

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09435

研究課題名(和文) 肝線維化の新規診断・治療法の確立を目指したlet-7の発現・機能解析

研究課題名(英文) Expression and functional analysis of let-7 for the establishment of new diagnostic and therapeutic methods for liver fibrosis

研究代表者

松浦 健太郎 (Matsuura, Kentaro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：30580576

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)：本邦のC型慢性肝炎コホートの保存検体を用いて検討した結果、血清中のlet-7a発現レベルは肝線維化の進展に伴い減少し、他の線維化マーカーと良好な相関をみとめた。治療によりC型肝炎ウイルスの排除された患者の保存血清を用いてサイトカイン・ケモカインの解析を行い、治療終了後の血清Angiopoietin-2とCXCL10の発現レベルがその後の肝線維化・予備能の改善・悪化に関連することを見出した。ヒト肝星細胞株(LX-2)にいくつかのサイトカインを加え活性化すると肝組織中のlet-7の発現レベルは有意に低下し、let-7をLX-2に導入したところ炎症・肝線維化関連の遺伝子発現が抑制される傾向をみとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢血中のlet-7発現レベルが肝線維化診断マーカーとして応用できる可能性を見出した。血清サイトカイン・ケモカイン解析により、HCV排除後の肝線維化改善・非改善に関わる機構の解明につながることを期待される。細胞株を用いた検討から、let-7が肝線維化機構を抑制的に制御していること見出し、今後さらなる検討によりlet-7補充療法を肝線維化治療に応用できる可能性が考えられた。これらの期待される新規治療法は、HCV排除後や非アルコール性脂肪性肝疾患など極めて多くの患者が対象となり得、実現されればその社会的貢献は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Using stored samples from several chronic hepatitis C cohorts in Japan, we found that the expression level of let-7a in serum decreased with the progression of liver fibrosis and correlated well with other fibrosis markers. Cytokine and chemokine analysis was performed using stored sera from patients whose hepatitis C virus had been eliminated by treatment, and we found that serum Angiopoietin-2 and CXCL10 expression levels after completion of treatment were associated with subsequent improvement or deterioration of liver fibrosis. The expression level of let-7 in liver tissue was significantly decreased after activation of a human hepatic stellate cell line (LX-2) with several cytokines. When let-7 was transfected into LX-2, there was a trend toward suppression of gene expression related to inflammation and liver fibrosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝線維化 microRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) の原因として最も多い C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) 感染症の治療は、近年、劇的に進歩し、100%近いウイルス排除が得られる時代となった。しかしながら、HCV を排除できても肝発癌リスクは完全に消失することはなく、その最も重要な危険因子は肝線維化進展である。microRNA (miRNA) は、発生、分化、代謝、発癌など様々な現象に関与しているが、肝疾患における炎症、線維化、発癌機構にも深く機能している。血液中の miRNA は細胞から分泌されたエクソソームを含む細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) 中で安定な状態で存在しているため、非侵襲的な疾患マーカーとしても期待されている。さらに、末梢血に分泌された EVs は、隣接あるいは遠隔の細胞に取り込まれて、それらの遺伝子発現に影響することが知られている。申請者らは、米国国立衛生研究所の C 型慢性肝炎の前向きコホートの保存検体を用いて、網羅的に miRNA プロファイルを解析した結果、血漿および EVs 中の let-7a/c/d 発現レベルの低下が肝線維化進展と関連することを明らかにした (文献①)。興味深いことに、*in silico* の解析結果、let-7 は肝線維化/肝星細胞の活性化における複数のシグナル伝達経路に影響している可能性が推測された。その中で最も重要な TGF- $\beta$  シグナル伝達経路において、let-7 は TGF- $\beta$  受容体、 $\alpha$  型コラーゲンなどを標的とし、肝線維化進展に対して負に制御していると予測された。一方、let-7 は HCC を含むいくつかの癌種において、RAS、MYC、HMGA2 といった癌遺伝子を標的として癌抑制的に機能することが報告されており、慢性肝疾患における肝線維化から発癌に至るメカニズムを考える上でも非常に興味深い。

