

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 河田 則文

平成26(2014)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		
河田 則文	-----	1
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	-----	6
池田 一雄		
2 . 肝線維化を制御するマイクロRNAの同定	-----	9
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	-----	14
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	-----	16
松原 勤		
5 . 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	-----	19
祝迫 恵子		
6 . サイトグロビンの発がんへの寄与のin vivo解析	-----	22
LE THUY		
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27
IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	29

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25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の発想で、一物質として成長因子Xを同定した。現在その詳細な分子メカニズムを研究している。本Cygb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ら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。平成25年度でin vitro POCを確立しつつあり、順次in vivo POC作製に向けた準備を行う。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

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 教授
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 准教授
仲谷和記 大阪市立大学大学院医学研究科
機能細胞形態学 准教授
松原 勤 大阪市立大学大学院医学研究科
機能細胞形態学 講師
祝迫恵子 京都大学大学院医学研究科
標的治療腫瘍学講座 特定講師
Le Thuy 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

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; Hepatol 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、特願2010-52244)。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

[1]–[3]を平成25–27年度前半で行い、[4]の準備を平成27年度後半から行なう。

[1]前臨床試験

Cygb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 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 Lhx2 プロモーターを用いたコンディショナルノックアウトマウスを作製し実験を行う。(Le, 祝迫)

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。例えば東京大学創薬オープンイノベーションセンター等を利用して 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 γ ; 脱分化) プロモーターの下流にレポーター遺伝子 (ZsGreen1 や 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、現在見出している Cygb 活性化薬 X 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。また、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 mRNA 発現抑制 ; PPAR 発現誘導など。以上から 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)

[2] 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。(Le)

C. 研究結果

• 研究代表者(河田則文)

(1) Cygb-null マウスを CDAA 食で飼育すると全マウスで腫瘍が形成された(野生型マウスでは腫瘍形成なし)。Cygb-null マウスの背景肝ではマクロファージなどの炎症細胞浸潤が著明で、I型コラーゲン沈着が顕著であった。線維化やがん関連遺伝子発現が Cygb-null マウスで有意に高かった。この反応はマクロファージを除去することや N-アセチルシステイン投与で予防できた。

(2) アルンジン酸はヒト星細胞株 HHSteC に対して予想通り細胞増殖を抑制し、平滑筋アクチン発現を濃度依存性に低下させ、逆に Cygb 発現を増加させた。

(3) HHSteC を用いる事で、HHSteC 内の Cygb 量を発現誘導する因子 X を新たに発見した。この因子はペプチドであることを見出し、その同定を急いでいる。アルンジン酸に変わるペプチド性因子による Cygb 誘導分子機構を検討することで新たな抗線維化治療戦略が見出される可能性がある。

(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) HSC や MFB のエピジェネティック変化が、細胞分化、脱分化あるいは老化過程で変化するかどうかを検討するために、転写因子 PPAR を強制発現させるアデノウイルスベクターを作製し、LX2 細胞での発現を確認した。

• 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、LX2 を使った実験で過剰発現させた際に alpha-1 procollagen の発現を亢進するものを 2 種、低下するものを 3 種同定。

(2) 肝細胞と肝星細胞の相互作用を明らかにするために、肝癌細胞株の上清、エクソソーム、エクソソーム除去上清のそれぞれを回収し、それに含まれるサイトカイン、miRNA の発現を解析した。

• 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 PPAR α 遺伝子と 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減弱する PPAR α 遺伝子と発現亢進する 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) 肝細胞の癌化における星細胞の細胞老化の影響を検討するため、現在、LX-2 細胞、HHSteC 細胞、マウス星細胞を増殖させ、各々の細胞老化状態を構築中である。

- 研究分担者(祝迫恵子)

(1) 肝構成細胞の主分画である肝細胞、肝非実質細胞(肝星細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞)をマウスより採取し、フローサイトメトリーおよび磁気細胞分離法により分離し、純度を確認した。

(2) 分離初代培養細胞に対する薬剤の影響を検討するため、培養条件、薬剤濃度などの検討を進めている。

- 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、 H_2 の肝がん抑制効果を検討中である。

- 研究分担者(Le Thuy)

(1) 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った結果、Cygb 欠損により HSC がプライミングを受け、野生型 HSC に比較して活性酸素やケモカインを過剰産生することが判明した。野生型 HSC に siCygb を作用させて Cygb を発現低下させると、同様の現象が確認できた。

(2) アルンジン酸の *in vivo* 抗線維化効果についてマウスモデルで検討を進めている。

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アルンジン酸が肝線維化に役立つことを見出した。同様の手法を用いてCygb研究を展開させ有効化合物を見出す。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らう。

