

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09014

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎進展を抑制するガレクチン9を制御するマイクロRNAの同定

研究課題名(英文) Identification of microRNAs that regulate Galectin 9 to suppress nonalcoholic steatohepatitis progression

研究代表者

森下 朝洋 (Morishita, Asahiro)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60423430

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)：ガレクチン9欠損STAMマウスを用いて、ガレクチン9によるNASH進展、発癌および増殖抑制に対する有効性を確認した。また、それらの過程に関与するRNA解析し、有意に変動するマイクロRNAを同定した。

また、WTとガレクチン9欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて、レプチン存在下でLPSを培養液に濃度別に投与し、CD14とTNF α を測定したところ、ガレクチン9欠損マウス由来のマクロファージではそれらの著明な亢進を認められた。よって、NASH改善効果に大切な役割を果たすM2様マクロファージにおいて、ガレクチン9の分泌を制御することが重要であることを見出し、それに関与するマイクロRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASH進展からの発癌抑制効果のあるガレクチン9(作用機序はTim-3を経由することしか明らかでない)を制御するマイクロRNAの網羅的な発現プロファイリングを作成することは、治療の困難なNASHに対する抗炎症効果、あるいはNASHからの発癌および増殖抑制効果の可能性、さらにはNASH発癌の新たなマーカー、および治療法の発見につながることを期待される。将来的には、NASHのみならず、さまざまな糖脂質代謝性疾患の診断、治療、創薬開発を目指したバイオ産業の基盤技術となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：We confirmed the efficacy of Galectin-9 in inhibiting NASH progression, carcinogenesis and proliferation in STAM mice and galectin-9-deficient STAM mice. We also identified targetable microRNAs that were significantly expressed in Galectin 9-deficient STAM mice as compared to STAM mice. By analyzing the significantly variable microRNAs obtained from human and mouse samples, common microRNAs were extracted and real targetable microRNAs were identified. In addition, LPS was administered to bone marrow-derived macrophages from Wild type and Galectin 9-deficient mice in the presence of leptin. CD14 and TNF α were measured in the culture medium. The macrophages from Galectin 9-deficient mice demonstrated a marked increase. Therefore, we found that it is important to regulate the secretion of Galectin-9 in M2-like macrophages, which play an important role in the improvement of NASH, and targetable microRNAs involved in NASH development were identified.

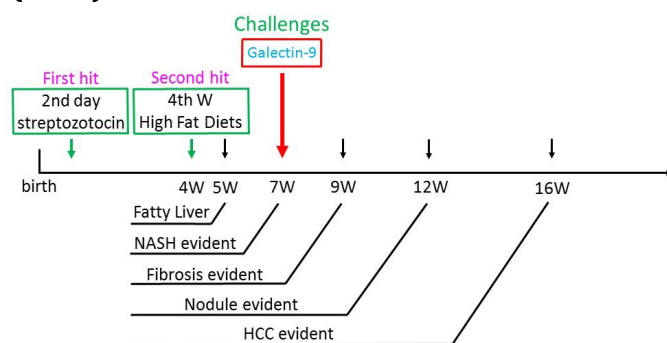
研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 マイクロRNA ガレクチン9

