

投与により肝臓の腫瘍形成が有意に低下することが判明した。腫瘍形成の抑制のみならず、線維化反応の軽減や炎症性サイトカインの発現低下が観察された。

(5) 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。

D. 考察

最近、*Cygb* の発がんへの寄与に関して多様な臓器で報告されている。例えば、肺がんにおける *Cygb* の関与に関しては、プロモーター領域のメチル化やヘテロ接合体の欠損による *Cygb* 発現低下は non-small cell lung cancer (NSCLC) において報告された。即ち、54%の肺癌においては近接する非腫瘍部に比して明らかに低レベルの *Cygb* mRNA 発現が観察され ($p < 0.001$)、プロモーター領域のメチル化の程度と *Cygb* 発現が逆相関することが示された。また、*Cygb* mRNA 発現の低下と腫瘍の分化度とに相関が見られ低分化型でより低発現であることが示された (Fisher's exact, $P = 0.033$)。同様の知見は head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) や乳癌でも観察された。

Shivapurkar らは NSCLC 30 症例の組織を調べたところ、CYGB 遺伝子のメチル化が 63%で検出され、近隣の非腫瘍部 (18%) に比較して有意に高いことを示した。同様の結果は乳癌、膀胱癌、大腸がん、白血病で観察された。NCI-H661 肺癌細胞株を CYGB shRNA で処理すると細胞増殖が促され、逆に、NCI-H2228 細胞に CYGB を

過剰発現させると細胞増殖は抑制され、collagen 1A1, PRPF40A, UCP2, death-associated proteins kinase 1 (DAPK), PYD and CARD domain containing (PYCARD) や DNA-methyltransferase 1 (DNMT1) などががんの形質維持に必要な遺伝子発現を低下させることが示された。

Cygb が腫瘍抑制的であるとする、その効果はグロビンとしてのスカベンジャー効果からがん誘発性物質に由来する酸化ストレスやニトロソ化ストレスを低減し細胞を DNA、蛋白質、さらには膜レベルで保護することが推測される。事実、今回の研究で *Cygb*^{-/-} マウス肝では遺伝子の double-strand break (γ H2X 発現) が生じていることを観察した。一方、*Cygb* が発現低下することで、局所炎症や微小環境に変化が生じて、その結果として組織の線維化が生じ無秩序な上皮-間葉相互作用を惹起する。また、慢性的な炎症反応は p53 や MAP キナーゼカスケードに影響して最終的に血管新生、細胞浸潤や DNA 損傷に関与すると想定される。

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明らかとなった。*Cygb* 欠損は CDAA 投与によるヒト NASH 類似の慢性肝障害モデルにおいて、肝臓の線維化・炎症反応を増強させ、肝臓を易発がん性にさせる事が明らかとなった。*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うる。

F. 研究発表

- (1) 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.
- (2) Relationship between inosine triphosphate genotype and outcome of extended therapy in hepatitis C virus patients with a late viral response to pegylated-interferon and ribavirin. Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Thuy le TT, Tanaka Y, Kawada N. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29:201-7.
- (3) 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.
- (4) 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, in press

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 大黒 敦子 大阪市立大学大学院医学研究科 研究補佐員

分担研究課題：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

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、ヒト星細胞株の *CYGB* 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た。サプリメント添加による *CYGB* 遺伝子レポーター活性の上昇は、ヒト星細胞株 LX-2 細胞では観察されなかったが、ヒト初代培養星細胞株 HhSteC 細胞では認められた。現在、この評価系を用いて抗線維化化合物の選定を行っている。

A. 研究目的

肝硬変は、肝実質が活性化した星細胞や筋線維芽細胞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。

我々は、星細胞に豊富に発現するサイトグロビン *CYGB* が肝発がん抑制に働く因子の一つであることを明らかにしてきた。この研究過程で、*CYGB* 欠損星細胞は、野生型星細胞に比べ、 α SMA 発現が亢進しており、定常的に活性化状態にあることを発見した。また、*CYGB* の過剰発現は星細胞の活性化を抑制することが分かった。以上より、*CYGB* 遺伝子発現を誘導する因子は抗線維化作用を有すると考えた。

本研究は、星細胞の *CYGB* 遺伝子発現を誘導する化合物を探索し、その分子機序を解析することで肝硬変治療薬の開発に貢献することを目的とした。

B. 研究方法（計画）

抗線維化薬の候補化合物を効率よく選定するために、*CYGB* 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た。即ち、*CYGB* 遺伝子プロモーター断片の下流に *Luciferase* 遺伝子をつなげた DNA を持つレンチウイルスを複製しヒト星細胞株に導入した抗線維化評価系を構築した。

次に、その評価系を用いて、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した。有力な候補化合物が同定された場合、遺伝子発現解析など抗線維化能を詳細に検討する。

C. 研究結果

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複製し、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) は抗線維化作用を有し、*CYGB* 発現を誘導することが

分かっている。そこでサプリメント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 HHSteC 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 (図 1)。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。

D. 考察

本研究で *CYGB* 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が構築された。大阪大学産学連携化合物ライブラリーから候補化合物が選出され

