

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07940

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎に対するペリオスチンアンチセンス核酸の医薬応用

研究課題名(英文)Pharmaceutical applications of periostin antisenseoligo for non-alcoholic fatty liver disease

研究代表者

菅野 啓司(Kanno, Keishi)

広島大学・病院(医)・准教授

研究者番号：30448237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリックス蛋白であるペリオスチンは様々な生理機能があることが報告されている。本研究では、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の進展において、アンチセンス核酸(ASO)を用いてペリオスチンの発現抑制することで治療に応用できる可能性について検討した。NASHモデルマウスにペリオスチンASOを投与すると肝臓でのペリオスチンの発現の低下に伴い、肝臓の脂肪化・線維化が有意に改善され、NASHの進展を抑制することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患は、メタボリック症候群に伴う肝疾患で、肝硬変や肝臓にいたる症例もあり、病態の解明と治療法の確立が強く望まれる疾患であるが、効果が確立された薬物療法は現在のところない。本研究では次世代医薬であるアンチセンス核酸を用いて肝臓でのペリオスチンの発現を抑制することで、肝脂肪化・線維化を抑制することを証明した。このことは、ペリオスチンが治療ターゲットとして有用である可能性を示唆するだけでなく、アンチセンス核酸が慢性肝疾患に有用であることを証明した点で意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is characterized by hepatic steatosis, inflammation, and fibrosis. Periostin, a matricellular protein, plays an important role in hepatic steatosis and fibrosis and could be a potential target for NASH treatment. Advances in molecular biology and biochemical engineering have led to the development of antisense oligonucleotides (ASOs) that can inhibit target genes with no significant toxic effects. We investigated the therapeutic effects of periostin-targeting ASO (PNASO) in NASH. The deletion of hepatic periostin by PNASO significantly ameliorated hepatic steatosis while restoring the expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor- α . PNASO also inhibited hepatic fibrosis, reflected by the reduction of α -smooth muscle actin, collagen type I. In conclusions, Periostin-targeting ASO is a potential therapeutic approach for the efficient treatment of hepatic steatosis and fibrosis in NASH.

研究分野：肝脂質代謝

キーワード：アンチセンス核酸 非アルコール性脂肪性肝疾患 非アルコール性脂肪性肝炎 肝線維化 脂肪肝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ペリオスチンについて

ペリオスチンは 1992 年に同定された比較的新しい細胞外マトリックス蛋白で、組織の創傷治癒やアレルギー反応など多彩な生理活性があることが明らかになりつつある。我々は、肝臓の線維化におけるペリオスチンの役割について検討を行い、肝線維化進展においてペリオスチンは必須であり、肝線維化の治療戦略を考える上で重要な新規分子であることを明らかにした (Sugiyama A. J Gastroenterol 2016)。

(2) 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、非飲酒者において肥満やインスリン抵抗性を背景として発生する脂肪肝のうち、炎症・線維化を伴い肝硬変や肝癌へ進行する予後不良な病態を指す。近年、脂肪肝患者の肝臓においてペリオスチンの発現が亢進しており、実験的にペリオスチンを抑制することにより肝脂肪化が抑制されることが報告されている (Lu Y, et al. J Clin Invest 2014)。以上から、ペリオスチンの機能または発現を抑制することにより、NASH の病態における大きなステップである 1. 肝細胞における脂肪の蓄積、2. 肝組織の炎症・線維化の両者を効率的に改善することが期待できる。

(3) アンチセンス核酸(ASO)

アンチセンス核酸(ASO)は遺伝子の相補性を利用し、特定の遺伝子の発現を抑制することから、核酸医薬品の 1 つとして抗体医薬に続く次世代分子標的薬として期待を集めている。すでに米国においてホモ型家族性高コレステロール血症や筋ジストロフィーなどの疾患において臨床応用されている。しかし、ペリオスチンをターゲットとした ASO を用いた研究は、術後の腹膜癒着および肺線維症の抑制効果の 2 つの報告に限られており (Takai K, et al. J Pharmacol Sci 2017. Tomaru A, et al. Gene Ther. 2017)、今後様々な病態への応用が期待されている。

