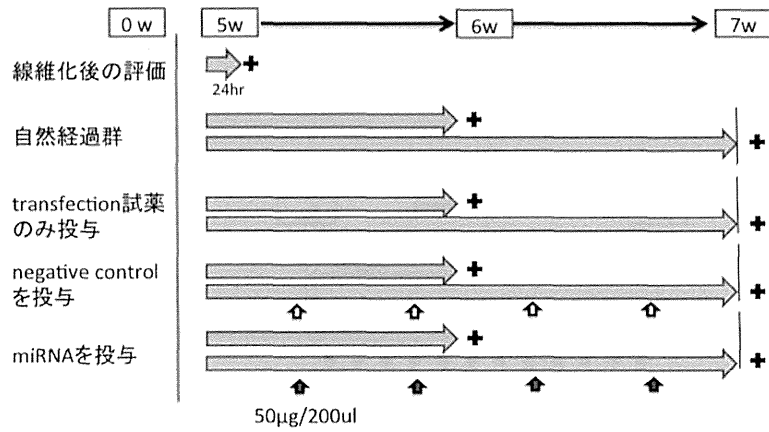


図1 慢性肝疾患モデルマウス作成手順

上段は四塩化炭素投与、オリーブオイル投与を比較対象とした、四塩化炭素投与後2週間経過観察を行った。

下段はTAA投与群で、生理的食塩水を投与したものを比較対象とした。矢印は該当する薬剤の投与時期を示す。

## miRNA投与実験



miRNAは50µgをアテロコラーゲンと混濁しマウス尾静脈より投与

図2 miRNAの投与スケジュール

＋は屠殺、矢印は miRNA またはヒト遺伝子を認識しないオリゴヌクレオチド(Negative control)の投与時期を示す。

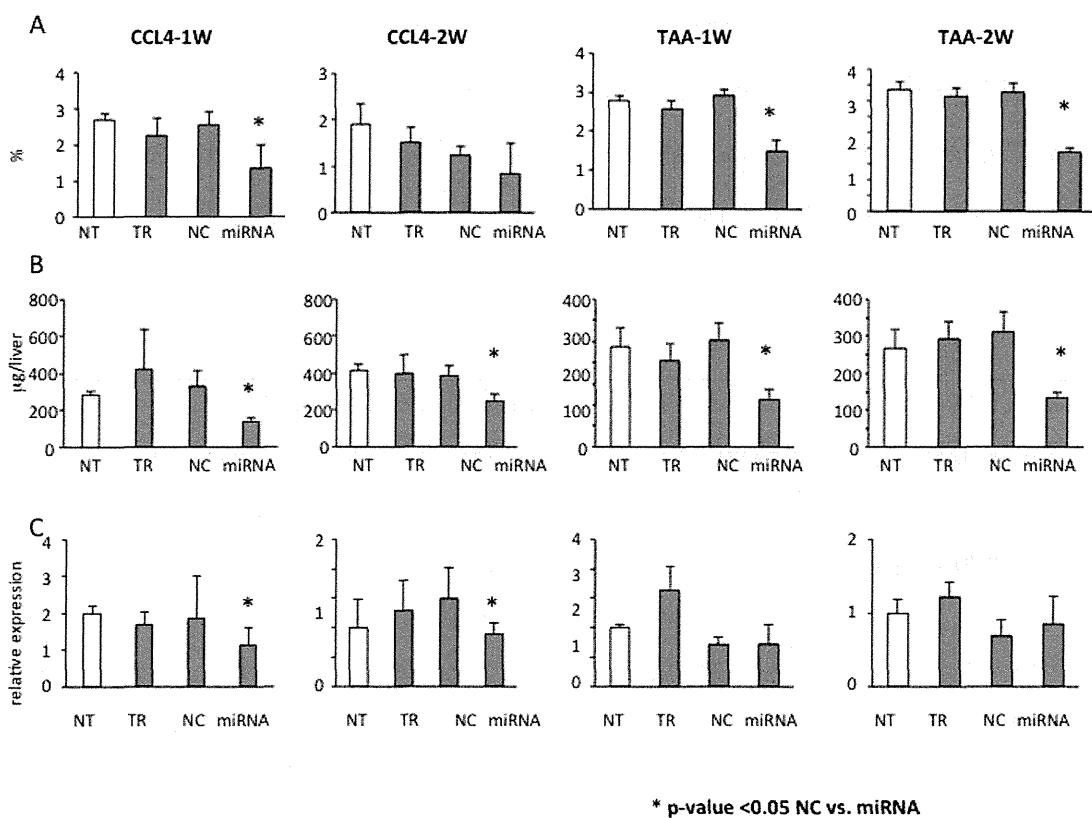


図3 miR-29aを投与した際の肝組織における肝組織の変化

- A. sirius red 染色陽性面積
- B. hydroxyproline 発現
- C. Collagen 1・1 発現

CCL4-1W: 四塩化炭素投与後1週間処置、CCL4-2W: 四塩化炭素投与後2週間処置、TAA-1W: TAA投与後1週間処置、TAA-2W: TAA投与後2週間処置

NT: 経過観察、TR: アテロコラーゲンのみの投与、NC: negative control、miRNA: miR-29a投与