F. 研究発表

論文発表

- | | |
|---|---|
| <p>1. <u>河田則文</u> サイトグロビン研究の現状と展望 日本臨床 2013;71:927-103</p> <p>2. <u>河田則文</u> 肝線維化と星細胞 Surgery Frontier 2013;20:72-75</p> <p>3. <u>河田則文</u> 肝線維化機序研究の進歩 臨床消化器科 2014;29:421-427</p> <p>4. <u>河田則文</u> サイトグロビン研究の現況 細胞 2013;45:598-600</p> <p>5. 元山宏行、Le Thi Thanh Thuy、<u>河田則文</u> 肝臓とサイトグロビン 細胞 2013;45:609-612</p> <p>6. 吉里勝利、<u>河田則文</u> 哺乳類第4番目のグロビン、サイトグロビンの発見 細胞 2013;45:601-604</p> <p>7. <u>河田則文</u> 肝硬変 第2章 病理・病態生理 病因 最新医学社 2014 (別冊) p31-38</p> <p>8. 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, <u>Kawada N</u>. Lab Invest. 2014;94:192-207.</p> | <p>Hepatic Sinusoid. 2013, September 23-25, Osaka, Japan</p> <p>2. Accelerated liver cancer development in Cytoglobin-deficient mice treated with chemicals/diet via the priming of stellate cells and activation of local fibrosis, inflammation, and oxidative stress. Le TT, Matsumoto Y, Hai H, Yoshizato K, <u>Kawada N</u>. AASLD-The Liver Meeting 2013, November 2-5, Washington DC, USA</p> <p>G. 知的所得権の取得状況</p> <p>1. 特許取得
なし</p> <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし。</p> |
|---|---|

学会発表

1. Thuy Le, Suoh M, Matsumoto Y, Hirano Y, Motoyama H, Hai H, Tuong T, Urajara Y, Yoshizato K, Kawada N. Progression from NASH to liver cancer in the absent of cytoglobin. International Society for Hepatic Sinusoidal Research, 17th International Symposium on Cells of the

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 25 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領域をChipシーケ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を明らかにすることを目的としている。iPS細胞作製でも明らかのように様々な細胞で、転写因子の強制発現により細胞が分化誘導されることが知られている。今年度は、肝星細胞の分化誘導にKeyとなる転写因子のひとつであるPPAR α を発現させるアデノウイルスベクターを作製した。このウイルスを用いて肝星細胞にPPAR α を強発現させることができた。

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、microRNA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。

B. 研究方法

脂肪細胞の分化誘導のKeyとなる転写因子のひとつであるPPAR α を発現させるアデノウイルスベクター作製のためcosmid pAxCALNLw(TAKARA)にPPAR α cDNAを挿入し、既報のごとくPPAR α 発現アデノウイルスベクターを作製した。

ラットおよびマウス肝臓よりコラーゲナーゼ、プロナーゼ還流法とナイコデンツ密度勾配遠心法により肝星細胞を分離培養した。ウイルスベクター発現には、分離培養細胞とLX-2細胞株を用いた。

C.D. 研究結果と考察

PPAR α 発現アデノウイルス作製において、cosmidへのPPAR α cDNA挿入を確認後、ウイルス作製課程で5つのクローンをpick upし、DNA解析で異常のない2つのクローンで3次

ウイルスを作製した。

2つのクローンを Cre-CAG アデノウイルスと共に分離培養肝星細胞、LX-2 に共感染させたところ、ウエスタンブロットングの蛋白発現解析では、1クローンだけに PPAR α の共発現が確認できた。また、細胞の形態的観察では、PPAR α 発現とコントロールとの間においても特別な差は認められなかった。

分化誘導の Key となる転写因子 PPAR α を発現させることで、肝星細胞のエピジェネティクス制御に変化を見ることができるといわれている領域を Chip シークエンスを用いて解析する予定である。また、ヒト肝臓組織での線維化領域での SM α actin は、均一ではなく、SM α actin の発現の有無によるヒストン 2A.Z やヒストン 3.3 の領域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

1. 論文発表

1. Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H. Efficient engraftment of human iPS cell-derived

hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene. Cell Transplantation, 2014 in press.

2. Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbontetrachloride-induced liver fibrosis. Hepatol Res. 2014 in press

2. 学会発表

1. Matsubara T, Kitamura K, Teranishi Y, Kawada N, Ikeda K. Stress influences on bile acid homeostasis in development of diet-induced steatohepatitis. AASLD November, 2013, Boston
2. Teranishi Y, Matsubara T, Iwaisako K, Nakatani K, Thuy LT, Gonzalez FJ, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Unexpected influence of oxygen-binding cytoglobin expressed in stellate cells on acetaminophen-induced acute hepatocyte damage; in vivo and in culture studies. AASLD November, 2013, Boston
3. Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H. Over-expression of Bcl-xL mutant (FNK) improves the engraftment efficacy of human iPS cell-derived hepatocytes in the liver of uPA/SCID mice. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society

for the Research of Hepatic Cells. Sep, なし
2013, Osaka

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 25 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：肝線維化を制御するマイクロ RNA の同定

研究要旨：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本邦で全人口の約 3.5%である。肝炎ウイルスに感染すると高率に慢性化して、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。抗ウイルス薬は最近の進歩で難知性であった HCV genotype 1b であっても奏効率 80%以上期待出来る疾患となった、しかし慢性 B 型肝炎や既に線維化が進行している肝硬変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状況である。今回マイクロ 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 万人の感染者があり、アルコール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を標的とする薬剤が開発されたことがあり、奏効率は 80%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策が取れ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、肝発癌に miRNA の発現異常が深く関係している事を今までに明らかにした (Murakami Y et al. PLoS ONE 2011)。

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、線維化を制御できる方法を明らかにし、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

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 例より miRNA の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 を過剰発現し、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。