2. 研究の目的

近年、ウイルス性肝炎の治療法が続々と確立され治療奏効率が飛躍的に向上している。一方で、肥満などの生活習慣病を背景とする NASH の罹患率がわが国において成人の約 10% と推計されているにも関わらず、その病態解明と治療法に関して混乱している。このような状況のもと、本研究で着目するペリオスチンは肝線維化に必須の分子であることを申請者らは明らかにした。さらに、他の研究グループからは肝脂肪化においてもペリオスチンは重要な役割を果たしていることが報告されている。以上の知見は肝臓の脂肪化、炎症、線維化をペリオスチンの制御で効率的に抑制できる可能性を強く示唆する。本研究では、NASH マウスモデルに対しペリオスチン ASO を投与することで、肝脂肪化抑制・肝線維化抑制効果を検証し、NASH 治療の基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 不死化肝細胞 Hc3716 細胞を用いた *in vitro* 研究

肝星細胞由来ペリオスチンの肝細胞脂肪化促進効果の検討

不死化肝星細胞株 LX2 を 5 日間培養した conditioned media の存在下でパルミチン酸/オレイン酸を添加し、肝星細胞由来のペリオスチンが肝細胞脂肪化に与える影響について検討を行う。さらに同条件下でペリオスチン中和抗体を加えることにより、肝脂肪化抑制効果がペリオスチン依存性であることを確認する。

recombinant ペリオスチンの肝脂肪化に与える影響についての検討

1 µg/mL 濃度の recombinant ペリオスチン存在下にパルミチン酸/オレイン酸を添加し、肝細胞脂肪化の進展について検討する。さらに、肝脂質代謝関連遺伝子の発現について real-time PCR にて検討する。さらに、細胞内シグナル伝達について western blot にて検討を行う。

(2) NASH マウスモデルにおけるペリオスチン ASO の抗脂肪化・抗線維化効果の検討

8 週齢の C57BL/6J マウスに 1. コントロール食群、2. コリン欠乏高脂肪食 (CDAHFD) 群、3. CDAHFD + ペリオスチン ASO (100mg/kg BW 腹腔内投与週 1 回、計 4 回投与) 群の 3 群において、肝脂肪化・肝線維化の進展について比較検討を行う。

肝臓におけるペリオスチン ASO の発現抑制効果の検討
上記3群のマウス肝臓におけるペリオスチンの発現について real-time PCR、western blot、免疫染色にて検討を行い、ペリオスチン ASO の発現抑制効果について検証を行う。

ペリオスチン ASO の肝脂肪化抑制効果の検討
3群マウスの肝臓の組織学的(HE 染色、Oil red O 染色) 肝組織中中性脂肪含有量測定を行い、ペリオスチン ASO の肝脂肪化抑制効果を評価する。さらに、肝脂質代謝関連遺伝子について real-time PCR、western blot にて発現の検討を行い、肝脂肪化抑制効果のメカニズムについて検証を行う。

ペリオスチン ASO の肝線維化抑制効果の検討
3群マウスにおける肝臓の組織学的(HE 染色、Azan 染色)および肝β-hydroxyproline 定量を行い、肝臓の線維化の抑制効果について検証する。さらに、肝線維化マーカーについて免疫染色、real-time PCR、western blot にて発現と局在について検討を行う。

4. 研究成果

(1) 不死化肝細胞 Hc3716 細胞を用いた *in vitro* 研究

肝星細胞由来ペリオスチンの肝細胞脂肪化促進効果
はじめに、肝臓を占める細胞群の中でペリオスチン産生する細胞を同定する目的で、不死化肝星細胞株 LX2、不死化肝細胞株 Hc3716、肝癌細胞株 HuH7、HepG2 細胞でのペリオスチン mRNA の発現を検討したところ、LX2 のみで発現を認め、肝星細胞がペリオスチンの主な産生源であることを確認した。さらに、LX2 を5日間培養した conditioned media の存在下に脂肪酸を添加したところ、Hc3716 の脂肪化が促進され、ペリオスチン中和抗体下では抑制された。

recombinant ペリオスチンの肝脂肪化に与える影響
Hc3716 に recombinant ペリオスチン添加下に脂肪酸の添加をしたところ、と同様に Hc3716 の脂肪化が促進された。さらに、肝脂質代謝遺伝子の発現について検討したところ、肝臓での脂肪酸酸化に関連する PPAR alpha とその下流遺伝子 Cpt1a の発現の低下と、肝臓への脂肪酸の取り込みに関連する Cd36、Fatp の発現誘導を認めた。以上から、肝星細胞から分泌されるペリオスチンは肝細胞の脂肪酸酸化の低下と脂肪酸取り込みの亢進をきたすことが示唆された。細胞内シグナル伝達の検討では、ペリオスチンの添加にて NF-κB のリン酸化と下流の Akt の活性化を認めた。