ることが期待される。

E. 研究発表

今回の研究内容についてはなし

F. 知的財産権の出願

今回の研究内容についてはなし

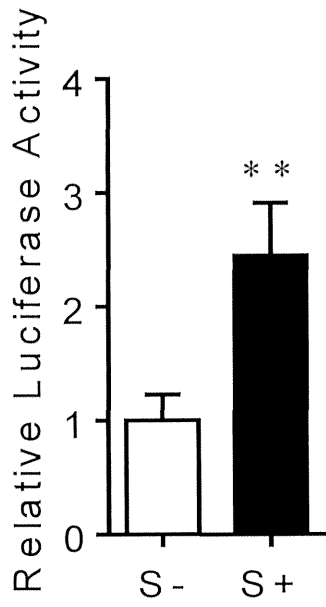


図1 HHStcC 細胞-CYGB-2k-Luc 評価系におけるサプリメントの効果
Luciferase 活性値を細胞数で標準化したときの相対値。

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

研究分担者 祝迫 恵子 京都大学大学院 医学研究科 特定講師

分担研究課題：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

研究要旨：肝線維症は、肝臓において活性化した肝星細胞が産生するコラーゲンを主とした細胞外基質 (ECM) の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変、肝がんであり、治療は肝移植を除けば対症療法のみである。肝線維化の進行を阻止し、肝機能改善と肝発がんを予防する治療戦略として、本研究では肝星細胞の脱活性化剤開発を目標としている。分担者は、線維化モデル動物を用いた基礎的な解析を基に、活性化肝星細胞の脱活性化のための標的の検索を行う。

A. 研究目的

慢性肝炎病態では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の産生・沈着があるが、肝内での過剰な ECM 沈着には、肝実質細胞の絶対数の減少が伴い、肝機能低下をもたらす。さらに近年、詳細は不明なものの、ECM 沈着が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者の QOL を考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

肝星細胞は、慢性肝障害に応じて活性化され、コラーゲンを主体とした ECM を盛んに分泌して組織の線維性癒痕変性を導く。このように肝星細胞は、肝傷害時に増殖してコラーゲンを

産生することから、慢性肝炎における肝線維化の責任細胞と目されている。しかし、広範の研究にもかかわらず、活性化した肝星細胞を静止期の肝星細胞に“脱活性化”する有効な薬剤は見出されていないのが現状である。初代培養肝星細胞は、不死化されたセルラインよりも *in vivo* の特性を保持しており、その反応性を詳細に検証できる有力なツールである。

本研究では線維化モデルマウスを用いた基礎的な解析を基に、活性化肝星細胞の“脱活性化”を誘導するメカニズムの検討を行い、さらには“脱活性化”を誘導するための標的を見出すことを目的とする。

B. 研究方法

本研究では、C57B/6 マウス、Collagen-GFP トランスジェニックマウスを用いて、四塩化炭素投与、bile duct ligation を行い、肝線維化を作成した。すでに Collagenase 2-step 灌流法およびナイコデントによる密度勾配遠心

法にて、高い純度の肝星細胞を採取することができるようになっている。今年度は、新たな分離方法について検討を行った。

線維化刺激を加えた個体から各々採取した肝非実質細胞の中から、ビタミンAの自家蛍光を指標としてフローサイトメトリーによる肝星細胞の分離を試みた。フローサイトメトリーで分離した肝星細胞と従来の Collagenase 2-step 灌流法およびナイコデントによる密度勾配遠心法にて採取した静止期の肝星細胞について、ビタミンAの含有量を LC-MS 8030plus システム（島津製作所）を用いて、多重反応モニタリング（Multiple reaction monitoring [MRM] 法）による、retinyl palmitate の定量にて検討した。

遺伝子組換え動物の扱いは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と、その関係法令に従い、適切な拡散防止措置を講じて行うこととした。具体的には、京都大学組換え DNA 実験安全管理委員会の承認を経て、「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程」と「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程施行細則」に沿って実施する。動物実験は、京都大学医学系研究科・動物実験委員会の承認を経て、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」と「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」に沿って行うものとした。

C. 研究結果

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と言われている。しかし、我々のこれまでの *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ことを観察していた。また、線維肝からの肝星細胞の分離において、これまでの報告では肝線維化の有無にかかわらず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てきた。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。

我々の“脱活性化”のコンセプトを検証するためには、*in vitro* における脱分化薬剤の評価系が必要である。フローサイトメトリーによって分離した活性化肝星細胞は、薬剤による脱分化の評価に有用な細胞であると考えている。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Tanabe K, Taura K, Koyama Y, Yamamoto G, Nishio T, Okuda Y, Nakamura K, Toriguchi K, Takemoto K, Yamanaka K, Iwaisako K, Seo S, Asagiri M, Hatano E, Uemoto S. Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice. *J Gastroenterol.* 2015 (in press)
- (2) Yokoo T, Wolfson T, Iwaisako K, Peterson MR, Mani H, Goodman Z, Changchien C,

Middleton MS, Gamst AC, Mazhar SM, Kono Y, Hassanein T, Ho SB, Sirlin CB. Evaluation of liver fibrosis using texture analysis on combined-contrast-enhanced magnetic resonance image 3.0T. Biomed Res Int. 2014 (in press)

- (3) Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S, Toriguchi K, Tanabe K, Tanaka H, Seo S, Taura K, Machida K, Takeda N, Saji S, Uemoto S, Asagiri M. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. FEBS Open Bio. Sep 2014;4:777-87.
- (4) Iwaisako K, Taura K, Koyama Y, Takemoto K, Asagiri M. Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. Curr Pathobiol Rep. 2014;2:209-215.
- (5) Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Xu J, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA, Kisseleva T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. PNAS. 2014;111:E3297-305.
- (6) Jobara K, Kaido T, Hori T, Iwaisako K, Endo K, Uchida Y, Uemoto S. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. Nutrition 2014;30:1195-207.