肝星細胞の活性解析

肝星細胞株の LX-2 に miRNA をトランスフェクションし、細胞増殖マーカーとして XTT アッセイを行った。また星細胞が活性化する際に collagen 1 が発現することを受けて、その前駆体である procollagen alpha-1 遺伝子発現をリアルタイム PCR で確認した。

慢性肝疾患マウスモデルの作成と in vivo 実験

5 週間四塩化炭素を投与したマウス、5 週間投与後さらに 1 週間経過観察したマウス、それぞれより肝、腎、脾、心、肺、脂肪組織、精巢、

の変化を明らかにした。またマウス尾静脈より該当する miRNA を投与し、1 週間後に屠殺し線維化抑制に対する miRNA の効果を確認した。

(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など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

肝線維化に関与する miRNA

線維化が亢進するにつれて発現が亢進している miRNA と発現が低下している miRNA をカタログ化した。その中で発現比が大きく、肝線維化だけではなく、皮膚、肺など他の臓器の線維化について報告のある miRNA を選択したところ、

この基準で線維化の亢進に応じて発現が亢進するmiRNAは2種 (miR-122, miR-199a-3p)、発現が低下するものは3種(miR-29a, miR-150, let-7f) 選択することが出来た。

またこれらのmiRNAの標的遺伝子候補はmiRTarBaseを用いそれぞれ数種選択することが出来た。miRTarBaseに掲載しているmiRNA-標的遺伝子候補は、既にレポータージーンアッセイ、ウエスタンブロット法などで標的であることを確認され、文献として利用できるものが選択されている。今回LX-2を用いた過剰発現による標的遺伝子発現解析実験とArgonaute 2による免疫沈降実験で、miR-29aとmiR-150はprocollagen alpha-1を標的としていることを明らかにした。

肝星細胞活性の検討

LX-2にTGF-betaを投与するとprocollagen alpha-1の発現が亢進し、星細胞の活性化が誘導されることを確認した。LX-2をTGF-betaであらかじめ活性化させた後にmiR-29a、miR-150、let-7fを過剰発現させるとprocollagen alpha-1の発現が抑制された。これらのmiRNAの効果は量依存ではなく、またこれらのmiRNAをカクテルにしてもその効果は著明に現れなかった。またmiR-122、miR-199a-3pを過剰発現するとprocollagen alpha-1の発現は亢進した。細胞増殖活性についてXTTアッセイを行なったところ、これら5種のmiRNAの発現を変化させてもXTTの取り込みには影響がなかった。

慢性肝疾患モデルマウスを使ったmiRNAの抗線維化抑制効果の検討

四塩化炭素を5週間投与したマウスの尾静脈より(1)トランスフェクション試薬のみ、(2)miRNAのnegative control、(3)miR-29a、(4)miR-150を1週間に二回投与し、何も投与していない自然経過群と比較した。肝組織をHE染色とsirius red染色で病理組織的に評価した。miRNAを投与した群では、肝の炎症などはコントロール群と比較して変化はなかったが、線維成分が減少していることが明らかになった。また肝組織中のprocollagen alpha-1の発現も低下していた。

D. 考察

慢性C型肝炎の肝線維化の程度に応じて発現が異なっているmiRNAの機能を*in vitro*と*in vivo*実験で確認した。線維化の程度に応じて発現が低下しているmiRNAを過剰発現すると星細胞に毒性を与えずに活性が低下していることが明らかになり、慢性肝炎モデルでもmiRNAを投与することにより肝細胞毒性なく、肝線維化の改善を促進することが分かった。

E. 結論

正常に比べある疾患の際に発現が低下しているmiRNAを補充することにより、その疾患の改善が期待できることが明らかになった。今後そのメカニズムを明らかにし、miRNAを使った肝線維化治療確立を目指す。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Motoyama H, Kawada N, Komiya T, Le Thuy, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagihara A, Kawamura E, Murakami Y, and Yoshizato K. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. *Lab Invest*. 2013 Dec 2. doi: 10.1038/labinvest.2013.135.
 2. Y-h Taguchi, Murakami Y. Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers. *PLoS ONE* 2013; 8: e66714
 3. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y. Association between Hepatic Steatosis and Hepatic Expression of Genes Involved in Innate Immunity in Patients with Chronic Hepatitis C. *Cytokine* 2013 Aug;63(2):145-50.
 4. Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojigin N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M. The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis *BMC Cancer*. 2013;13:99
 5. Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y. Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases. *Biomarkers*.2013;18:82-7.
 6. 松本佳也、伊丹沙織、村上善基 ウイルス感染と分泌型 microRNA 肝疾患 review 2014
 7. 村上善基、河田則文、棚橋俊仁、田口善弘 エクソソーム中マイクロRNAを利用した慢性肝疾患診断法の開発 *肝胆膵*67巻1号(2013年7月号)
- 学会・研究会発表
1. 村上善基 マイクロ RNA 発現解析による慢性肝疾患診断 第34回日本臨床薬理学会学術総会シンポジウム 平成25年12月5日 東京都
 2. 伊丹沙織、村上善基、黒田雅彦、落谷孝広、恵口豊、河田則文. miR-122 に対する iMIR はC 型肝炎ウイルス複製抑制に効果的である. 第72回日本癌学会学術総会 平成25年10月3日 横浜市
 3. Murakami Y, Itami S, Mizutani T, Kuroda M, Ochiya T, Kato N, Eguchi Y, Suzuki H, Novel RNAi agent can control HCV replication. *Keystone Symposia RNA silencing* 2014 Feb 2, Seattle WA
 4. Itami S, Matsumoto Y, Yoshida K, Motoyama H, Fujii H, Kawada N, Murakami Y. The profiling of miRNA expression in liver fibrosis. 17th International Society for Hepatic Sinusoidal Research 2013 Sep 23 Osaka Japan

