

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05282

研究課題名(和文) 肝硬変の組織病態を修復する新規細胞薬物治療法の探索

研究課題名(英文) Search for new cell- or small molecule-based therapies to promote regression of liver cirrhosis

研究代表者

坂本 直哉 (Sakamoto, Naoya)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10334418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝線維化の組織修復を促進する候補分子の探索とその作用機構を解析することを目的として遂行した。(1)ヒト羊膜由来間葉系幹細胞(AM-MSC)培養上清由来エクソソームの肝線維化抑制、炎症抑制を確認した。(2)palmitoylethanolamide (PEA)の、PPAR非依存的な星細胞活性化抑制作用を示した。(3)血清蛋白の網羅的糖鎖修飾構造解析により、血清蛋白のフコシル化修飾がNAFLからNASH、肝線維化の進展と密接に関連することを見いだした。(4)培養肝星細胞活性化に関連するmicro RNAの包括的解析を施行し、活性化星細胞で発現上昇・低下するmiRNAを抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、肝星細胞を標的とした細胞・薬物療法による肝線維化の組織修復を促進する治療法開発の基盤となる。肝疾患と糖鎖発現変動に関する研究は多数報告があるが、主要な全てのクラスの糖鎖の包括的な解析例はない。包括的糖鎖修飾解析の結果同定された特異修飾糖鎖は、非侵襲的診断マーカーとしてのみならず、糖鎖構造に対する抗体、結合小分子を大規模探索し、糖鎖修飾構造を標的とした分子標的治療が構築される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to search for therapeutic candidates (peptides, small molecules and miRNAs) to target liver fibrosis and activation of hepatic stellate cells and to analyze their mechanisms of action. The main results are as follows; (1) We confirmed suppressive effects of liver fibrosis and inflammation of exosomes derived from the culture supernatant of human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. (2) palmitoylethanolamide (PEA) inhibited activation of hepatic stellate cells through PPAR-independent mechanisms. (3) Comprehensive glycan modification structure analysis identified fucosyl modification of serum proteins as markers that associate with NAFL to NASH progression. (4) Comprehensive analysis of microRNAs related to cultured hepatic stellate cell activation identified miRNAs that up- or down-regulated in activated stellate cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変症は、肝細胞の慢性壊死炎症反応と線維化により肝機能低下と門脈圧亢進症を来す慢性肝疾患の終末像である。肝硬変の原因はB・C型ウイルス性肝炎を最多として、アルコール、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)など多岐にわたり、国内に約50万人、世界では約2,000万人の患者がいる。肝硬変は従来不可逆性の病態と考えられ、専ら原因疾患の治療と対症療法、栄養療法等が行われてきた。B、C型ウイルス性慢性肝炎は近年の経口抗ウイルス薬の開発により、大多数の患者でウイルス増殖の抑制あるいは駆除が可能となったが、肝線維化進展例、NASH合併例などでは治療後も組織学的修復は限定的で、高い頻度で肝発癌がおこる。以上より肝硬変の組織病態の修復機構の解析、および修復を促進する新規治療法の開発が望まれる。

申請者らはこれまで、HCV感染の組織学的進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析を行い、IFN不応、肝線維化、脂肪化進展に関連するIL28B転写調節領域のSNPを同定した(Nat Genet 2009)。さらにRIG-I依存性自然免疫/促進系ISGの高発現状態とIL28B SNPが密接に関与し、肝組織病態などの自然経過に関連することを明らかにしてきた(Asahina, Sakamoto et al. Hepatology 2012)。さらに申請者はNASH、肝発癌に関わる血清マーカーの探索を進めており、NASHの組織病態に相関する血清糖鎖マーカーを同定している(PMDA事前面談中)。

2. 研究の目的

本研究で申請者らは、従来の肝庇護、原疾患治療を主体とした肝硬変治療から視点を新たにし、肝硬変の組織病態の修復機構を解析し、肝星細胞を標的とした細胞・薬物療法による肝線維化の組織修復を促進する治療法の効果、作用機構等を解析する。さらにNASHに伴う組織病態の解析のため、高精度プロテオミクス解析により肝線維化、脂肪化、肝発癌カスケードに関連する宿主蛋白の探索を行い、新たな標的分子の探索を行う。