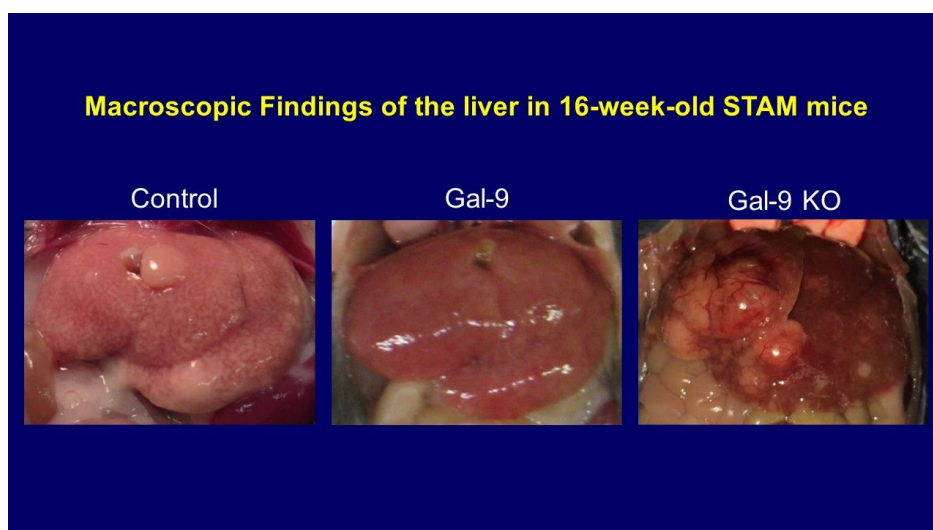
1. 研究開始当初の背景

核酸アナログ製剤や抗ウイルス剤の登場により、HBV、HCV等のウイルスの持続感染からの原発性肝細胞癌は今後著明に減少していくものと考えられている。また一方で、最近の高カロリー、高脂肪食等の食生活の欧米化に伴い、内臓脂肪蓄積によって生じるインスリン抵抗性を基盤とするNASH、およびNASH肝癌の増加が問題となっている。NASHの診断には肝生検が必須であり、患者の囲い込みが困難であるため、発見時には、転移を伴った進行癌で発見される場合も少なくなく、治療に難渋することが多い。このような脈管あるいは多臓器に転移した癌の克服は難しく、最大の問題となっている。特に外科的切除が不能な脈管浸潤のある巨大肝細胞癌の予後は極めて悪く、動注化学療法、放射線治療、現行の分子標的薬等の内科的な治療においても、十分な効果を得られていないのが現状である。実際、臨床の場においては、NASHの進展に関しては、その背景疾患となるインスリン抵抗性を伴う2型糖尿病、高脂血症等の糖脂質代謝異常の治療が行われてはいるものの、十分な効果を得ているとは言い難い。このような状況下では、NASH進展や発癌機構の解明とそれに基づいた治療薬の開発が急務である。我々は、これまでガレクチン9が様々な抗癌作用や肝炎モデルにおける肝内での免疫調節作用を持つことを報告してきた。今回NASHの進展機構や慢性肝炎からの肝癌進展の分子機構の解明、特に免疫調節作用のあるガレクチン9によるNASHの進展を抑制する分子に対する研究を遂行するためにSTAMマウス(NASH進展、発癌マウスモデル)(図1)を用いた実験を開始している。我々は、これまでに肝組織内のクッパー細胞からのガレクチン9分泌が、肝内での腸内細菌の逆行性感染に対する過剰な免疫応答を抑制し、脂肪性肝炎の進展を調節していることを見出した。またガレクチン9の局所での発現量や外部からの投与量の違いによって、免疫応答が減弱したり、逆に増強したりすること、また炎症部位へのガレクチン9のdeliveryが困難であること等により直接ガレクチン9投与では、炎症の局所に正確に、また適当量を供給することができないことがわかってきている。これらを解決するために、肝の炎症部位でガレクチン9を分泌するクッパー細胞で、その分泌調節に関わるマイクロRNAを解析、同定するために*in vivo*、*in vitro*の実験計画を押し進めてきた。これまでの研究により、NASH進展からの発癌予防には、ガレクチン9の制御機構に深く関与するマイクロRNAの関与が強く示唆された。よってNASHからの発癌抑制作用のあるガレクチン9の発現を制御する標的マイクロRNAを同定する必要がある。

(図1) STAMマウスの作成方法



(図2)



2. 研究の目的

肝発癌の原因別割合の中でも**非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis ; NASH)**の比率が年々高くなっているが、その特効薬は未だ確立されておらず、新しい視点に基づいた NASH の治療薬の開発は急務である。我々は、肝組織内のクッパー細胞からのガレクチン 9 分泌が、肝内での腸内細菌の逆行性感染に対する過剰な免疫応答を抑制し、NASH の進展を調節していること、またマイクロ RNA がその過程に密接に関与し、制御している可能性を見出した。今回の目的は NASH 進展を抑制するガレクチン 9 の作用を制御するターゲットマイクロ RNA の同定し、新たな治療薬としての可能性を探ることである。