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

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 25 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：仲谷和記 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授

分担研究課題：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

研究要旨：肝星細胞はサイトグロビンなどの分子を発現することにより、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。本研究では、肝組織内におけるヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）類を除去して、肝炎の治療および発がんの予防を行う目的で、銅代謝異常により急性肝炎を発症し、次いで肝腫瘍を自然発症するモデル動物である LEC ラットを用いた実験を行った。 $\cdot\text{OH}$ 類の選択的除去分子である水素分子を LEC ラットに投与したところ、急性肝障害の抑制効果は認められなかったものの、予備的実験群において肝腫瘍の発生が抑制された。

A. 研究目的

肝星細胞は、サイトグロビンなどの分子を発現することにより、肝小葉内でのフリーラジカル種の発生を制御している可能性が示唆されている。フリーラジカル種には様々なものが含まれるが、組織における酸化ストレスの主たる原因となっているのはヒドロキシラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）類であり、この $\cdot\text{OH}$ を選択的に除去する物質として水素分子が注目されている。

本研究では、水素分子による肝炎の治療効果と発がん予防効果を明らかにし、星細胞機能に対する作用を含めた、水素分子の治療・予防効果の分子機構を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

銅代謝異常によって肝臓をはじめとする複数の臓器に障害が発生する、ヒトのウイルソン病の疾患モデル動物である Long-Evans cinnamon (LEC)ラットとその正常対照動物である Long-Evans agouti (LEA)ラットを用いて実験を行った。LEC ラット、LEA ラットとも高価であるため、それぞれを交配させて殖やし、実験に用いた。

LEC ラット、LEA ラットをそれぞれ 2 群にわけ、飽和水素水（エコモ・インターナショナル社製アキュエラ・ブルーにて調製）と脱水素水（超音波洗浄機を用いるなどして、飽和水素水より水素分子を取り除いたもの）を自由飲水させた。処置・臓器等採取は麻醉下にて行い、安楽死には炭酸ガスを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、「大阪市立大学動物実験管理規程」及び「大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会」の定める倫理規程に基づき実験計画を策定している。そして、「動物実験計画審査小委員会」の審査を合格した動物実験計画の一部として実施の承認を得ている。本研究の動物実験は、基本的に「大阪市立大学阿倍野地区動物実験委員会」の定める動物実験施設内で行っているが、所属研究室で行わなければならない場合に関しては、同委員会の承認を得た「動物実験室」で行っている。

C. 研究結果

LEC ラットは、肝臓に蓄積した銅から生じるフリーラジカル種(主に・OH類)による肝細胞障害のため、生後4~6ヶ月齢(16~26週齢)で急性肝炎を発症し、雄では2~4割が、雌では約8割が死亡するとされている。そして生存した個体も慢性肝障害のために、生後1年~1年半(52~78週齢)の間で大部分が肝臓癌を発症すると報告されている。実験計画段階では、飽和水素水投与によりLECラットの急性肝炎が予防もしくは軽減され、死亡率が減少すると予想していたが、それに反して、雄雌ともに死亡率の減少が認められなかった。本研究では、急性臓器障害による脱落分が多いことと、繁殖が比較的難しい(新生仔に対する母親ラットの食害、妊娠・授乳中の母親ラットの死亡などによる)ことから十分な個体数を確保できず、

発がん予防効果の検討に関しては予備的実験群で検討を行った。予備的実験群では、71週齢で死亡した脱水素水投与LECラットにおいて肝臓に著大な腫瘍形成が認められたのに対して、71週齢で犠牲死させた飽和水素水投与LECラットでは肝臓における腫瘍形成が著しく抑制されていた。

D. 考察

水素分子を用いた・OH類の選択的除去によって酸化ストレスより細胞・臓器を保護しようという試みは、2007年に日本医大の太田成男らの研究グループが報告(Ohsawa, Ohta, et al. Nature Med, 2007)して以来、様々な病態に対して研究が行われ、現在まで、数多くの学術的報告がなされてきている。本研究では残念ながら、水素分子によるLECラットの急性肝障害抑制作用は認められなかったが、予備的実験群において肝腫瘍形成が水素分子投与によって抑制されたことより、引き続き、水素分子の発がん抑制効果を検討していきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

仲谷和記、池田一雄. 肝星細胞研究の変遷とその成果. 日本医事新報. 第4660号. 66-67, 2013

F. 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 25 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：松原勤 大阪市立大学大学院医学研究科 講師

分担研究課題：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

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 LX-2 細胞の *PPAR* 遺伝子ならびに *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おり、構築に必要なベクターは確立された。また、予備検討でヒト星細胞株 HHSteC 細胞の細胞老化が観察された。今後、脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を用いた脱線維化化合物の選定ならびに肝細胞の癌化における星細胞の細胞老化の影響を HHSteC 細胞のセクレトームの視点から解析する。

