

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）

研究分担者 河田則文 大阪市立大学 教授

分担研究課題：HBV ウイルス感染による肝線維化機序の解明

研究要旨：慢性肝疾患では肝線維化の進展が患者の予後を左右するため、肝線維化のさらなる分子メカニズム解析、診断法や治療法の確立が急務である。肝線維化の診断法においては組織学的検査のように侵襲的なものではなく、血清バイオマーカーやFibroscanのように非侵襲的に肝線維化を診断することが臨床的に重要な課題であり、近年、血中マイクロRNA (miRNA)のバイオマーカーとしての有用性が議論されている。今回の研究では、B型慢性肝炎の肝線維化マーカーとなりうるmiRNAを同定することを目的とする。一方、我々はサイトグロビン (cytoglobin, Cygb)の肝炎症・線維化、発がんへの関与に注目しており、本分子のヒト肝組織での発現が線維化と関係する可能性を見出してきた。本研究では、B型慢性肝疾患組織におけるmiRNAとCygb発現の関係に焦点を絞って解析する。

A. 研究目的

直接型抗HCVの開発により慢性C型肝炎では効率よくウイルス排除が得られるようになり、ウイルス学的著効(SVR)がほぼ100近く達成する事が可能になった。一方、B型肝炎では核酸アナログ製剤でウイルスを制御することは可能となったが、一旦感染したB型肝炎ウイルス(HBV)を肝細胞から駆除することは依然として困難であり、肝細胞内でのウイルス持続感染は肝臓における慢性的な壊死・炎症を惹起し、それに対する非実質細胞(肝星細胞、筋線維芽細胞など)による修復と実質細胞(肝細胞)の再生が、肝線維化と肝発癌に繋がると考えられている。従って、血清中のHBVをモニターするのみでなく、肝組織内の病態を把握できるマーカーが重要である。これまで肝線維化の評価は肝生検による病理診断で行われてきたが、侵襲的でありあるため非侵襲的で反復検査が可能な方法の出現が望まれている。近年、FibroScanのような組織硬度を測定する医療機器が開発されているが、高価であり全ての医療機関で導

入されることは困難である。一方、我々の研究グループではラット肝星細胞からサイトグロビン (cytoglobin, Cygb) というグロビン蛋白を見出した。即ち、Cygbはミログロビン (Mb)、ヘモグロビン (Hb)、ニューログロビン (Ngb) に次いで哺乳類4番目のグロビンであると判明した (J Mol Biol 2004;339:873; Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 2006;62:671)。我々はCygbの生体内における役割を明らかにする目的でCygbノックアウトマウス (Cygb^{-/-}) を作製し、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) による肝癌発生モデルを作製した。その結果、Cygb^{-/-}は野生型に比較して増強した肝線維化反応を伴いながら易発がん性を呈すること、さらに、その過程に酸化ストレスの亢進状態が関与することを観察した (Am J Pathol 2011;179:1050)。即ち、Cygb欠損は、DEN処理下の肝臓において炎症・酸化ストレス・線維化反応を有意に増強させていた。また慢性C型肝炎の治療前肝生検組織105例よりmiRNAの解析をマイクロアレ

イでおこない肝線維化の進展に関連する miRNAを同定した(PLoS ONE 2012)。以上のようなこれまでの研究を背景としてヒトの慢性肝障害におけるCygb発現を臨床サンプルで精査して、Cygbのヒト慢性肝障害への寄与、特に、B型慢性肝炎での発現変動を解析する。

B. 研究方法

1. 平成26年度

1) 患者への研究参加の説明と同意の取得
対象は肝生検を受けるB型慢性肝疾患患者。本研究は臨床検体(肝組織、血液)を対象としたものであり、所属大学である大阪市立大学医学部倫理委員会へは本研究の内容を報告し審査の上、承認を得た。

2) 臨床検体の採取と保存

・肝組織の保存：15G Tru-cut 針を用いて肝生検を行い、病理組織学的に肝臓の壊死・炎症と線維化診断に必要な量が十二分に採取された場合の余剰の肝組織の一部を本研究に用いる。得られた肝組織はRNAlater (Ambion Inc.) に速やかに浸透し2時間室温で静置した後、一旦-30℃で保存する。その後、mirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems)を用いて total RNA を抽出し-80℃で保存する。

・血清の保存：肝生検の前後あるいは抗ウイルス治療を行う際に経時的に血清を採取し-80℃で保存する。

3) データファイルの作成と管理

・臨床背景(年齢、性別、血液生化学所見、ウイルス学的検査、病理学的検査)のデータファイルを作成し、外部メディアの連結していないPCにて保存する。個人情報と臨床情報と連結可能匿名化を行い厳重に管理する。