ヒト羊膜由来間葉系幹細胞(AM-MSC)を用いた肝線維化回復効果と分子機構の解析：肝硬変動物におけるMSCの体内分布、動態を確認するとともに、MSCのKupffer細胞、肝星細胞活性化抑制効果の本体となる分泌蛋白、小分子の探索を進める。申請者はすでにMSC培養上清中の特定の低分子脂肪酸に抗炎症、組織修復促進作用があることを特定し解析を進めている。本研究により細胞から新規薬物治療に発展させるための候補分子を得る。

3. 研究の方法

- (1) 抗炎症活性の高い羊膜由来間葉系幹細胞(MSC)の調整条件の設定
- (2) Vitamin A-Liposome-siRNA-HSP47による肝線維化抑制機構の解析
- (3) L-carnitineのHCV感染により惹起される肝脂肪化抑制効果に関与する脂質代謝関連分子の同定と解析
- (4) MSCの肝線維化抑制効果を担う蛋白、小分子の探索

4. 研究成果

(1) ヒト羊膜由来間葉系幹細胞(AM-MSC)を用いた肝線維化回復効果と分子機構の解析

羊膜由来間葉系幹細胞(MSC)の調整プロトコルの最適化および肝硬変小動物、大動物に対する羊膜由来MSCの薬効評価と分子機構の解析を中心に実施した。MSCは北海道大学病院細胞プロセッシング・センターにおいてGMP準拠した細胞製剤を作成した。また、細胞から分泌される液性因子に着目し、培養上清の回収ならびにエクソソームを分離・精製することに成功した。in vitroの検討では、炎症性サイトカイン刺激あるいは長期培養によるラット肝星細胞の活性化が、MSCの培養上清ならびにエクソソーム存在下での培養によりは抑制された。肝硬変モデルは四塩化炭素投与により作成予定であったが、本学の使用ルール厳格化の為、高脂肪食によるラット非アルコール性脂肪性肝炎モデルに変更した。

確立した羊膜MSC由来エクソソームの分離・精製法をもとに、四塩化炭素誘発肝線維症モデルに対して羊膜MSC由来エクソソームの静脈内投与を行い、線維化抑制、kupffer細胞の浸潤ならびに炎症性サイトカインの発現抑制が確認され、in vitroの系でも羊膜MSC由来エクソソームの炎症反応抑制効果が確認された。

(2) 肝星細胞活性化により再構築される宿主因子と肝線維化、肝脂肪化機構の解析

羊膜由来間葉系幹細胞から分泌される液性因子の成分分析により、培養液中のエクソソーム

および低分子生理活性脂質に抗炎症効果、星細胞活性化抑制効果があることを見いだした。低分子生理活性物質としては、脂肪酸アミドである palmitoylethanolamide (PEA)が、PPAR 非依存的な炎症抑制効果ならびに星細胞活性化抑制作用を有することを示した。さらに、非アルコール性脂肪性肝炎ラットモデルおよび四塩化炭素誘発肝線維症モデルに対する PEA の炎症抑制効果・線維化抑制効果を確認した。以上より、羊膜 MSC から分泌される液性因子として、エクソソームおよび PEA の抗炎症効果、星細胞活性化抑制効果が明らかとなった。

血清蛋白の網羅的糖鎖修飾構造解析により、血清蛋白のフコシル化修飾が NAFL から NASH への進展と密接に関連することを見いだした(特願 P2015-122)。さらに、従来区別困難であった糖鎖末端に付加されるシアル酸の構造異性体の特異的かつ短時間に検出する方法(aminolysis-SALSA法)を開発し、特定のシアル酸を持つ糖タンパクが NASH の進展に伴い上昇することを見いだした。

培養肝星細胞活性化に関連する micro RNA の包括的解析を施行し、特定の miRNA が活性化星細胞で高発現し、knock down により星細胞 alpha-SMA、type-I collagen 発現が抑制されることを示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 29 件)