2. 学会発表

<教育講演>

祝迫恵子 線維化と再生を多臓器に学ぶ
教育セッション3「腎障害後の線維化と再生の
ターニングポイント」

第57回日本腎臓学会学術総会、横浜市、2014.7
横浜

<ポスター>

- (1) 祝迫 恵子、朝霧 成挙、木下 正彦、濱野 玄弥、野沢 彰紀、西岡 孝芳、浦田 順久、坂田 親治、竹村 茂一、久保 正二 肝臓の筋線維芽細胞の起源 —肝疾患の治療標的探索— 第114回 日本外科学会定期学術集会 2014.4 京都
- (2) 祝迫 恵子、河本 宏、佐治 重衡 肝線維症における筋線維芽細胞の起源 第35回 日本炎症・再生医学会年次集会 2014.7 沖縄
- (3) 祝迫 恵子、朝霧 成挙、田浦 康二朗、波多野 悦朗、上本 伸二、佐治 重衡 肝胆膵領域の悪性腫瘍におけるメソテリンの診断用バイオマーカーとしての意義 第52回 日本癌治療学会学術集会 2014.8 横浜

F. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
河田則文	肝線維化機序研究の進歩	臨床消化器科	29	421-427	2014
河田則文	肝硬変 第2章 病理・病態生理 病因	最新医学社	別冊	31-38	2014
河田則文	細胞増殖 miRNA-195によるサイクリンE1の発現抑制	生体の科学	65巻1号	74-79	2014
Motoyama H, Komiyama T, <u>Thuy le TT</u> , Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagiwara A, Kawamura E, <u>Murakami Y</u> , Yoshizato K, <u>Kawada N</u> .	Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.	Lab Invest.	94	192-207	2014
Shimozono R, Niishimura K, Akiyama H, Funamoto S, Izawa A, Saito T, Kunita K, Kainoh M, Suzuki T, <u>Kawada N</u> .	Interferon- β Mediates Signaling Pathways Uniquely Regulated in Hepatic Stellate Cells and Attenuates the Progression of Hepatic Fibrosis in a Dietary Mouse Model.	J Interferon Cytokine Res.			2015
Teranishi Y, <u>Matsubara T</u> , Krausz KW, <u>Le TT</u> , Gonzalez FJ, Yoshizato K, <u>Ikeda K</u> , <u>Kawada N</u> .	Involvement of hepatic stellate cell cytoglobin in acute hepatocyte damage through the regulation of CYP2E1-mediated xenobiotic metabolism.	Lab Invest.	95	515-24	2015
<u>Thuy le TT</u> , Matsumoto Y, <u>Thuy le TT</u> , Hai H, Suoh M, Urahara Y, Motoyama H, Fujii H, Tamori A, Kubo S, Takemura S, Morita T, Yoshizato K, <u>Kawada N</u> .	Cytoglobin Deficiency Promotes Liver Cancer Development from Hepatosteatosis through Activation of the Oxidative Stress Pathway.	Am J Pathol.	185	1045-60	2015

Fujii H, Kawada N.	Fibrogenesis in alcoholic liver disease.	World J Gastroenterol.	20	8048-54	2014
Kawada N, Parola M.	Interactions of Stellate Cells with Other Non-Parenchymal Cells.	In "Stellate Cells in Health and Disease", edited by Chandrashekar R. Gandhi and Massimo Pinzani, Academic Press,		185-208	2015
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.	290	3639-46	2015
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.	35	351-358	2015
Taguchi Y-h and Murakami Y	Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases?	BMC Res Notes.	7	581	2014
Murakami Y, Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kusumada 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.	9	12	2014
Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Thuy le TT, Tanaka Y, Kawada N.	Relationship between inosine triphosphatase genotype and outcome of extended therapy in hepatitis C virus patients with a late viral response to pegylated-interferon and ribavirin.	J Gastroenterol Hepatol.	29	201-207	2014

Fujii H, <u>Kawada N.</u>	Fibrogenesis in alcoholic liver disease.	World J Gastroenterol.	20	8048-54	2014
<u>Kawada N</u> , Parola M.	Interactions of Stellate Cells with Other Non-Parenchymal Cells.	In "Stellate Cells in Health and Disease", edited by Chandrashekar R. Gandhi and Massimo Pinzani, Academic Press,		185-208	2015
Kawasaki K, Ushioda R, Ito S, <u>Ikeda K</u> , 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.	290	3639-46	2015
Arimoto K, Hishiki T, Kiyonari H, Abe T, Cheng C, Yan M, Fan J, Futakuchi M, Tsuda H, <u>Murakami Y</u> , 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.	35	351-358	2015
Taguchi Y-h and <u>Murakami Y</u>	Universal disease biomarker: can a fixed set of blood microRNAs diagnose multiple diseases?	BMC Res Notes.	7	581	2014
<u>Murakami Y</u> , Tanahashi T, Okada R, Toyoda H, Kusumada 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.	9	12	2014
Hai H, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, <u>Thuy le TT</u> , Tanaka Y, <u>Kawada N.</u>	Relationship between inosine triphosphatase genotype and outcome of extended therapy in hepatitis C virus patients with a late viral response to pegylated-interferon and ribavirin.	J Gastroenterol Hepatol.	29	201-207	2014