4) ヒト肝組織におけるCygbの発現

生検で得られたヒト肝組織を用いて、免疫染色でCygb発現を検討する。

(a)ヒトの慢性肝炎、肝硬変、肝がん組織におけるCygb陽性細胞の存在様式についての検討

ヒト肝組織の実質部、グリソン鞘や線維性隔壁部、がん部(C型とB型、非B非C型由来、がんも高分化型、低分化型など分化度を病理医とともに診断)をCRBP-1、Cygb、SMA、FBLN2に対する抗体を用いて染色し、Cygb陽性細胞の存在様式を明確化する。多重の蛍光抗体法を用いてその細胞の分類を行う。

(b)肝癌の腫瘍部とその周囲の非腫瘍部における筋線維芽細胞の挙動とそれらが発現する分子(特にTGF-βやVEGFなどの増殖因子)とその受容体、さらには、細胞シグナルの活性化との関係を詳細に検討し、Cygb発現細胞の存在様式を明らかにする。

5) マウス慢性肝疾患モデルの作成

線維化に関与するmiRNAの機能解析をin vivoで行うために、四塩化炭素(CCL4)の腹腔内投与とチオアセトアミド(TAA)投与マウスを慢性肝疾患モデルマウスとして使用した。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

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。

C. 研究結果

(1) B 型慢性肝疾患患者血清ならびに組織において肝線維化に関係する miRNA の同定とその機能解析

現在マイクロアレイを用いてデータを取得した状態で、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、肝線維化の状態に応じて発現が変化している miRNA は複数個得られるが、その中からもっとも肝線維化の程度と相関している miRNA として miR-29 family を同定した。また miR-29a/b/c の標的遺伝子同定には miRTarBase

(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.php>) を用いておこなった。

肝組織中の miRNA の中で肝線維化に関係しているものとしてスクリーニングを行い、肝星細胞株 (LX-2) に該当する miR-29a を過剰発現し、標的遺伝子候補として Collagen 1 1(Col1A1), platelet derived growth factor C (PDGFC) の発現が低下することを確認した。

(2) ヒト B 型慢性肝疾患組織における Cygb の発現解析

Cygb は抗酸化作用を持つグロビンであるためその多寡が慢性炎症や組織線維化に寄与する可能性がある。当研究室ではヒトの Cygb に反応するモノクローン抗体を既に 2 種類作製した。これを用いて免疫組織学的に Cygb 発現を解析する。

C 型慢性肝疾患組織を用いた検討より、Cygb は特に F4 組織で発現が低下すること (Lab Invest 2014) やヒト肝癌組織では Cygb mRNA 発現が有意に低下することを観察した(論文執筆中)。

(3) 肝線維化が進行した CCL4 マウス、TAA マウスに miR-29a を尾静脈より投与したところ肝線維化が改善する事が分かった。Cygb と miR-29a の発現は両者間に相関は見られなかった(論文執筆中)。

D. 考察

miRNA が発癌に関与している事はほぼコンセンサスになっており、miRNA の発現異常に伴って miRNA が発現している癌遺伝子または癌抑制遺伝子の発現がカスケード式に変化する事など新たな知見が明らかになっている。これに対し、B 型慢性肝疾患の肝線維化機構における miRNA の意義を検討した研究の報告はほとんどない。我々は C 型慢性肝疾患において miR-221 と miR-222 は、ヒトの C 型慢性肝炎において肝線維化の進行につれて発現上昇すること、I 型コラーゲンや平滑筋アクチンの mRNA 発現と良好な相関を示すこと、2 種類の肝線維化動物モデルでも肝線維化の進行につれて発現上昇すること、培養肝星細胞の活性化に伴って発現上昇することなどを見出した (Gut 2012)。本研究では B 型慢性肝疾患において **肝線維化の進展に関与する** miRNA を同定し、臨床応用可能な肝線維化マーカーの開発を目指す。予想される結果として、i) miRNA を用いて非侵襲的に肝線維化を診断することが出来れば、反復して検査することが可能となり、治療による肝線維化改善効果を判定することが出来る。ii) また日常臨床上の利用のみならず、検診などにおいてのスクリーニング目的でも利用可能かもしれない。iii) 肝線維化は発癌の前段階と考えられるため、当該 miRNA は腫瘍マーカーとしても利用可能かもしれない。iv) 肝線維化の分子機構を解明することは、究極的には抗線

維化治療の開発に繋がる可能性がある。

一方、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。

Cygb が腫瘍抑制的であるとすると、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。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可能性もある。従って、本分子の発現動態を慢性 B 型肝炎で特定することは臨床的意義がある。

E. 結論

B型慢性肝疾患におけるmiRNAならびにCygb発現動態を検討し、最終的には病態を反映するバイオマーカー開発に繋げる。

F. 研究発表

論文発表

1. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. Hai H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 2014; 20: 6236-43.
2. Noninvasive assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Enomoto M, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *World J Gastroenterol*. 20: 12031-8 (2014).

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。