研究協力者

松原 三佐子

大阪市立大学大学院医学研究科

脱線維化させ、残存成熟肝細胞を再生させて発がん要因を排除する方法論となる。

本研究は、新規肝硬変・肝がん治療薬の開発に貢献するために、(1) 脱線維化物質を探索し、(2) 肝発がんにおける持続的 HSC 活性化の影響をセクレトームの視点から解析する。

A. 研究目的

肝硬変は、肝実質が活性化した星細胞（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。

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で、脱線維化を促し、肝細胞機能の復元ならびに発がん抑制が達成される。

即ち肝硬変の肝機能改善と発がん予防は密接に関係しており、両者を達成する治療とは肝臓を

B. 研究方法（計画）

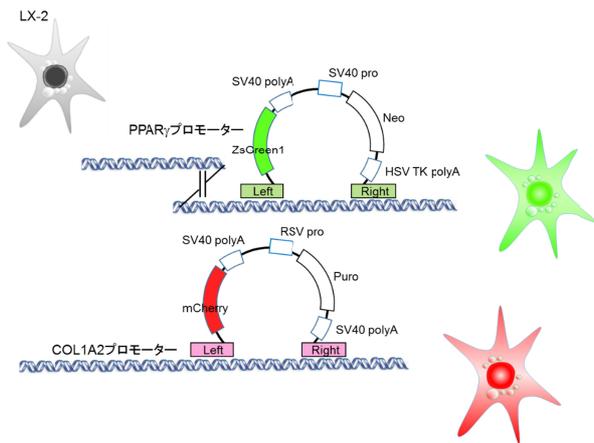
(1) 脱線維化薬の候補化合物を効率よく選定するために、ヒト星細胞株 LX-2 細胞の *PPAR* 遺伝子ならびに *COL1A2* 遺伝子の発現変動を基盤とした脱線維化評価系・ハイスループットスクリーニング系を構築する。本スクリーニング系は、星細胞の活性化(肝線維化)に伴って発現が減弱する *PPAR* 遺伝子と発現が亢進する *COL1A2* 遺伝子に着目し、最近報告された遺伝子組み換え技術 (Cell 2013, 154, 1380-1389)に基づいて星細胞株 (LX-2 ならびに HHSteC) の *PPAR* 遺伝子ならびに *COL1A2* 遺伝子上に蛍光タンパク遺伝子を直接

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利点を持つ。

(2) 持続的HSC活性化はHSCの細胞老化を招く。近年、脂肪肝炎モデルマウスではあるものの、HSCの細胞老化と肝発がんの関連性が示された。そこで、HSCが細胞老化をすると分泌物(セクレトーム)が影響を検討するため、HHStcC細胞の静止期、活性化期、細胞老化期のセクレトームを解析して、セクレトームの違いから肝発がんを惹起する因子の同定に挑戦する。

C. 研究結果

(1) *PPAR γ* 遺伝子に緑蛍光タンパク *Green1* 遺伝子を導入するためのベクター(pGreen1-PPAR γ)ならびに *COL1A2* 遺伝子に赤蛍光タンパク *mCherry* 遺伝子を導入するためのベクター(pmCherry-COL1A2)を構築した(図1)。

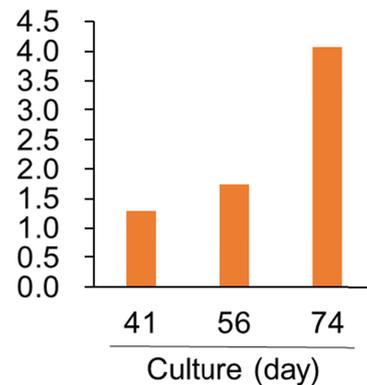


現在、LX-1細胞またはLX-2細胞に構築したベクターを導入して脱線維化評価系を樹立中である。また、この手法は挑戦的であるため、その代替系として従来の手法である *PPAR γ* 遺伝子プロモーター断片の下流に *Green1* 遺伝子をつなげた DNA

を持つレンチウイルスと *COL1A2* 遺伝子プロモーター断片の下流に *mCherry* 遺伝子をつなげた DNA を持つレンチウイルスを作製し LX-2 細胞に導入した脱線維化評価系も同時に樹立している。

(2) 肝細胞の癌化における星細胞の細胞老化の影響を検討するため、現在、LX-2細胞、HHStcC細胞、マウス星細胞を増殖させ、各々の細胞老化状態を構築中である。予備検討ではあるが、HHStcC細胞を連続74日間培養すると増殖能が著しく低下し(図2)、細胞老化状態になると推定された。

Doubling time (day)



現在、再現実験をしており、再現性を確認したのち、テロメア長や酸性ガラクトシダーゼ活性などを測定して細胞老化であることを確証する。今後、培地中のタンパクおよび代謝物を測定し、HHStcC細胞の静止期、活性化期、細胞老化期のセクレトームの違いを探索する。

D. 考察

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できれば、脱線維化化合物を効率よく選定できる。

HHStEC細胞を継続的に培養すると老化することが観察された。今後、モデルとして評価される必要があるが、ヒト肝線維化の分子機序の理解を促進すると推察された。

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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服政策研究事業）

分担研究報告書（平成 25 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

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星細胞の脱活性化のための治療標的の検索を行う。

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、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瘢痕変性を導く。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、活性化した星細胞を静止期の星細胞に“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。