3. 研究の方法

1. Wild type マウスを用い、STAM マウスを作製、ガレクチン 9 投与群、非投与群のそれぞれ肝組織を用いたマイクロ RNA の網羅的解析

生後 48 時間以内にストレプトゾトシンを注射し、4 週目より高脂肪食を与えたマウス (STAM マウス、図 1) に週 3 回 90 μ g/日のガレクチン 9 を腹腔内投与、9 週目(肝線維化出現)と 16 週目(肝細胞癌出現)に犠死させ、それぞれ肝組織内の脂肪化、炎症、線維化、肝細胞癌の有無、あればサイズを計測する (予備実験にてガレクチン 9 投与群にてこれらには有意な差が認められている、図 2)。投与群、非投与群の肝臓を用いそれぞれマイクロ RNA を抽出、ガレクチン 9 投与群にて著明に増減しているマイクロ RNA を同定する。

2. ガレクチン 9 欠損マウスを用い STAM マウスモデルを作成し、NASH 進展および NASH 発癌において特異的に発現増強、減弱するマイクロ RNA のターゲット遺伝子の実験的確認

上記 2 と同様に Wild type とガレクチン 9 欠損マウスを用いて STAM マウスを作製し、同様に 9 週目と 16 週目に犠死させ、それぞれ肝組織内の脂肪化、炎症、線維化、肝細胞癌の有無を解析する。また、Wild type とガレクチン 9 欠損マウスの肝組織を用い、それぞれマイクロ RNA を抽出し、ガレクチン 9 の欠損によって著明に増減しているマイクロ RNA を同定する。

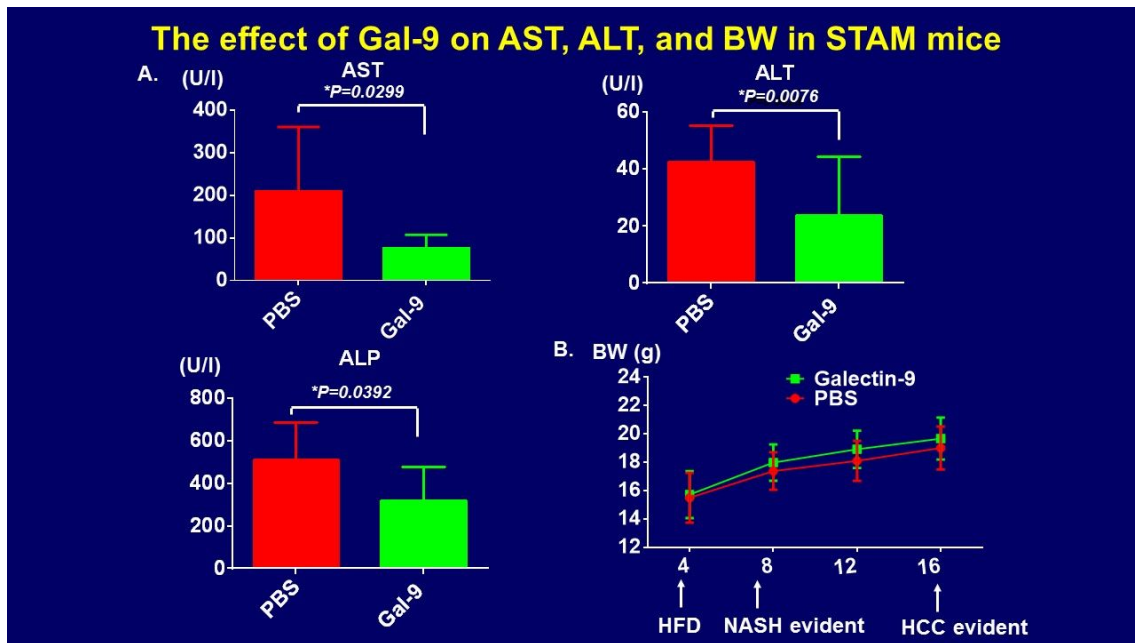
3. Wild type とガレクチン 9 欠損マウスの骨髄由来 macrophages (M2-like)を用いて、脂肪性肝炎下でのガレクチン 9 欠損による過剰免疫反応に関与するマイクロ RNA の解析
我々は肝内のクッパー細胞からのガレクチン 9 分泌が抗炎症作用を引き起こすことを見出した。具体的な方法として、Wild type とガレクチン 9 欠損マウスの骨髄から骨髄由来細胞を取り出し、L-cell conditioned medium (GM-CSF を含む)にて 7 日間培養後、macrophage (M2-like)を誘導する。脂肪性肝炎時に脂肪細胞から分泌されるレプチン存在下で LPS (肝は常に門脈経由で腸管からの微量の細菌に暴露されている。) を培養液に濃度別に投与し、免疫応答の代表的な分子である CD14 と TNF を測定したところ、ガレクチン 9 欠損マウス由来の macrophages では著明な亢進を認めた。よって、NASH 改善効果に重要な役割を果たす M2-like macrophages (肝ではクッパー細胞)において、ガレクチン 9 の分泌を制御する標的マイクロ RNA を同定する。

