

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：82685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09037

研究課題名(和文) Wntシグナルを標的とした新たな抗線維化治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new anti-fibrotic therapeutic drug for targeting Wnt signal

研究代表者

木村 公則 (Kimura, Kiminori)

東京都立駒込病院(臨床研究室)・肝臓内科・部長

研究者番号：70397339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝硬変は組織に過剰な線維が蓄積することにより生じる病態であり、線維化が生じると様々な生命維持に必須の機能が低下し機能不全状態に至る。肝臓の場合、肝不全となり肝臓機能の重要な働きであるタンパク質の合成や有害物質の解毒作用が低下する。現在線維化により肝不全を生じた肝臓を改善させる治療薬は実用化されていない。このような状況をふまえ、肝線維化を改善させる治療薬の開発が急務となっている。今回我々はWntシグナルに着目しWnt阻害剤であるPRI-724を用いて、マウス肝線維化モデルにPRI-724を投与することにより抗線維化治療効果を有することを実証した。

研究成果の概要(英文)：Liver cirrhosis is a condition caused by accumulation of excessive fibers in tissues, and when fibrosis occurs, various essential functions for life maintenance are deteriorated, leading to a dysfunction state. In the case of the liver, hepatic failure occurs and synthesis of proteins, which is an important function of liver function, and detoxification of harmful substances are reduced. A therapeutic drug that improves the liver function that has liver failure due to fibrosis at present is not put to practical use. Based on this situation, it is urgent to develop therapeutic drugs to improve liver fibrosis. In this study, we focused on Wnt signal and administered PRI-724 in mouse hepatic fibrosis model using Wnt inhibitor PRI-724. We showed that PRI-724 has anti-fibrotic treatment effect.

研究分野：肝臓病学

キーワード：線維化 肝硬変 Wnt阻害剤 PRI-724

## 1. 研究開始当初の背景

厚生省の肝炎等克服緊急対策研究事業は、肝炎ウイルスの病態および感染機構の解明ならびに肝炎、肝硬変、肝細胞癌の予防、治療法の開発を目的としておりウイルス肝炎に対する研究を推進している。肝硬変の原因として HCV 感染が大多数を占め、この肝硬変を由来とする肝細胞癌は国内癌死因の第 4 位に位置しており今後も増加する傾向がある。現在、C 型慢性肝炎には peg-IFN + 核酸合成阻害剤や新規抗ウイルス薬の開発もあり、近い将来 HCV を排除する事が可能になると思われる。しかし、日本で約 20 万人以上存在する HCV 肝硬変の患者に対する抗線維化薬は現在存在せず、新たな治療薬開発は緊急の課題である。このように国内国外を問わず、現在 HCV 肝硬変に対する治療法の開発は、肝細胞癌の発症も予防出来、HCV 患者を救済するだけでなく、医療経済的にも貢献する事が期待され重要と考える。

## 2. 研究の目的

HCV 感染者は現在世界で約 1 億 7 千万人、国内では約 200 万人いると推定される。また肝硬変患者は国内で約 30 万人に上るといわれ、約 70% が HCV に起因している。この感染症の問題点は高率に持続感染化し、持続的炎症が線維化を誘導し肝硬変から肝細胞癌を発症させる。慢性肝炎の治療薬としての抗ウイルス薬の開発はかなり進んでいるが、未だ肝硬変に対する抗線維化薬は実用化されていない。従って、抗ウイルス治療が実施出来ないあるいは治療効果を認めなかった肝硬変患者への対策が肝細胞癌発症予防の鍵となっている。HCV はヒトとチンパンジーにしか感染せず、持続感染のメカニズム等解析するためにマウスなどの小動物感染モデルの樹立が望まれていた。我々は、Cre/loxP のスイッチングシステムを用いて、ある一定の時期より肝臓内に HCV 蛋白を持続発現できる (約 2 年) マウスモデルを樹立した。このマウスでは、HCV core の発現が poly-I.C. を 3 回投与後 4 日後に肝臓内でピークになり、それに伴って血清 ALT 値の上昇が認められる。これは、ヒトの急性肝炎と同様の経過であり、C 型肝炎の肝細胞での発現から如何に宿主が抗原特異的な反応を誘導するか解明出来ることを示唆している。さらに、このマウスは HCV 発現 90 日後では慢性肝炎様の肝臓組織所見 (肝細胞索の異常構造、肝細胞の脂肪化、門脈域のリンパ球浸潤) を認め 360 日後では肝細胞癌を生じた。このように、我々が作製した HCV Tg マウスは、ヒトの HCV 感染と同様な経過をとることが確認された (PLoS One; 2013)。