そこで、線維化モデルマウスを用いた基礎的な解析を基に、活性化星細胞の“脱活性化”を誘導するメカニズムの検討を行う。

B．研究方法

本研究では、C57B/6 マウスを用いて、2 種類の肝線維化モデルを作成した。四塩化炭素による肝線維化は、コーンオイルにより 4 倍希釈した四塩化炭素 2 μ l/body weight g を 3 日毎に計 12 回経口投与、Bile duct ligation モデルは、全身麻酔下に開腹し、総胆管を結紮切離して 3 週間飼育した。

線維化刺激を加えた個体から各々採取した活性化星細胞の評価と正常肝から分離した静止期の星細胞との性状比較解析を行った。

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

C57B/6 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。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、肝星細胞を採取した。四塩化炭素投与モデルでは、従来の腹腔内投与では腹膜炎を誘発する為、門脈へのカニューレ挿入時に周囲の腸間膜から出血をきたすことがあったが、今回のモデルでは経口投与としたため、腹膜炎所見がなく開腹時の手術操作性が改善された。また、総胆管結紮モデルにおいても、膵管合流部より十分に距離を取って肝門部側で総胆管を二重結紮、切離とするなどの工夫を加え、門脈血流の障害や膵炎などの合併症を回避した。

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よる星細胞の分離は、星細胞がビタミン A を含有した油滴を持っているため細胞密度が小さいことに

基づいて行われている。ところが、線維化刺激を受けた肝臓内では、TGF- β 1 などの刺激を受けて活性化した星細胞が、ビタミン A を含む油滴を放出するといわれている。そのため、今回、線維化刺激を加えた個体から肝星細胞を分離するにあたっては、ナイコデントの濃度を 8.3%から 10%に上げて分離を行い、さらに星細胞以外の分画（クッパー細胞、類洞内皮細胞）と肝星細胞の分画を各々採取して、純度を RT-PCR により検討した（図 1）。

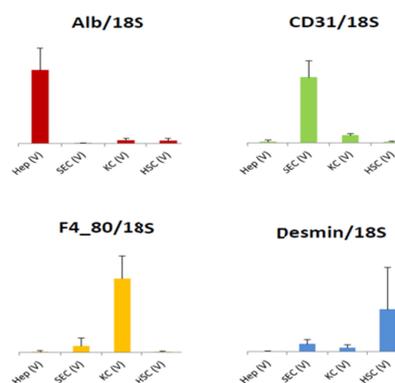


図 1 四塩化炭素投与による線維肝から分離した細胞分画の純度。Hep：肝細胞、SEC：類洞内皮細胞、KC：クッパー細胞、HSC：肝星細胞。Alb(アルブミン)、CD31、F4_80、Desmin は各々肝細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞に特異的に発現することから純度の指標として用いた。この結果から、分画間の純度は保たれており、活性化して油滴を放出した星細胞分画も高い純度で分離され、他の分画へコンタミネーションは、限定的であると考えられた。

D. 考察

肝星細胞は活性化する際、ビタミン A を含有する細胞内の油滴を放出するといわれているが、他の分画と比較してやはり密度は小さく、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よって高い純度で分離できることが確認できた。

これまで、肝硬変治療薬の多くは肝星細胞の活性化を抑制することを研究が進められてきたが、臨床的に有効な薬剤は皆無と言わざるをえないのが現状である。今回の我々の“脱活性化”のコンセプトを検証するためには、in vivo で活性化した肝星細胞を分離して詳細な検討を重ねる必要がある。今回、活性化肝星細胞を高い純度で分離することができたので、今後、これらの細胞に対する薬剤の反応性をはじめとする検討を進める。

E . 結論

活性化した肝星細胞を 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よって高い純度で分離できることが確認できた。

F . 健康危険情報

特に無し。

G . 研究発表

論文発表

1. Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S. Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice. Hepatology Research, 2013 (in press)

Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H,

Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. Hepatology Research,

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25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

研究分担者：Le Thuy 大阪市立大学大学院医学研究科 特任助教

分担研究課題：サイトグロビンの発がんへの寄与の in vivo 解析

研究要旨：サイトグロビン (cytoglobin, Cygb) は当研究室でラット肝星細胞からクローニングした哺乳類第4番目のグロビンである。Cygb^{-/-}マウスに diethylnitrosamine (DEN) を投与したところ、マウス肝組織はサイトカインの上昇、高度の線維化を伴って易発がん性を示すことを報告し、Cygb が肝の炎症・線維化と発がんに深く寄与することを提示した。本研究では、ヒトの非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルとして汎用されるコリン欠乏アミノ酸置換食 (CDAA) マウスモデルを用いて、1) NASH 病態形成への Cygb の関与をモデルで明らかにする、2) Cygb 欠損による炎症反応増幅のメカニズムを明らかにする、3) Cygb の肝内酸化ストレス応答への関与を明らかにする、ことで星細胞に発現する Cygb の肝臓における線維化や炎症反応への関与について in vivo で明らかにする。