4. 研究成果

1. STAM マウスにおけるガレクチン 9 投与による臨床パラメーターの変化

ガレクチン 9 を投与することで AST、ALT、ALP の有意な低下を認めた。また NASH 進展経過中にガレクチン 9 投与の有無で体重の有意な変化は認めなかった (図 3)。

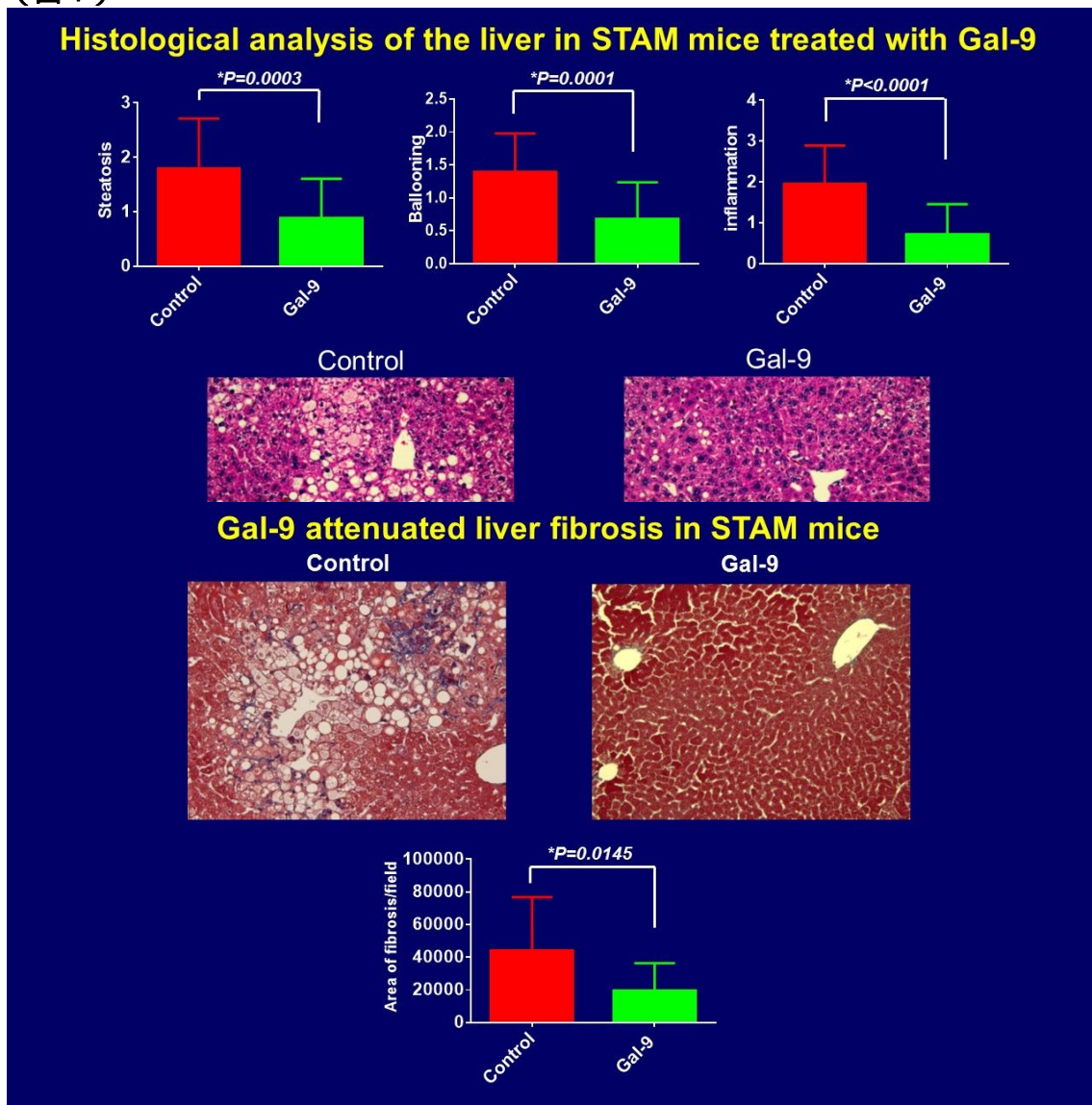
(図 3)