1. Suda G, Hasebe C, Abe M, Kurosaki M, Itakura J, Izumi N, Uchida Y, Mochida S, Haga H, Ueno Y, Abe K, Takahashi A, Ohira H, Tsukuda Y, Furuya K, Baba M, Yamamoto Y, Kobayashi T, Inoue J, Terasita K, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Safety and efficacy of glecaprevir and pibrentasvir in Japanese hemodialysis patients with genotype 2 hepatitis C virus infection. J Gastroenterol 2019;Epub ahead of print. (査読有)
2. Suda G, Sakamoto N et al.: Safety and efficacy of elbasvir and grazoprevir in Japanese hemodialysis patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. J Gastroenterol 2019; 54:78-86. (査読有)
3. Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Yuyama K, Nakamura H, Fu Q, Maehara O, Suda G, Sakamoto N: Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats. Stem Cells Int 2018; 2018:3212643. (査読有)
4. Kawagishi N, Suda G, Sakamoto N et al.: Liver steatosis and dyslipidemia after HCV eradication by direct acting antiviral agents are synergistic risks of atherosclerosis. PLoS One 2018; 13:e0209615. (査読有)
5. Fu Q, Ohnishi S, Sakamoto N: Conditioned Medium from Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Regulates Activation of Primary Hepatic Stellate Cells. Stem Cells Int 2018; 2018:4898152. (査読有)
6. Hanamatsu H, Nishikaze T, Miura N, Piao J, Okada K, Sekiya S, Iwamoto S, Sakamoto N, Tanaka K, Furukawa JI: Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones. Anal Chem 2018; 90:13193-13199. (査読有)
7. Ohara M, Ogawa K, Suda G, Kimura M, Maehara O, Shimazaki T, Suzuki K, Nakamura A, Umemura M, Izumi T, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ohnishi S, Sakamoto N: L-Carnitine Suppresses Loss of Skeletal Muscle Mass in Patients With Liver Cirrhosis. Hepatol Commun 2018; 2:906-918. (査読有)
8. Sugiura R, Ohnishi S, Ohara M, Ishikawa M, Miyamoto S, Onishi R, Yamamoto K, Kawakubo K, Kuwatani M, Sakamoto N: Effects of human amnion-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in rats with sclerosing cholangitis. Am J Transl Res 2018; 10:2102-2114. (査読有)
9. Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Fu Q, Maehara O, Suda G, Sakamoto N: Palmitoylethanolamide Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in