### 2. 研究の目的

以上の知見は、末梢血 let-7 発現レベルが、肝線維化マーカーとなる可能性、let-7 が肝線維化から発癌に至るメカニズムにおいても関与している可能性を示唆している。これらを証明するために、本研究では以下の検討を行う。

#### (1) C 型慢性肝炎患者における肝線維化進展度と血清 let-7 発現レベルの検討

申請者が米国コホートで見出した末梢血 let-7 発現レベルと肝線維化進展度の関連について、本邦の複数の C 型慢性肝炎コホートの保存血清検体を収集し、再現性を検証する。

#### (2) HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清 EVs 中の網羅的 miRNA 解析

過去のヒト検体を用いた肝線維化研究の多くは、ウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪性肝疾患などによる炎症持続下の肝線維化進展過程における検討であるが、治療により HCV を排除した後の肝線維化・予備能改善に関連する血清 EVs 中の miRNA を同定する。

#### (3) HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清サイトカイン・ケモカインの検討

(2)と同血清検体を用いて、HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清サイトカイン・ケモカインを同定する。

#### (4) 細胞株を用いた let-7 および標的遺伝子の発現動態

ヒト肝星細胞株 (LX-2) を用いて、TGF- $\beta$  1 などのサイトカインで処置した後、細胞内の let-7 および線維化関連遺伝子の発現動態を明らかにする。let-7 mimic あるいは let-7 inhibitor を肝星細胞株に導入して、let-7 の標的遺伝子を含む線維化関連遺伝子の発現変化を明らかにする。

#### (5) 肝線維化モデル動物における let-7 の動態

肝線維化モデル動物 (コリン欠乏高脂肪食飼料投与マウス) を用いて肝線維化進展に従う肝組織中の let-7 の動態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) C 型慢性肝炎患者における肝線維化進展度と血清 let-7 発現レベルの検討

複数のコホートから収集した保存血清中の let-7 発現レベルをリアルタイム PCR 法により測定し、肝生検による肝線維化進展度との関連、その他の肝線維化マーカーとの相関について検討した。

#### (2) HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清 EVs 中の網羅的 miRNA 解析

治療により HCV が排除された肝線維化の進展した C 型慢性肝炎患者の保存血清を用いて、その後の肝線維化・予備能の改善・悪化に関連する EVs 中の miRNA の網羅的発現解析 (マイクロアレイおよび RNA-seq による) を行った。なお、EVs の精製については、多孔質ガラスデバイスを用いた新規の技術 (名古屋大学の馬場嘉信教授らと AGC Inc. による開発) により効率的に血清中の EVs を回収した。

#### (3) HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清サイトカイン・ケモカインの検討

肝線維化の進展した C 型慢性肝炎患者において、治療による HCV 排除後に肝線維化マーカーで

ある血清 M2BPGi が低下した肝線維化改善群と低下の乏しい非改善群の保存血清を用いて、炎症、免疫に関連する 27 のサイトカイン・ケモカインを同時測定できるマルチプレックス分析システムで解析した。候補サイトカイン・ケモカインを得た後、追加検体を用いて ELISA 法を用いて同タンパク発現量を測定した。

#### (4) 細胞株を用いた let-7 および標的遺伝子の発現動態

ヒト肝星細胞株 (LX-2) を、TGF- $\beta$ 1 などのサイトカインで処置した後、細胞内の let-7、TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達経路における線維化関連遺伝子 (*TGFB1*, *TGFBR1*, *SMAD2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *ACTA2*) の mRNA および蛋白レベルをリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで解析した。LX-2 に各種サイトカインを添加、let-7 mimic あるいは inhibitor を導入した後の let-7 および線維化関連遺伝子の発現動態を解析した。