5

肝線維化機序研究の進歩

河田 則文*

Key words: 星細胞, 筋線維芽細胞, 細胞外マトリックス, 成長因子, 発がん

要旨

肝線維化は肝炎ウイルス感染, アルコール多飲, 脂肪肝など病因のいかんを問わず慢性的に経過する炎症と肝細胞障害により惹起される。障害を受けた肝細胞や類洞壁細胞が産生するメディエーターによりディッセ腔に存在する星細胞が活性化され, 筋線維芽細胞(myofibroblast)様の細胞へと形質を変化させ, 組織局所に I 型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質を沈着させることを概略とする。星細胞活性化の分子機構は最近 20 年の研究で大きく解明され, エビジェネティックな側面も解析されつつある。近年, 肝発がん母地として線維化を理解する動きが急展開している。抗肝線維化治療戦略も含め発展が期待される研究分野である。

に微小出血が生じ, 血小板凝集とフィブリン形成で一時的に傷が塞がれる。障害肝細胞, 類洞内皮細胞や血小板からはケモカイン, transforming growth factor- β (TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF) などのメディエーターが産生される。これらに呼応して, 末梢血中の好酸球, 好中球, リンパ球, マクロファージなどがインターロイキン 1 (interleukin 1; IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, tumor necrosis factor- α (TNF- α) やマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) などの生理活性物質を産生しつつ炎症局所に集積する。さらに肝類洞に存在する星細胞, 類洞内皮細胞や Kupffer 細胞が活性化して一過性の局所炎症を増幅させる¹⁾。

I. 肝線維化のメカニズム(図)

障害を受けた肝細胞や類洞内皮細胞等から産生されるメディエーターにより, 星細胞が活性化されて筋線維芽細胞様の細胞へと形質を変え, 組織各所に細胞外マトリックス物質を過剰沈着させることが, 肝線維化の概略である。

肝炎ウイルス感染やアルコール過剰摂取, 脂肪沈着などで肝細胞が壊死・脱落すると, 局所

1. 星細胞の活性化

星細胞はビタミン A を貯蔵しており, 生理的状況では類洞を 3 次元的に細胞突起で包囲した肝組織特異的 pericyte (周皮細胞) といえるが, 炎症時には α -平滑筋アクチンに代表される分子マーカーを発現するようになり筋線維芽細胞(myofibroblast; MFB)様の細胞へと形質を変える。この活性化星細胞は, TGF- β の産生と活性化を介した I 型, IV 型コラーゲン産生,

*大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学
(〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3)