- Rats. *Front Pharmacol* 2018; 9:709. (査読有)
10. Otagiri S, Ohnishi S, Sakamoto N et al.: Evaluation of amnion-derived mesenchymal stem cells for treatment-resistant moderate Crohn's disease: study protocol for a phase I/II, dual-centre, open-label, uncontrolled, dose-response trial. *BMJ Open Gastroenterol* 2018; 5:e000206. (査読有)
 11. Cai C, Koch B, Morikawa K, Suda G, Sakamoto N, Rueschenbaum S, Akhras S, Dietz J, Hildt E, Zeuzem S, Welsch C, Lange CM: Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Induce Long-Lasting Immunity Against Hepatitis C Virus Which Is Blunted by Polyunsaturated Fatty Acids. *Front Immunol* 2018; 9:723. (査読有)
 12. Tsuda M, Ohnishi S, Mizushima T, Hosono H, Yamahara K, Ishikawa M, Abiko S, Katsurada T, Shimizu Y, Sakamoto N: Preventive effect of mesenchymal stem cell culture supernatant on luminal stricture after endoscopic submucosal dissection in the rectum of pigs. *Endoscopy* 2018; 50:1001-1016. (査読有)
 13. Sato C, Yamamoto Y, Funayama E, Furukawa H, Oyama A, Murao N, Hosono H, Kawakubo K, Sakamoto N, Ohnishi S: Conditioned Medium Obtained from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Activation of Keloid Fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2018; 141:390-398. (査読有)
 14. Sho T, Suda G, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Kumagai K, Uebayashi M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Onodera M, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Kawagishi N, Ohara M, Ono Y, Nakai M, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Safety and efficacy of sofosbuvir and ribavirin for genotype 2 hepatitis C Japanese patients with renal dysfunction. *Hepatol Res* 2018; 48:529-538. (査読有)
 15. Nakai M, Ogawa K, Takeda R, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Umemura M, Ito J, Sho T, Suda G, Morikawa K, Sakamoto N: Increased serum C-reactive protein and decreased urinary aquaporin 2 levels are predictive of the efficacy of tolvaptan in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2018; 48:E311-E319. (査読有)
 16. Kawakubo K, Ohnishi S, Kuwatani M, Sakamoto N: Mesenchymal stem cell therapy for acute and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 2018; 53:1-5. (査読有)
 17. Suda G, Furusyo N, Toyoda H, Kawakami Y, Ikeda H, Suzuki M, Arataki K, Mori N, Tsuji K, Katamura Y, Takaguchi K, Ishikawa T, Tsuji K, Shimada N, Hiraoka A, Yamsaki S, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Kudo M, Nagasaka A, Furuya K, Yamamoto Y, Kato K, Ueno Y, Iio E, Sakamoto N et al.: Daclatasvir and asunaprevir in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection: a nationwide retrospective study in Japan. *J Gastroenterol* 2018; 53:119-128. (査読有)
 18. Hontani K, Tsuchikawa T, Hiwasa T, Nakamura T, Ueno T, Kushibiki T, Takahashi M, Inoko K, Takano H, Takeuchi S, Dosaka-Akita H, Kuwatani M, Sakamoto N, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Shimada H, Shichinohe T, Hirano S: Identification of novel serum autoantibodies against EID3 in non-functional pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 2017; 8:106206-106221. (査読有)
 19. Maehara O, Suda G, Ohnishi S, Sakamoto N et al.: Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2017; 38:1073-1083. (査読有)
 20. Sakurai F, Kunito T, Takayama K, Hashimoto R, Tachibana M, Sakamoto N, Wakita T, Mizuguchi H: Hepatitis C virus-induced innate immune responses in human iPSC cell-derived hepatocyte-like cells. *Virus Res* 2017; 242:7-15. (査読有)
 21. Kawagishi N, Suda G, Onozawa M, Ito J, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N et al.: Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C. *J Viral Hepat* 2017; 24:1098-1106. (査読有)
 22. Kawagishi N, Suda G, Onozawa M, Kimura M, Maehara O, Ito J, Nakai M, Sho T, Natsuizaka

- M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Hepatitis B virus reactivation during hepatitis C direct-acting antiviral therapy in patients with previous HBV infection. J Hepatol 2017; 67:1106-1108. (査読有)
23. Suda G, Ogawa K, Yamamoto Y, Katagiri M, Furuya K, Kumagai K, Konno J, Kimura M, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Ito J, Izumi T, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Tsubota A, Shimada N, Iio E, Tanaka Y, Sakamoto N: Retreatment with sofosbuvir, ledipasvir, and add-on ribavirin for patients who failed daclatasvir and asunaprevir combination therapy. J Gastroenterol 2017; 52:1122-1129. (査読有)
 24. Matsuura K, Sakamoto N, Tanaka Y et al.: Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. Gastroenterology 2017; 152:1383-1394. (査読有)
 25. Mizushima T, Ohnishi S, Hosono H, Yamahara K, Tsuda M, Shimizu Y, Kato M, Asaka M, Sakamoto N: Oral administration of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cell culture prevents subsequent stricture formation after esophageal submucosal dissection in pigs. Gastrointest Endosc 2017; 86:542-552.e1. (査読有)
 26. Wang SC, Lai KR, Li CY, Chiang CS, Yu GY, Sakamoto N, Tu WY, Hsieh MH, Huang JF et al.: The Paradoxical Effects of Different Hepatitis C Viral Loads on Host DNA Damage and Repair Abilities. PLoS One 2017; 12:e0164281. (査読有)
 27. Suda G, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Kumagai K, Kudo M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Yoshida J, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Tsunematsu S, Sato F, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N: Safety and efficacy of daclatasvir and asunaprevir in hepatitis C virus-infected patients with renal impairment. Hepatol Res 2017; 47:1127-1136. (査読有)
 28. Nguyen BN, Okuno Y, Ajiro M, Iida K, Denawa M, Yamamoto M, Sakamoto N et al.: Retinoid derivative Tp80 exhibits anti-hepatitis C virus activity through restoration of GI-GPx expression. J Med Virol 2017; 89:1224-1234. (査読有)
 29. Tsukuda Y, Suda G, Tsunematsu S, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Sho T, Maehara O, Shimazaki T, Kimura M, Morikawa K, Natsuizaka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Sakamoto N: Anti-adipogenic and antiviral effects of L-carnitine on hepatitis C virus infection. J Med Virol 2017; 89:857-866. (査読有)