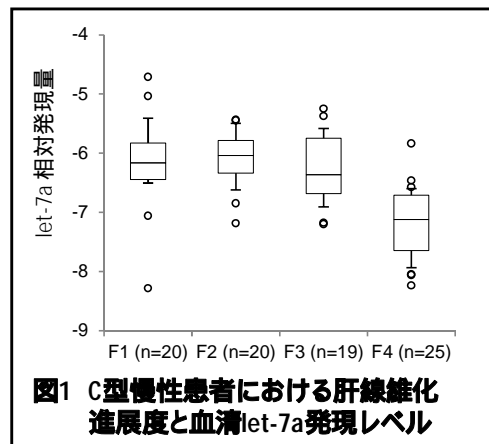
#### (5) 肝線維化モデル動物における let-7 の動態

肝線維化モデル動物 (コリン欠乏高脂肪食飼料投与マウス) における肝線維化進展と肝組織中の let-7 発現レベルをリアルタイム PCR 法により測定し、その動態を明らかにした。

### 4. 研究成果

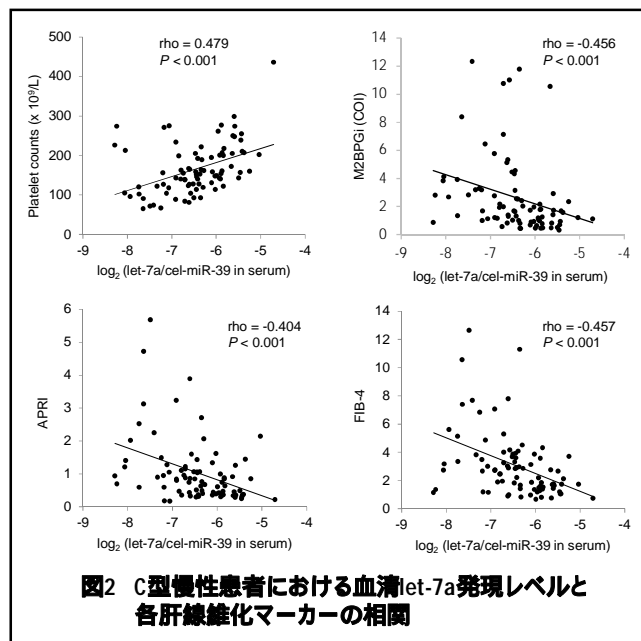
#### (1) C 型慢性肝炎患者における肝線維化進展度と血清 let-7 発現レベルの検討

申請者が米国の C 型慢性肝炎コホートの保存検体を用いて行った本研究を立案するきっかけとなった先行研究の結果について、本邦の複数の C 型慢性肝炎コホートから肝生検時の保存血清検体および臨床情報を収集し、末梢血 let-7 レベルと肝線維化進展度との相関の再現性を検証した。その結果、血清および血清由来の細胞外小胞中の let-7a の発現は肝線維化の進展に伴い減少することを再現した (図 1)。さらに、血清中の let-7 発現レベルは他の線維化マーカーと良好な相関をみとめた (図 2) (文献②)。



#### (2) HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清 EVs 中の網羅的 miRNA 解析

治療により HCV が排除された患者の保存血清を用いて、その後の肝線維化・予備能の改善・悪化に関連する EVs 中の miRNA の網羅的発現解析 (マイクロアレイおよび RNA-seq による) を行い候補となる複数の miRNA を見出し、別コホートの検体でリアルタイム PCR 法を用いて検証中である。



#### (3) HCV 排除後の肝線維化・予備能改善に関連する血清サイトカイン・ケモカインの検討

肝線維化の進展した C 型慢性肝炎患者において、抗ウイルス療法による HCV 排除後に肝線維化マーカーである血清 M2BPGi が低下した肝線維化改善群と非改善群の保存血清を用いて、炎症、免疫に関連する 27 のサイトカイン・ケモカインを同時測定できるマルチプレックス分析システムで解析した。その結果、抗 HCV 療法終了後 24 週時点での血清 CXCL10 が高値であることが肝線維化非改善に関連していることを見出した (Nagura Y, Matsuura K et al. 現在投稿中)。また、抗 HCV 療法前の血清 Angiopoietin-2 値が HCV 排除後の肝線維化の改善・非改善に関連することが本邦より報告されたため (文献 ) 上記の検討と同検体を用いて検討したところ、抗 HCV 療法終了後 24 週時点での血清 Angiopoietin-2 高値が HCV 排除後の肝線維化非改善に関連することを見出し報告した (表 1) (文献 )。