2 . STAM マウスにおけるガレクチン 9 投与による組織学的な変化

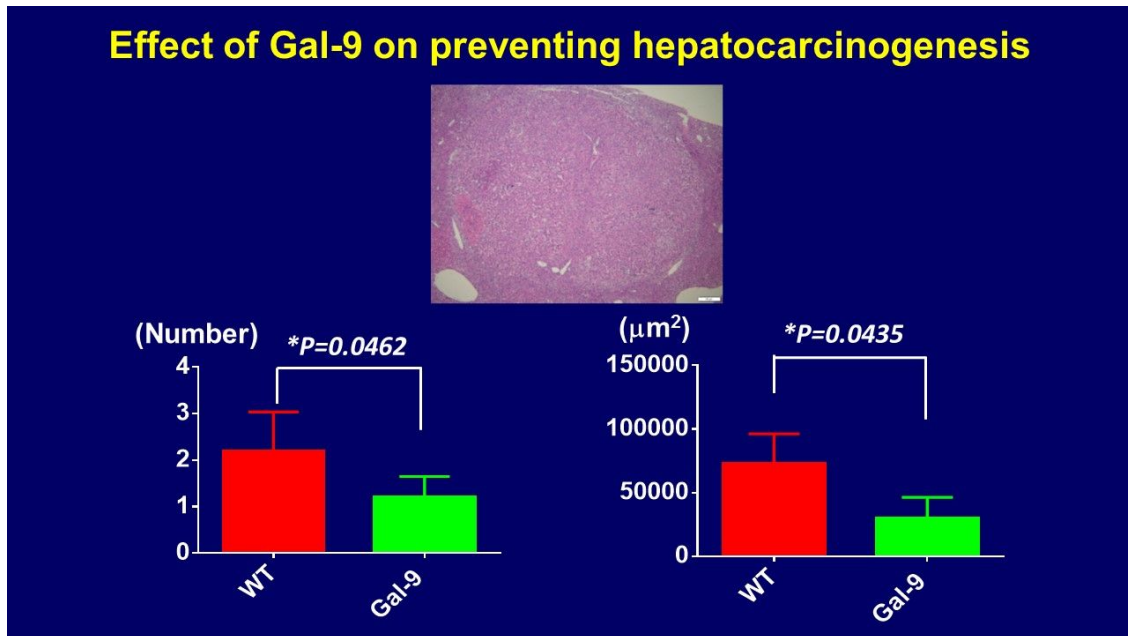
ガレクチン 9 投与により脂肪化、風船様細胞の数、炎症は有意に低下を認めた。また線維化も有意に抑制されており、直接、間接的に肝組織像を変化させることがわかった(図 4)。

(図 4)