最近、Wnt シグナル伝達を阻害し、 $\beta$ -カテニンと CREB-binding protein の蛋白相互作用を選択的に阻害できる化合物 PRI-724 が発見された。この化合物は、この阻害により癌細胞の増殖を強力に抑制する効果を示した

が、同時に分化の方向にスイッチを切り替える効果も確認された。最近、TGF- $\beta$  を介した線維化に Wnt シグナルが関与していることが報告されており、抗線維化治療の標的として Wnt シグナルが注目されている。申請者らは本研究にて PRI-724 が抗線維化作用を有するか HCV Tg マウスを用いて検討した。17 ヶ月齢の HCV-Tg マウスに PRI-724 (1mg/kg) を 42 日間持続静脈投与し肝臓組織を観察したところ、PRI-724 投与群ではコントロール群と比較して肝線維化像の著しい改善が認められた。HCV-Tg マウスの長期にわたる持続的肝障害を経て形成された肝線維化はヒト HCV 肝硬変の病態に類似していると考えられこの治療効果は特筆すべきである。また同様の効果は肺線維症マウスモデルでも確認されており (PNAS; 2010)、抗線維化薬としての PRI-724 の可能性が示唆された。

本研究の目的は、Wnt シグナル阻害剤 PRI-724 が抗線維化作用を有するという新しい知見をもと肝線維化のメカニズムを実験的肝線維化マウスモデルで解明することである。

## 3. 研究の方法

### 1) HCV 肝線維化モデルにおける Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの発現解析

肝線維症の病態は線維芽細胞の活性化と筋線維芽細胞への分化が、細胞外マトリックスの異常増加を引き起こし、細胞外マトリックスが蓄積することにより生理的な構造を破壊し、肝臓機能の低下をもたらす。C 型肝炎の場合、線維芽細胞の活性化の誘導因子として、HCV 感染による肝細胞障害に伴う様々なサイトカインがあげられる。その一つに TGF- $\beta$  があり、静止期の線維芽細胞に対して、活性化した線維芽細胞の遺伝子発現を引き起こす (Brenner, Gastroenterology 2012) また恒常的に TGF- $\beta$  1 型レセプターを活性化させたマウスにおいて、線維芽細胞が活性化し、全身性の線維化が引き起こされる。線維芽細胞に対する TGF- $\beta$  シグナルの刺激には、Smad タンパクが関与しているが、Smad を阻害しても、線維芽細胞の活性化を完全には抑えることができず、別の経路の関与が考えられていた。Wnt シグナルは生体内において幹細胞の増殖と分化を調節することで再生臓器 (腸管、皮膚、血液など) の恒常性を維持する役割を果たしている。Wnt タンパクは、分泌結合蛋白で、Frizzled 受容体や、LRP5/6 受容体を介して、細胞膜を超えてシグナルを伝達する。この canonical pathway の他にも、non-canonical pathway である Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリンを介した経路もある。canonical な Wnt の異常活性が、癌を含めた様々な病気を引き起こすことが知られているが、線維化にも重要な働きをしていることがわかってきた。TGF- $\beta$  は、p-38 に依存し、canonical Wnt pathway を刺激し、Wnt の拮抗蛋白である DKK1

の発現量を減らす。線維化を起こす組織から、Wntの過剰発現と、Wnt inhibitor Dickkopf-1 Dkk1 の発現の抑制が認められた(Nat Commun 2012)。これらの報告をふまえて、本研究計画ではまず HCV 肝線維化モデルにおいて Wnt シグナルが関与しているか検討する。HCV Tg マウスに Poly IC を投与し HCV 発現後 3, 6, 12, 18, 24 ヶ月の血清、肝臓を採取し、以下の項目を検討する。