**表1 抗HCV療法終了24週におけるHCV排除後肝線維化非改善に寄与する因子の多変量解析**

|               | P-value | Odds ratio |
|---------------|---------|------------|
| ALBI score    | 0.016   | 0.126      |
| FIB-4 index   | 0.014   | 0.739      |
| Ang-2 (pg/mL) | <0.001  | 0.131      |

#### (4) 細胞株を用いた let-7 および標的遺伝子の発現動態

細胞内における let-7 の働きについて、LX-2 をいくつかのサイトカインを加え活性化すると let-7 の発現レベルは有意に低下した (図 3)。また、let-7 を LX-2 に導入後の肝線維化関連の遺伝子発現を解析したところ、炎症、肝線維化シグナルに関連する遺伝子の発現レベルを抑制する傾向をみとめた (図 4)。

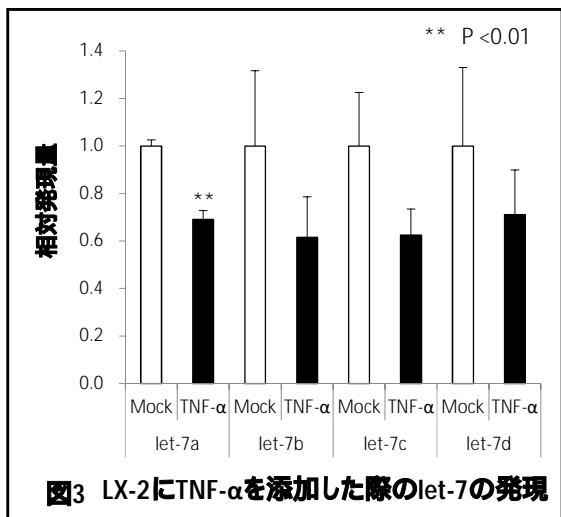


図3 LX-2にTNF-αを添加した際のlet-7の発現

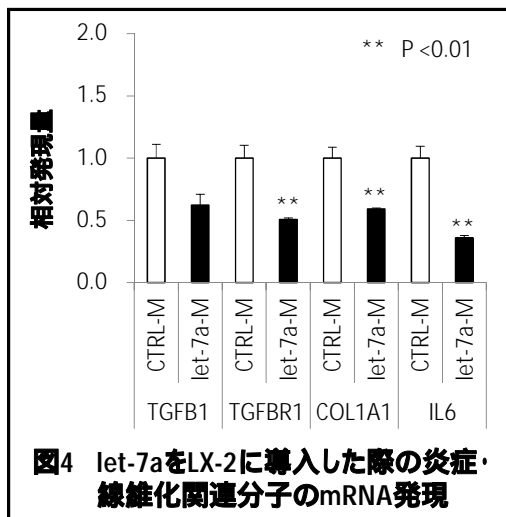


図4 let-7aをLX-2に導入した際の炎症・線維化関連分子のmRNA発現

#### (5) 肝線維化モデル動物における let-7 の動態

肝線維化を呈する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)モデル動物の肝臓における let-7 および肝線維化関連分子の発現解析を施行したところ、肝線維化進展に従って、肝組織中の let-7 の発現レベルは低下する傾向を確認した (図 5)。

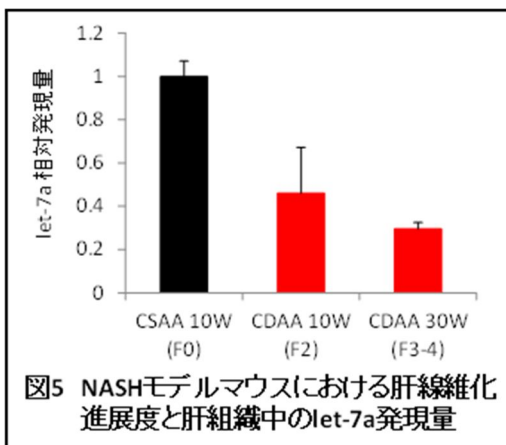


図5 NASHモデルマウスにおける肝線維化進展度と肝組織中のlet-7a発現量

#### < 引用文献 >

① **Matsuura K**, De Giorgi V, Schechterly C, et al. Circulating let-7 levels in plasma and extracellular vesicles correlate with hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2016;64(3):732-45.