(2) NASH マウスモデルにおけるペリオスチン ASO の抗脂肪化・抗線維化効果

肝臓におけるペリオスチン ASO の発現抑制効果
CDAHFD の投与マウス肝臓ではコントロール食マウスに比較して約5倍のペリオスチン遺伝子の発現誘導を認め、ペリオスチン ASO の投与にてその発現は有意に減少した。さらに western blot 解析でも CDAHFD によるペリオスチン蛋白の発現誘導はペリオスチン ASO 投与にてコントロールレベルまで低下した。以上から、ペリオスチン ASO 腹腔内投与にて効果的に肝臓でのペリオスチン発現の抑制を誘導することを確認した。

ペリオスチン ASO の肝脂肪化抑制効果
CDAHFD 投与マウス肝臓は肉眼的に白色調を呈し、組織学的に HE 染色にて大適性脂肪滴の沈着を認め、Oil red O 染色陽性の著明な脂肪沈着を認めた。一方、ペリオスチン ASO 投与マウス肝臓は肉眼的にコントロールマウスに近い肉眼像を呈し、組織学的も肝脂肪化が有意に改善していた。肝組織中の中性脂肪含有量の定量化を行ったところ、CDAHFD 群に比較して、CDAHFD + ペリオスチン ASO 群では有意に肝臓中脂肪含有量の減少を認めた。以上から、ペリオスチン ASO は肝臓の脂肪化を有意に抑制することが示唆された。

ペリオスチン ASO の肝線維化抑制効果
活性化星細胞マーカーであるαSMA の発現は遺伝子レベル・蛋白レベルともに CDAHFD の投与にて発現の誘導を認め、ペリオスチン ASO の投与にて発現の抑制を認めた。この変化に伴い、肝線維化マーカー(Col1a1、Ctgf、Mmp-2、Mmp-9)の発現もペリオスチン ASO の投与にて発現の抑制を認め、肝線維化を抑制していることが示唆された。

考察および結論

細胞実験の結果からペリオスチンは肝細胞脂肪蓄積を促進し、そのメカニズムとして肝細胞への脂肪酸酸化の低下および取り込み亢進をきたす。NASH モデルマウスの検討からペリオスチン ASO は肝臓でのペリオスチンの発現を抑制し、それに伴って肝臓の脂肪化・線維化を有意に抑制した。以上の結果から、ペリオスチン ASO による肝星細胞由来のペリオスチンの発現抑制は NASH の治療戦略において、有効かつ効率的な治療候補になりえるものと推測された。

参考文献

Kobayashi T, Kanno K, Nguyen PT, Sugiyama A, Kawahara A, Otani Y, Kishikawa N, Ito M, Tazuma S. Periostin antisense oligonucleotide prevents hepatic steatosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2020;35(12):2140-2150.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Tomoki, Kanno Keishi, Nguyen Phuong Thao, Sugiyama Akiko, Kawahara Akihiro, Otani Yuichiro, Kishikawa Nobusuke, Ito Masanori, Tazuma Susumu	4. 巻 35
2. 論文標題 Periostin antisense oligonucleotide prevents hepatic steatosis and fibrosis in a mouse model of non alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 2140 ~ 2150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.15088	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kobayashi T, Kanno K, Sugiyama A, Nguyen PT, Kishikawa N, Otani Y, Tazuma S
2. 発表標題 Periostin antisense oligonucleotide prevents hepatic steatosis and fibrosis in mice: A novel strategy for nonalcoholic steatohepatitis treatment.
3. 学会等名 69th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林知貴、菅野啓司、田妻進
2. 発表標題 肝線維化に対する新たな治療戦略-ペリオスチンに対するアンチセンス核酸製剤の有用性
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
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	小林 知貴 (Kobayashi Tomoki) (00817075)	広島大学・病院(医)・助教 (15401)	

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	大谷 裕一郎 (Otani Yuichiro) (00817091)	広島大学・病院（医）・助教 (15401)	
研究分担者	杉山 晶子 (Sugiyama Akiko) (30788469)	広島大学・病院（医）・研究員 (15401)	
研究分担者	岸川 暢介 (Kishikawa Nobusuke) (50711347)	広島大学・病院（医）・講師 (15401)	
研究分担者	田妻 進 (Tazuma Susumu) (80201614)	広島大学・病院（医）・教授 (15401)	

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