- a) Wnt/  $\beta$ -catenin シグナルの発現解析：肝臓組織より RNA を抽出し Wnt1-11 までの発現を real-time RT-PCR にて行う。また同組織より蛋白質を抽出し、western blotting にて  $\beta$ -catenin, CBP の発現を確認する。 $\beta$ -catenin は免疫組織でも解析を行う。
- b) サイトカイン、線維化マーカー：血清 (TGF- $\beta$  は血漿) を用いて、ALT, サイトカイン、ケモカイン、線維化マーカーの測定を行う。サイトカインでは特に、TGF- $\beta$  に注目し活性型 TGF- $\beta$  の測定を実施。また肝臓組織の蛋白質を用いて Hydroxyproline の測定も同研究室で実施する。
- c) 肝臓内リンパ球、星細胞の免疫学的解析：肝臓よりリンパ球を採取しマクロファージ、単球の解析に焦点をあて、CD11b, F4/80, Ly-6c, CD11c, CD206 等の抗体を用いて M1, M2 マクロファージの shift および inflammatory monocyte の数量を検討する。また TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, iNOS, arginase-1 の発現を確認する。これらは肝臓組織の免疫組織像でも確認する。星細胞に関しては、SMA, desmin の免疫染色をおこなう。

#### 4. 研究成果

17 ヶ月齢の HCV-Tg マウスに PRI-724 (1mg/kg) を 42 日間持続静脈投与し肝臓組織を観察したところ、PRI-724 投与群ではコントロール群と比較して肝線維化像の著しい改善が認められた。HCV-Tg マウスの長期にわたる持続的肝障害を経て形成された肝線維化はヒト HCV 肝硬変の病態に類似していると考えられこの治療効果は特筆すべきである (Sci Rep 2017)。肝臓内でのマクロファージや単球の増加が認められ、これらの炎症細胞が線維溶解酵素である MMP-8, 9 を産生し抗線維化作用を有すると考えられた。これらの結果は、治療薬のない肝硬変治療薬として PRI-724 が有用である可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Osawa Y, Kojika E, Hayashi Y, Kimura M, Nishikawa K, Yoshio S, Doi H, Kanto T,

Kimura K. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated hepatocyte apoptosis stimulates fibrosis in the steatotic liver in mice. *Hepatology Commun*. 2018 Feb 13;2(4):407-420.  
doi: 10.1002/hep4.1158

2. Tokunaga Y, Osawa Y, Ohtsuki T, Hayashi Y, Yamaji K, Yamane D, Hara M, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Hishima T, Kojima S, Kimura K, Kohara M. Selective inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. *Sci Rep*. 2017 Mar 23;7(1):325.  
doi: 10.1038/s41598-017-00282-w.
3. Osawa Y, Oboki K, Imamura J, Kojika E, Hayashi Y, Hishima T, Saibara T, Shibasaki F, Kohara M, Kimura K. Inhibition of cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/ $\beta$ -catenin reduces liver fibrosis in mice. *EBioMedicine*. 2015 Oct 8;2(11):1751-8  
doi: 10.1016/j.ebiom.2015.10.010.

[学会発表](計2件)

1. ワークショップ2「臨床応用を見据えた肝再生医学・線維化研究の新展開」マウス肝線維化における Wnt/  $\beta$ -catenin シグナルの関与. 口頭発表 大澤陽介 今村潤 木村公則 第102回日本消化器病学会総会、東京、2016年4月 国内
2. ワークショップ4「肝線維化の分子機構」マウス肝線維化における Wnt/  $\beta$ -catenin シグナルの関与. 口頭発表 大澤陽介 今村潤 木村公則: 第52回日本肝臓学会総会、東京、2016年5月 国内

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村公則 ( KIMURA, Kiminori )  
東京都立駒込病院・肝臓内科・部長  
研究者番号：70397339

### (2) 研究分担者

大澤陽介 ( OSAWA, Yosuke )  
国立国際医療研究センター国府台病院・室長  
研究者番号：60447787

### (3) 連携研究者

小原道法 ( KOHARA, Michinori )  
東京都医学総合研究所・シニア研究員  
研究者番号：10250218