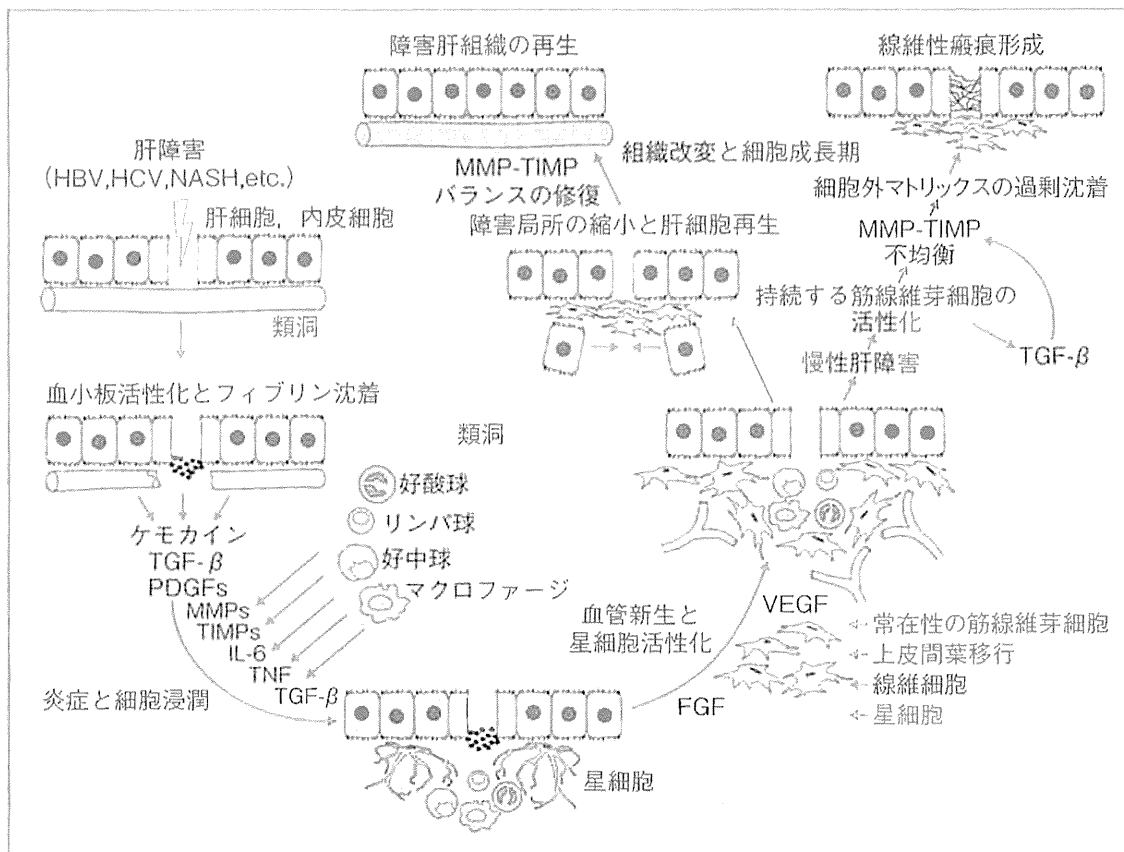


図 肝障害と治癒過程並びに線維化が生じるメカニズムを示す模式図

vascular endothelial cell growth factor (VEGF) の産生, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) の分泌を行う。これにより炎症局所に基底膜様構造を構築し, 肝細胞再生の土台を作り, 血管新生を伴いながら組織修復を行う。これが急性肝炎のように炎症が一過性で終焉した場合のシナリオである²⁾。

しかしながら, 肝炎ウイルス感染や脂肪性肝炎のように炎症が慢性化してしまうと, activator protein 1 (AP-1) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの転写因子の持続活性化とともに星細胞も持続活性化し, MFB 様の細胞として TGF-β の産生・活性化とそれを介する TIMP-1 過剰産生が生じ, TIMP-1 と MMPs との相対的アンバランスが生じて組織に I 型コラーゲンが蓄積する。また, MFB は nuclear factor κB (NFκB) や phosphoinositide 3-kin-

ase-Akt 経路の活性化により細胞死抵抗性となり, 新生血管の構築を伴いながら線維性隔壁を構成して瘢痕形成を行う。また, MFB 化した星細胞は macrophage chemotactic protein (MCP), macrophage inflammatory protein (MIP), CC や CXC などのケモカイン産生, 抗原提示, toll-like receptor 4 (TLR4), TLR2, TLR9 や CD14 の発現を伴った腸内細菌叢由来産物(エンドトキシン, 細菌 DNA, ペプチドグリカン, さらには宿主 DNA) への高反応性を介して, O₂⁻, nitric oxide などの活性酸素種を産生させ, 局所炎症を持続させる。

2. 星細胞以外の線維化への関与

星細胞以外にも門脈域 MFB が線維化反応に参加する。MFB には星細胞由来と門脈域線維芽細胞由来の 2 種類が存在する。近年この 2 者

は、前者が desmin, reelin, プロテアーゼ P100, サイトグロビン, alpha-2 macroglobin や synaptophysin を, 後者が IL-6, fibulin-2, Thy-1 (THYMocyte differentiation antigen 1), elastin や cofillin を高発現することで区別できるとの報告がなされてきた。また, 中皮由来の MFB の関与や, 少ないながらも線維細胞, 骨髄由来の細胞群らが線維性隔壁構成に加わる。これらが同時進行して組織硬度が増し, 組織が改築していく。肝臓においては, 上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) による上皮由来細胞の線維化反応への関与は否定的である³⁾。

3. 星細胞に関する最新の知見

星細胞の活性化にまつわる最新情報として, 星細胞内の脂質代謝が挙げられる。上述したように静止期星細胞はレチニールエステル, トリグリセリド, コレステロールや脂肪酸を含有する脂肪滴を有し, 脂質生成系の遺伝子である acetyl CoA carboxylase, fatty acid synthase や fatty acid binding proteins を発現し, また, 脂質生成系転写因子である SREBP-1c, C/EBP, LXR α や PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) を発現するが, これらは活性化とともに発現減少, 低下する。すなわち, 脂質代謝系にリプログラミングが生じる。一方, オートファジーによる脂質貪食が星細胞の活性化に関わる可能性も示唆されている。

また, エピジェネティックな星細胞制御についても近年議論されている。その一つは microRNA (miRNA) である。miRNA は non-coding RNA の一つであり, 21~23 塩基長の小さな RNA でそれ自体は mRNA にはならない。しかしながら, mRNA の 3'-UTR 領域に結合することで mRNA から蛋白質への翻訳や mRNA の安定性に関与する。miRNA 自体も転

写因子 RNA ポリメラーゼ II で発現制御される。星細胞も多様な miRNA を発現することが報告されている。筆者らは, miR-29b が星細胞のコラーゲン発現に重要であること, 並びに miR-221/222 の発現はヒトの線維化ステージときわめてよく相関することを報告した⁴⁾。標的となる遺伝子の解析は困難なところでもあるが, miRNA による星細胞制御は興味深いテーマである。一方, DNA のメチル化による遺伝子発現制御も興味をもたれるところである。星細胞の活性化とともに DNA-methyl binding protein (MeCP2) が発現し, それに伴い抗線維化因子である I κ B α や PPAR γ の発現が抑制され, コラーゲン, TIMP-1, TGF- β の発現が増強する。また, 線維化を生じた雄マウスから生まれたマウスは, 線維化歴のないマウスから生まれたマウスとは異なる線維化応答を示すことが報告された。このように線維化に関与する DNA メチル化やヒストンアセチル化が雄の精子を介して子孫に伝承することが示されたことは興味深い⁵⁾。