A. 研究目的

我々の研究グループではラット肝星細胞に発現する蛋白質を 2D-PAGE とマスマスペクトロメトリーを用いて網羅的に解析した結果 (Hepatology 2000;32:268)、21 kDa の新しい蛋白質を同定し、その遺伝子を *stap* (stellate cell activation associated protein) と報告した (J Biol Chem 2001;276:25318, Accession number NM_130744)。本蛋白質のアミノ酸配列はミオグロビン (myoglobin, Mb) と約 30% の相同性があり、細胞質内に存在することから現在ではサイトグロビン (cytoglobin, Cygb) と呼ばれている。リコンビナント Cygb を作製して結晶化し、その3次元立体構造を決定したところ8つのヘリックス構造からなり、1分子のヘムを含有することが判り、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)。Cygb は静止期の星細胞にも発現し、星細胞の活性化とともに誘

導を受けること、また、チオアセトアミドによる肝線維化モデルでは肝組織における Cygb 発現が増加することを観察した (J Biol Chem 2001;276:25318)。一方、ラット全身の免疫染色により Cygb は肝星細胞に高発現するのみでなく、膵臓、消化管や腎臓など内蔵諸臓器に存在する pericyte (ビタミン A 貯蔵細胞) にも発現することを見出してきた (Lab Invest 2004;84:91)。

Cygb は Mb に非常に類似した解離定数を保ちながら酸素、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などのガス分子と結合して生体内ガスのリザーバーとなること (Biochemistry 2003;42:5133) や、Cygb がペルオキシダーゼ活性で過酸化水素 (H₂O₂) を分解 (J Biol Chem 2001;276:25318) して細胞内酸化ストレス代謝を調節すること、その NO ジオキシゲナーゼ活性により NO が亜硝酸塩への代謝に関わることが報告された (J Biol Chem 2010;285:23850)。しかしながら、Cygb がどのように肝病態へ関わるのかについては不

明な点が多い。

このようなこれまでの研究を背景として、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*^{-/-}) を作製した。*Cygb*^{-/-}マウス自体は正常に生まれたが、ジエチルニトロサミン (diethylnitrosamine, DEN) を投与すると、*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最近観察した (Am J Pathol 2011;179:1050)。即ち、*Cygb* の欠損は、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。

上記の肝がん誘発物質 DEN を用いた *Cygb*^{-/-}マウスで得られた炎症・酸化ストレス・線維化反応、さらには易発がん性に関する知見をよりヒトの肝病態に近いモデルを用いながら詳細に検討するために、本研究では、1) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態形成、特に、炎症・酸化ストレス・線維化反応、への *Cygb* の関与をマウスモデルで明らかにする、2) 星細胞における *Cygb* 発現の意義を肝細胞との相互作用の観点から検証する、ことを目的とする。

B. 研究方法

平成 25 年度は野生型ならびに *Cygb*^{-/-}マウスにヒトの病態に似たマウス NASH モデルを作製し、*Cygb* 欠損による肝臓の組織変化ならびに分子変動を詳細に検討した。

(1)マウス NASH モデル: マウス NASH モデルとしてコリン欠乏アミノ酸置換食 (choline-deficient L-amino acid-defined diet, CDAA) を用いた。コントロールとしては

コリンを含有する choline-sufficient L-amino acid-defined diet (CSAA) 投与群を作製した。各種の染色にて炎症反応や線維化反応などのマウス肝組織の変化、浸潤炎症細胞の同定を行うと同時に、肝における分子変動を種々のアレイ (cDNA array、microRNA アレイ、サイトカインアレイ) などで解析した。

(a)組織学的検討: 予備的な実験で当方の研究室でマウスに NASH が誘導できるか、また、*Cygb*^{-/-}マウスが CDAA 投与に致死的でないかを 8 週間投与で検討した。HE 染色で野生型と *Cygb*^{-/-}マウス伴に脂肪肝を生じることが確認できた。この段階で炎症細胞浸潤は *Cygb*^{-/-}マウスで増強していること、シリウスレッド染色でコラーゲンの沈着が亢進していることを既に見出している。この結果を受けて、浸潤細胞が、好中球、マクロファージ、リンパ球の何れであるのか、またそのサブセットについて各種免疫染色ならびに、肝臓から分離した細胞の FACS 分析により詳細に検討する。

(b)炎症に関わる分子群の変動: 上記の予備的検討により *Cygb*^{-/-}マウスでは CDAA 投与により炎症や線維化反応が増強した NASH が形成されると推測されたためこのメカニズムを詳細に検討するために、以下の項目を調べた。

炎症性サイトカインの発現プロファイル: 炎症反応に主要な役割を果たすサイトカインとして interleukin (IL)-1,6,8,18、tumor necrosis factor (TNF) やケモカイン (Ccl-2,3,4,5,Cxcl-1,2) の発現を野生型ならびに *Cygb*^{-/-}マウスで調べた。

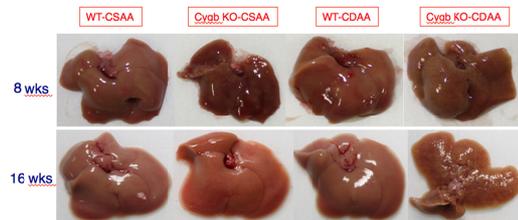
線維化関連遺伝子:NASH では線維化が惹起されることが特徴である。そのため、以下の分子変動について RT-PCR や immunoblot で検討を加えた。Collagen 1a1, collagen III, fibronectin, transforming growth factor β , connective tissue growth factor, tissue inhibitor of matrix proteinase 1, 2, matrix metalloproteinase 2, 9, 13 など。星細胞活性化との関連で α -smooth muscle actin や desmin 発現も観察する。