② **Matsuura K**, Aizawa N, Enomoto H, et al. Circulating let-7 levels in serum correlate with the severity of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. *Open Forum Infect Dis*. 2018 Oct 22;5(11):ofy268.

Kawagishi N, Suda G, Kimura M, et al. Baseline elevated serum angiopoietin-2 predicts long-term non-regression of liver fibrosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C. *Sci Rep* 2021; 11: 9207.

Suzuki T, **Matsuura K (Corresponding authors)**, Nagura Y, et al. Serum angiopoietin-2 level at 24 weeks after direct-acting antiviral therapy predicts regression of M2BPGi-based liver fibrosis. *Hepatology Res*. 2022;52(11):919-927.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

|  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 著者名<br>Matsuura K, Aizawa N, Enomoto H, Nishiguchi S, Toyoda H, Kumada T, Iio E, Ito K, Ogawa S, Isogawa M, Alter HJ, Tanaka Y. | 4. 巻<br>5         |
| 2. 論文標題<br>Circulating let-7 levels in serum correlate with the severity of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C.               | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Open Forum Infect Dis.   | 6. 最初と最後の頁<br>268 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1093/ofid/ofy268  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-         |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Suzuki Takanori, Matsuura Kentaro, Nagura Yoshihito, Ogawa Shintaro, Fujiwara Kei, Nojiri Shunsuke, Watanabe Takehisa, Kataoka Hiromi, Tanaka Yasuhito                                   | 4. 巻<br>52              |
| 2. 論文標題<br>Serum angiopoietin 2 levels predict regression of Mac 2 binding protein glycosylation isomer based liver fibrosis after hepatitis C virus eradication by direct acting antiviral agents | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Hepatology Research  | 6. 最初と最後の頁<br>919 ~ 927 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1111/hepr.13823   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>名倉義人、松浦健太郎、鈴木孝典、藤原圭、野尻俊輔、田中靖人      |
| 2. 発表標題<br>HCV排除後の肝硬変患者における血清サイトカイン/ケモカイン発現解析 |
| 3. 学会等名<br>第57回日本肝臓学会総会                       |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>松浦健太郎、飯尾悦子、榎本平之、西口修平、豊田秀徳、熊田卓、松波加代子、藤原圭、野尻俊輔、田中靖人 |
| 2. 発表標題<br>C型慢性肝炎患者の血清におけるlet-7発現解析                          |
| 3. 学会等名<br>第54回日本肝臓学会総会                                      |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松浦健太郎、飯尾悦子、会澤信弘、榎本平之、西口修平、豊田秀徳、熊田卓、松波加代子、藤原圭、野尻俊輔、城卓志、田中靖人 |
| 2. 発表標題<br>C型慢性肝炎患者の肝線維化進展に関連するlet-7発現・機能解析                           |
| 3. 学会等名<br>第21回日本肝臓学会大会   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kentaro Matsuura, Etsuko Iio, Nobuhiro Aizawa, Hirayuki Enomoto, Shuhei Nishiguchi, Hidenori Toyoda, Takashi Kumada, Kayoko Matsunami, Kei Fujiwara, Shunsuke Nojiri, Valeria De Giorgi, Richard Y. Wang, Kazi Salam, Aparna Vuppala, Robert D. Allison, Patrizia Farci, Harvey J. Alter, and Yasuhito Tanaka |
| 2. 発表標題<br>Circulating let-7 levels in serum and extracellular vesicles correlate with hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C   |
| 3. 学会等名<br>米国肝臓学会（国際学会）  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|