[学会発表](計 11 件)

1. Momoko Tsuda, Shunsuke Ohnishi, Takeshi Mizushima, Satoshi Abiko, Yuichi Shimizu, and Naoya Sakamoto: Enema of Mesenchymal Stem Cell Culture Supernatant Prevents Rectal Stricture Formation after Circumferential Endoscopic Submucosal Dissection in Pigs. UEGW 2017 2017.10 バルセロナ
2. 津田 桃子、大西俊介, 坂本直哉: ブタ大腸 ESD 後狭窄モデルに対する羊膜間葉系幹細胞由来培養上清の注腸投与による狭窄予防効果 JDDW2017 2017.10 福岡市
3. Shunsuke Ohnishi、Takeshi Mizushima, Hidetaka Hosono, Momoko Tsuda, Kenichi Yamahara and Naoya Sakamoto: ORAL ADMINISTRATION OF CONDITIONED MEDIUM OBTAINED FROM AMNION-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL CULTURE PREVENTS ESOPHAGEAL STRICTURE AFTER ENDOSCOPIC SUBMUCOSAL DISSECTION IN PIGS ISSCR2017 2017.6 ポストン
4. 水島健、津田桃子 大西俊介 坂本直哉: 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた内視鏡的食道粘膜下層剥離術後の狭窄予防 第 16 回日本再生医療学会総会 2017.3 仙台市
5. 大西俊介、水島健, 坂本直哉: 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた消化器疾患の再生医療 JDDW 2016 2016.11 神戸市
6. 川久保和道、大西俊介、坂本直哉: Anti-inflammatory effects of human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation on rats with chronic pancreatitis JDDW 2016 2016.11 神戸市

7. Takeshi Mizushima, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Momoko Tsuda, Naoya Sakamoto: Oral Administration of Conditioned Medium Obtained from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Esophageal Stricture after Endoscopic Submucosal Dissection in Pigs UEGW2016 2016.10 ウィーン
8. Shuichi Miyamoto, Shunsuke Ohnishi, Ikuki Tsuchiya, Reizo Onishi, Hidetaka Hosono, Hiroshi Takeda, Naoya Sakamoto: Effects of Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation and Conditioned Medium Enema in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis UEGW2016 2016.10 ウィーン
9. Mizushima T, Shunsuke Ohnishi, Naoya Sakamoto et al.: Prevention of Subsequence Stricture Formation After Esophageal Endoscopic Submucosal Dissection Using Conditioned Medium Obtained From Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture DDW 2016 2016.5 サンディエゴ
10. Shunsuke Ohnishi, Takeshi Mizushima, Hidetaka Hosono, Momoko Tsuda, Reizo Onishi and Naoya Sakamoto: CONDITIONED MEDIUM OBTAINED FROM AMNION-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL CULTURE PREVENTS ESOPHAGEAL STRICTURE AFTER ENDOSCOPIC SUBMUCOSAL DISSECTION IN PIGS ISSCR2016 2016.6 サンフランシスコ
11. 大西俊介、坂本直哉: 羊膜由来間葉系幹細胞を用いた消化器疾患治療 – first-in-human 臨床試験へ向けて – 第64回日本輸血・細胞治療学会 2016.4 京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 大西 俊介

ローマ字氏名: Shunsuke Ohnishi

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 医学研究院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 10443475

研究分担者氏名: 須田 剛生

ローマ字氏名: Goki Suda

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 大学病院

職名: 特任助教

研究者番号(8桁): 20447460

研究分担者氏名: 森川 賢一

ローマ字氏名: Kenichi Morikawa

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 医学研究院

職名: 助教

研究者番号(8桁): 60384377

(2)研究協力者: なし