酸化ストレス関連遺伝子: Cygb は Mb などの他のグロビンと同様、ガスキャリアーとして機能すると同時に活性酸素ラジカル種のスカベンジャーにもなり得る。このため、Cygb 欠損により各種抗酸化・活性酸素代謝酵素群が変動する可能性がある。PCR アレイを用いて網羅的に解析を行い、どの分子変動が顕著になるかを見極め、NASH 病態における Cygb 関与の解明に繋げる。同時に、NO や CO の代謝にも変動が生じる可能性があるため、nitric oxide synthetases (NOSs) や hemeoxygenases (HO-1, 2) の発現も解析した。

C. 研究結果

(1) CDAA モデルにおける Cygb の関与
野生型ならびに Cygb^{-/-} 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^{-/-} 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、次の図に示すように、Cygb^{-/-} 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^{-/-} 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。

Cygb^{-/-} マウス肝では CDAA 投与後、IL-1, IL-6, ケモカイン 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 発現も上昇していた。さらに興味深い事に Cygb^{-/-} マウス肝では DHE 染色が陽性で活性酸素 (O_2^-) 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^{-/-} 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。これらの結果から、抗酸化剤である N-アセチルチス테인 (NAC) が CDAA 投与による腫瘍の形成を阻止できるかどうか、などの検討を行っている。

(2) 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^{-/-} 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^{-/-} 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*^{-/-}マウス由来の星細胞では、IL-1 やケモカインの mRNA 発現が有意に増強していた。以上のことから、*Cygb*^{-/-}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。

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。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てきた。*Cygb* 欠損は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をうる。

F. 研究発表

論文発表

1. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. Motoyama H, Komiyama 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.

Meeting 2013, November 2-5, Washington DC, USA

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。

学会発表

1. Thuy Le, Suoh M, Matsumoto Y, Hirano Y, Motoyama H, Hai H, Tuong T, Urajara Y, Yoshizato K, Kawada N. Progression from NASH to liver cancer in the absent of cytoglobin. International Society for Hepatic Sinusoidal Research, 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid. 2013, September 23-25, Osaka, Japan
2. Accelerated liver cancer development in Cytoglobin-deficient mice treated with chemicals/diet via the priming of stellate cells and activation of local fibrosis, inflammation, and oxidative stress. Le TT, Matsumoto Y, Hai H, Yoshizato K, Kawada N. AASLD-The Liver

研究成果の刊行に関する一覧表

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	サイトグロビン研究の現状と展望	日本臨床	71	927-935	2013
河田則文	肝線維化と星細胞	Surgery Frontier	20	72-75	2013
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	サイトグロビン研究の現状	細胞	45	598-600	2013
元山宏行、Le Thi Thanh Thuy、河田則文	肝臓とサイトグロビン	細胞	45	609-612	2013
吉里勝利、河田則文	哺乳類第4番目のグロビン、サイトグロビンの発見	細胞	45	601-604	2013
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)		31-38	2014
Motoyama H, Komiyama T, Thuy le TT, Tamori A, Eaton M, Morikawa H, Iwai S, Uchida-Kobayashi S, Fujii H, Hagiwara A, Kawamura E, Murakami Y, Yoshizato K, Kawada N.	Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver.	Lab Invest	94	192-207	2014
Nagamoto Y., Takayama K., Tashiro K., Tateno C., Sakurai F., Tachibana M., Kawabata K., Ikeda K., Tanaka Y., Mizuguchi H.	Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-2L mutant gene.	Cell Transplantation			2014
Saito S, Hata K, Iwaisako K, Yanagida A, Takeiri M, Tanaka H, Kageyama S, Hirao H, Ikeda K, Asagiri M, Uemoto S.	Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis.	Hepatol Res.			2014

Y-h Taguchi, Murakami Y.	Principal Component Analysis Based Feature Extraction Approach to Identify Circulating microRNA Biomarkers.	PLoS ONE		doi: 10.1371	2013
Murakami Y, Tamori A, Itami S, Tanahashi T, Toyoda H, Tanaka M, Wu W, Brojini N, Kaneoka Y, Maeda A, Kumada T, Kawada N, Kubo S and Kuroda M.	The expression level of miR-18b in hepatocellular carcinoma is associated with the grade of malignancy and prognosis BMC Cancer.	BMC Cancer		13:99	2013
Toyoda H, Kumada T, Kiriyama T, Tanigawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada Y, and Murakami Y.	Higher Hepatic Gene Expression and Serum Levels of Matrix Metalloproteinase-2 are Associated with Steatohepatitis in Non-alcoholic Fatty Liver Diseases.	Biomarkers	18	82-87	2013
松本佳也、伊丹沙織、村上善基	ウイルス感染と分泌型microRNA	肝疾患 review 2014			2014
村上善基、河田則文、棚橋俊仁、田口善弘	エクソソーム中マイクロRNAを利用した慢性肝疾患診断法の開発	肝胆膵	67巻1号		2013
仲谷和記、池田一雄	肝星細胞研究の変遷とその成果	日本医事新報	4660号.	66-67	2013
Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S.	Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice.	Hepatology Research			2013
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