II. 肝線維化の可逆性

- 線維化の可逆性が判明したが, どの程度の線維化が可逆的であるかどうかは, まだ議論の余地がある。

1970 年代までは線維化は病態の終末像であり可逆性はないと考えられてきた。しかしながら C 型慢性肝炎・肝硬変でインターフェロン療法により C 型肝炎ウイルスが排除されたり, B 型慢性肝炎・肝硬変で核酸アナログ製剤により B 型肝炎ウイルス量が制御されるようになってくると, 組織病理学的に線維化のステージが後退(改善)することがわかった。すなわち, ヒトの線維化は可逆的である。動物モデルにおいても, 肝臓毒を投与して誘導した線維形成は肝臓

毒投与の中止とともに速やかに改善することが確認され、このプロセスは TIMP-1 の発現低下による MMPs の機能回復に由来することが示された。

星細胞の機能としては下記のような側面が関与する。

1. アポトーシス

四塩化炭素投与ラット線維化モデルにおいて、8週間後に四塩化炭素投与を中止すると急速に TIMP-1 発現が低下し、これはアポトーシスによる活性化星細胞数の減少を伴うことが報告された。TIMP-1 は活性化星細胞の生存に関係する。また、活性化星細胞に発現する NF κ B は抗アポトーシス因子であり、NF κ B 阻害剤は活性化星細胞にアポトーシスを誘導させ線維化を改善させる。

2. 星細胞の老化

老化 (senescent) 星細胞は増殖能の低下、MMP 発現の上昇、ECM (細胞外マトリックス) 蛋白発現低下により総じて組織線維化の改善に寄与する。また、老化星細胞は NK 細胞により排除される。

3. 活性化状態から静止状態への逆戻り

近年の cell tracking 研究に基づくと、活性化星細胞は、肝障害の終焉とともに静止期星細胞へと逆戻りができることが示された。しかしながら、脱活性化した星細胞は静止期星細胞とまったく同じ性質を示すとは言い切れず、再度炎症刺激が生じた際により活性化されやすいプライミング状態にあることが推測された⁶⁾。

ところで、どの程度の線維化が可逆的であるかどうかはまだ議論の余地がある。臨床的に F1, 2 程度の線維化は治療により原因が取り除かれると消失することが期待されるが、F3, 4

まで進行した症例での線維の完全消失は困難かもしれない。この理由としては、たとえば I 型コラーゲン線維の架橋形成により MMP 作用が及びにくくなっていることが推測される。コラーゲン線維の架橋形成にはトランスグルタミナーゼやリジルオキシダーゼが寄与する⁷⁾。非常に興味深いことに lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) の阻害が抗線維化的に作用することが動物モデルで示されており、抗 LOXL2 抗体による抗線維化療法が NASH (非アルコール性脂肪肝炎) 患者に対して臨床試験中である。

Ⅲ. 肝線維化と発がん

- 筆者らは、サイトグロビンというグロビン蛋白を発見し、サイトグロビンが肝発がん過程に深く関与することを見出した。

近年、線維化肝という微小環境の肝発がんへの関与が着目されている。それらには細胞外マトリックスによるインテグリンシグナルの増強、活性化星細胞と肝細胞相互間のシグナル伝達、間質硬度の上昇、細胞外マトリックスに付着する成長因子の遊離、NK 細胞による腫瘍監視機構の破綻などが含まれる⁸⁾。

1. 星細胞や MFB の関与

星細胞は hepatocyte growth factor, IL-6 や Wnt シグナルを産生し肝細胞の増殖に至適な条件を提示する。MFB も同様に PDGF や TGF- β 依存性メカニズムによってがん化した肝細胞の成長や遊走を支援する。また、活性化星細胞は angiopoietin 1 を産生することで腫瘍増殖に必要な血管新生を誘導する。一方、腫瘍からの hedgehog シグナルは MFB の活性化や線維化の維持に重要である。また、星細胞は(がん)幹細胞に対して“niche”として機能することが示唆されており、そのパラクリン分子の性

質の解析が待たれるところである。

2. サイトグロビンの関与

ところで筆者らは、サイトグロビンという哺乳類第4番目のグロビン蛋白をラット星細胞から見出した。このグロビン蛋白は、3次元立体構造やガス分子への解離定数などの性質はほぼミオグロビンと同等である。サイトグロビンは抗酸化機能としてペルオキシダーゼ活性や過酸化脂質の産生を抑制することができる。筆者らはその欠損マウスを用いた解析により、サイトグロビンが肝細胞の発がん過程に深く関与することを見出した。すなわち、サイトグロビン欠損により肝臓は易発がん性を呈するため、どのような分子機構が介在するのか、解析を進めているところである⁹⁾。