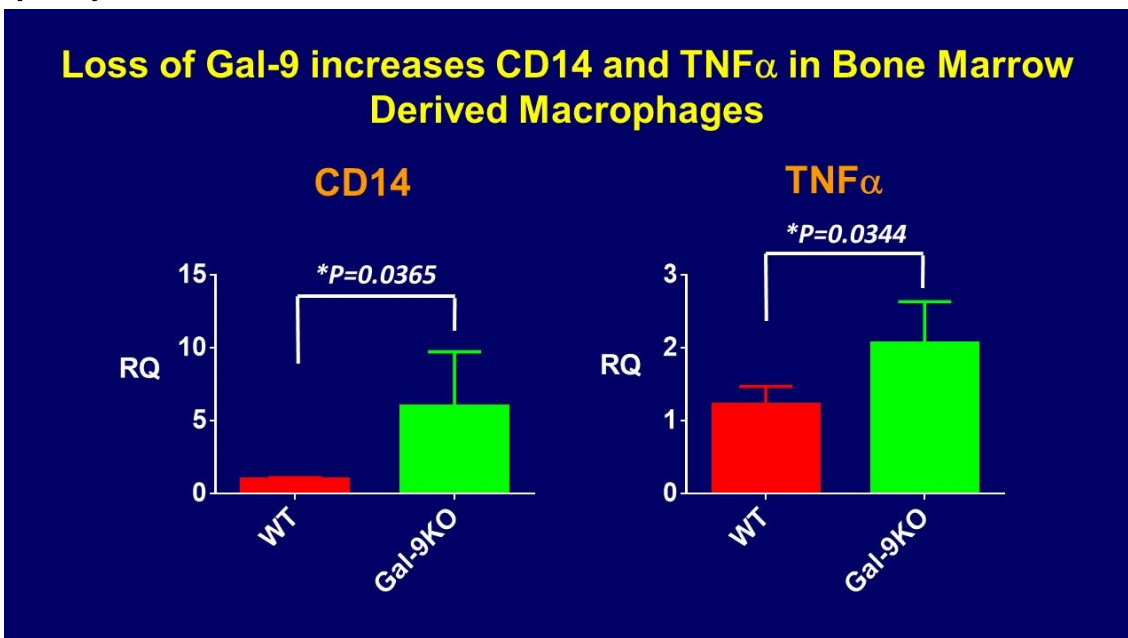


3. ガレクチン9欠損 STAM マウスを作成し、STAM マウスと肝腫瘍の数を検討

ガレクチン9欠損 STAM マウスでは16週後の犠死させ、それぞれ肝組織を取り出し、腫瘍数、サイズを検討した。ガレクチン9欠損 STAM マウスでは有意に腫瘍数が少なく、腫瘍サイズも小さかった(図5)



4. Wild type とガレクチン9欠損マウスの骨髄由来 macrophages (M2-like)を用いて、脂肪性肝炎下でのガレクチン9欠損による過剰免疫反応に關与するマイクロRNAの解析
WT とガレクチン9欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用いて、脂肪性肝炎時に脂肪細胞から分泌されるレプチン存在下でLPSを培養液に濃度別に投与し、免疫応答の代表的な分子であるCD14とTNF α を測定したところ、ガレクチン9欠損マウス由来のマクロファージではそれらの著明な亢進を認めた(図6)。よって、NASH改善効果に大切な役割を果たすM2様マクロファージ(肝ではクッパー細胞)において、ガレクチン9の分泌を制御ことが重要であることを見出し、それに関与するマイクロRNA候補を見いだした。現時点で、肝のマクロファージ内でのガレクチン9のシグナルに關与する重要なsignaling pathwayとそれに密接に關与するマイクロRNAの同定を行っている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田 浩二
2. 発表標題 免疫チェックポイント分子ガレクチン-9 は、肝線維化と肝細胞癌を抑制する
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷 丈二 (Tani Joji) (00596075)	香川大学・医学部・助教 (16201)	
研究分担者	正木 勉 (Masaki Tsutomu) (30335848)	香川大学・医学部・教授 (16201)	
研究分担者	藤田 浩二 (Fujita Koji) (50749421)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	
研究分担者	野村 貴子 (Nomura Takako) (70645415)	香川大学・医学部・協力研究員 (16201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	米山 弘人 (Yoneyama Hirohito) (80294750)	香川大学・医学部附属病院・助教 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関