3. 細胞外マトリックスと成長因子

一方、肝硬変の際に組織に沈着する細胞外マトリックスは成長因子をその受け手となる細胞から、いわば、隔離しており、状況に応じて成長因子を隔離から解き放してシグナル分子として機能させている¹⁰⁾。もともとこのような細胞外マトリックスによる成長因子“隔離”の研究は fibroblast growth factor (FGF) において追究されてきたが、FGF も含めて TGF, bone morphogenic protein (BMP), Wnt やインターロイキン類も同様の挙動を示す。このプロセスのなかで MMPs は重要な役割を果たす。すなわち、MMP が成長因子を細胞外マトリックスから遊離させてリガンドとして働かせる一方で、MMP は成長因子受容体をそのプロテアーゼ活性により細胞表面から遊離させ、細胞を成長因子不応性にもさせてしまう。一方、TGF- β は線維化促進因子として重要であるが、細胞外マトリックスに“隔離”されていた TGF- β の過剰遊離は腫瘍の増殖を抑制し、アポトーシス

に陥らせる可能性もある。このように、細胞外マトリックスと成長因子間の相互作用はきわめて複雑であり、状況に応じた制御がなされるため、実験で得られた事実の解釈は慎重に行うことが重要である¹¹⁾。

IV. 肝線維化治療法開発の現状

この頃のポイント

- 高齢者の線維化進行例、あるいはウイルスが関与しないアルコール性肝障害や NASH を改善させる治療法の開発が急務である。
- 非侵襲的かつ反復して線維化度を判定できるバイオマーカーの開発も重要である。

C型やB型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の進歩は顕著であり、両疾患ともに多数の症例においてウイルスの消失や制御が可能になってきた。したがって、早期発見・早期治療を念頭におけば線維化の改善と肝機能の維持、さらには発がん抑制が達成される。しかしながら、高齢者の線維化進行例やウイルスが関与しないアルコール性肝障害や NASH においては、線維化の進行を抑制する、あるいは、改善する治療法の開発は急務である。マウスやラットの肝線維化は肝障害後の回復速度が速いため治療効果の判定が容易であるが、ヒトの場合は数年にわたる臨床試験が必要であることが治療法開発にとっての壁となっている。また、非侵襲的かつ反復して線維化度を判定するバイオマーカーの開発を進めることも重要である。以下、最近の抗線維化治療法開発について概説する。

1. 既存薬

コルヒチン、IL-10、ホスファチジルコリン、ビタミンE、漢方薬などは動物実験での有効性が数多く報告されてきたが、臨床的エビデンスに欠けている。PPAR γ リガンドの星細胞活性化抑制作用が期待されたが、farglitazar を用い

たC型慢性肝炎による抗線維化作用は確認されなかった。シリマリンは抗酸化作用により細胞保護的、抗線維化的効果をもつと予想されるが一定の臨床効果は報告されておらず、HCV肝炎やNASHに対する臨床試験の結果を待たざるをえない。それらのなかで、ウルソデオキシコール酸は種々の肝障害において肝細胞保護的に作用する薬剤であるが、とくに原発性胆汁性肝硬変においては抗線維化作用が期待できる薬剤である¹²⁾。

2. 新しい抗線維化治療法のターゲット

1) 腸内細菌叢

近年の多数の研究成果は、腸内細菌叢由来の物質が肝臓の炎症、線維化やさらには発がんに寄与することを示している。リポポリサッカライド受容体であるTLR4の活性化は星細胞からのケモカインの遊離を促すのみならず、TGF- β の擬似受容体であるBambi(BMP and activin membrane bound inhibitor)を低下させ、これにより星細胞のTGF- β 感受性を増強させる。また、腸内細菌叢の変化が肝線維化に関与することも報告された¹³⁾。

2) microRNA

前述したようにmiRNAは星細胞の機能を制御しうるnon-coding RNAである。miR-29bがコラーゲン産生を抑制するため、核酸創薬の標的となりうる¹⁴⁾。

3) LOXL2

コラーゲンやエラスチンに架橋形成を行う際に重要で銅依存性の細胞外酵素であるため、LOXL2の阻害は抗線維化的に作用することが期待される。

4) nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

酸化ストレス応答で活性化される種々の遺伝子を転写調節するため、抗線維化作用を併せも

つと期待される。

おわりに

肝線維化研究は最近の20年間で大きく進歩した。星細胞の機能解析が果たしてきた役割は大きいですが、本細胞の特異機能解析ですらまだ道半ばという段階である。すなわち、なぜに星細胞にビタミンAが貯蔵されるのか、星細胞活性化の真のトリガーは何なのか、発がん機構への関与はどうか、など疑問点は尽きない。また、抗線維化治療法開発のためには、線維化を評価するために肝生検というゴールドスタンダードに変わりうるバイオマーカー開発が必須である。肝細胞の機能維持、さらには発がん予防という観点から、肝線維化研究による肝硬変治療法開発は成し遂げなければならない医学的テーマである。

文 献

- 1) Wynn, T. A. and Ramalingam, T. R. : Mechanisms of fibrosis : therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* 18 ; 1028-1040, 2012
- 2) Kawada, N. : Evolution of hepatic fibrosis research. *Hepatology Res.* 41 ; 199-208, 2011
- 3) Friedman, S. L. : Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 7 ; 425-436, 2010
- 4) Ogawa, T., Enomoto, M., Fujii, H., et al. : MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut* 61 ; 1600-1609, 2012
- 5) Zeybel, M., Hardy, T., Wong, Y. K., et al. : Multigenerational epigenetic adaptation of the hepatic wound-healing response. *Nat. Med.* 18 ; 1369-1377, 2012
- 6) Troeger, J. S., Mederacke, I., Gwak, G. Y., et al. : Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology* 143 ; 1073-1083, 2012
- 7) Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., et

- al. : Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic micro-environment. *Nat. Med.* 16 ; 1009-1017, 2010
- 8) El-Serag, H. B. : Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142 ; 1264-1273. e1, 2012
- 9) Thuy le, T. T., Morita, T., Yoshida, K., et al. : Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 179 ; 1050-1060, 2011
- 10) Schrader, J., Gordon-Walker, T. T., Aucott, R. L., et al. : Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53 ; 1192-1205, 2011
- 11) Seki, E., Brenner, D. A. and Karin, M. : A liver full of JNK : signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 143 ; 307-320, 2012
- 12) Rockey, D. C. : Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11 ; 224-231, 2013
- 13) Dapito, D. H., Mencin, A., Gwak, G. Y., et al. : Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell* 21 ; 504-516, 2012
- 14) Sekiya, Y., Ogawa, T., Yoshizato, K., et al. : Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412 ; 74-79, 2011

Summary

Molecular Research on Liver Fibrosis

Norifumi Kawada*

Liver fibrosis occurs along with chronic inflammation and hepatocyte damage caused by various etiologies, including viral hepatitis infection, alcohol abuse, and steatohepatitis. Hepatic stellate cells become activated when exposed to bioactive mediators released from injured hepatocytes and sinusoidal cells consisting of Kupffer cells, endothelial cells, and immune cells. They then undergo a phenotypic transition from vitamin A-storing quiescent cells into myofibroblast-like cells. These synthesize extracellular matrix materials including type I collagen. The molecular mechanism of stellate cell activation has evolved over the past 2 decades. Research has uncovered the epigenetic aspects of these mechanisms. Research on liver fibrosis has attracted researchers' attention to the relationship between hepatocarcinogenesis and the development of therapeutic strategies for treatment of chronic liver disease.

Key words : stellate cell, myofibroblast, extracellular matrix, growth factor, carcinogenesis

**Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka-shi, Osaka 545-8585, Japan*

連載講座 細胞増殖-6

miRNA-195 によるサイクリン E1 の 発現抑制

河 田 則 文

生 体 の 科 学

第 65 卷 第 1 号 別刷

2014 年 2 月 15 日 発行

miRNA-195 によるサイクリン E1 の 発現抑制

河田 則文

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は蛋白質へ翻訳されないノンコーディング RNA (non-coding RNA) の一つであり、近年、その細胞内での機能解析が急速に進展している。その一方、比較的安定である miRNA をバイオマーカーとして用いたり、核酸医薬品の一つとして開発応用する動きがある。筆者らは以前から肝臓の炎症反応や線維化反応の分子機構を研究してきたが、その過程で miRNA が肝構成細胞の一つである肝星細胞の増殖やコラーゲン産生を調節することを見いだして報告してきた。前者においてサイクリン E1 (Cyclin E1) 発現を制御する miRNA として miR-195 を同定し、そのメカニズム解析を行ってきた。本稿では miRNA と肝病態に関してこれまでに筆者らが得た知見を基に概説する。

I マイクロ RNA とは？

miRNA は蛋白質への翻訳はされない 22 塩基程度のヌクレオチドで構成されるノンコーディング RNA であり、動物のみでなく植物にも存する。その主要な働きは相補的配列を持つ mRNA に結合することで転写あるいは転写後調節を行い、遺伝子の発現を制御することである。現在までに 1,000 種類以上の miRNA が同定されており、それらは約 60% の哺乳類遺伝子を標的にすると推定されている。miRNA はある特定の mRNA に対して 1 対 1 対応するのではなく、一つの miR-

NA が多種類の mRNA 機能を調節しうるところが特徴である¹⁾。

miRNA は 1993 年に Victor Ambros, Rosalind Lee, Rhonda Feinbaum によって *C. elegance* の発生を研究する過程で lin-4 遺伝子にコードされる短い RNA として発見された。let-7 が第二の miRNA として *C. elegance* で発見されるまで実に 7 年を要している (2000 年)。これ以降、様々な動物種で miRNA の存在が明らかにされてきた。

miRNA はそれら自身の遺伝子から、あるいは約 49% はイントロン部から産生される。RNA ポリメラーゼ II により転写を受けると 5' 末端が cap 構造をとり、3' 末端に Poly(A) tail を持つ primary-miRNA が生じる。この primary-miRNA は核内に存在する RNase III 酵素の Drosha により一部が切断されて pre-miRNA となり、Exportin-5 に結合して核外へ輸送される。サイトゾールに移動した pre-miRNA は RNase III 酵素の一つである Dicer により 20-25 塩基の成熟した miRNA へと切り出される。成熟 miRNA は Dicer やその他の関連する蛋白質で構成される RISC (RNA-induced silencing complex) を構成し、標的とする mRNA の発現調節を行うことになる^{2,3)}。

II 肝臓と microRNA

肝臓における miRNA 発現の特徴の一つとし