

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：82685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08021

研究課題名(和文) Wnt/β-cateninシグナルによる肝線維化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of liver fibrosis by Wnt-β-catenin pathway

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：国内で約20万人以上存在するHCV肝硬変、特にChild-Pugh (CP) score B以降の非代償性肝硬変に対する治療薬は存在せず予後不良であり、新たな治療薬開発は喫緊の課題である。肝硬変に対する治療薬(抗線維化薬)は現在実用化されていない。PRI-724は、Prism Pharmaが開発したWntシグナル伝達を阻害しβ-cateninとCREB-binding proteinの蛋白相互作用を選択的に阻害できる化合物である。肝線維化モデルを用いて、PRI-724投与により抗線維化作用を認めた。PRI-724の作用機序として、肝星細胞の活性化を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回研究開発代表者らが提案する低分子化合物PRI-724は、Wnt-β-cateninシグナル阻害剤で、特にCBP-β-cateninシグナルのみを阻害する点が非常に独創的である。すでに、我々は胆汁うっ滞線維化モデルのみならず、HCV Tg miceや四塩化炭素誘導線維化モデル及びコリン欠乏メチオニン減量NASHモデルにおいても、抗線維化治療効果を報告している。本研究の成果により線維化に対する有効な治療薬開発が実現すれば、肝硬変に伴う様々な合併症も改善され、肝不全への進行や肝がんの発症も予防可能となる。肝硬変患者の予後の改善が見込まれ、それに伴う医療費の削減により医療経済的にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：There are no therapeutic agents for HCV cirrhosis, especially decompensated cirrhosis with Child-Pugh (CP) score B, which exists in more than 200,000 people in Japan, and the prognosis is poor. A therapeutic drug (anti-fibrotic drug) for liver cirrhosis has not been put into practical use at present. Recently, it was reported that Wnt signaling is also involved in fibrosis via TGF-β. PRI-724 is a compound developed by Prism Pharma that can inhibit Wnt signaling and selectively inhibit the protein interaction between β-catenin and CREB-binding protein. An antifibrotic effect was also observed by administration of PRI-724 using a fibrotic model using carbon tetrachloride and bile duct ligation. As the mechanism of action of PRI-724, we found that it suppresses the activation of hepatic stellate cells and showed the involvement of Ly-6 Clow macrophages.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝硬変 肝線維化

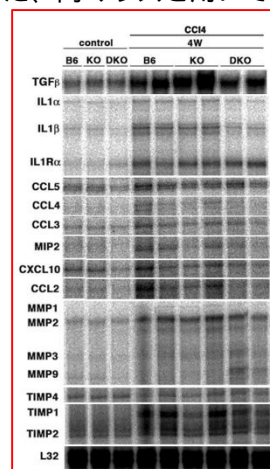
## 1. 研究開始当初の背景

厚生省の肝炎等克服緊急対策研究事業において、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は推進されている。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 30 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られる。

### 応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

申請者は、現在までに HBV と宿主の防御機構および肝障害特に線維化のモデル作成、作用機序について研究を行ってきた。HBV Tg マウスを用いて、抗原特異的 CTLs を移入することにより劇症肝炎を生じる系において肝障害の進展には、炎症細胞特にマクロファージ、好中球が重要であり同時にこれらの細胞が産生する TNF $\alpha$ 、MIP2、CCL2、MIF が関与していることを報告してきた(J.Virol 2005, CVI 2006, J.Gastro 2009)。さらにこのマウスを用いて、HBV に対する抗ウイルス効果には抗原特異的 CTLs が key であり (immunity,1996) CTLs が産生する IFN $\gamma$  と TNF $\alpha$  が重要であった。また CTL 移入後 ALT 値の上昇は 3 日後がピークで、肝細胞内の HBV の発現は 24 時間後から低下し 28 日まで抑制効果を認めた。また、同マウスを用いて、抗原特異的 CTLs だけでなく非特異的な細胞特にマクロファージや NK 細胞、NKT 細胞なども IFN $\gamma$  や TNF $\alpha$ 、IL-12 を産生して HBV の複製を抑制することを報告した (J.Exp.Med 2000, J.Immunol 2002, J.Virol 2002)。

一方、肝障害のメカニズムについては肝細胞のアポトーシスと転写因子である NF- $\kappa$ B の機能に着目し、抗 CD40 抗体を用いた肝障害モデルにおいて NF- $\kappa$ B の抑制は抗炎症作用と同時に肝細胞のアポトーシス促進作用を有するという抗炎症の二面性について報告した (hepatology 2004)。同様にこのモデルより、B 細胞は活性化された状態下において肝障害を誘導することを示した (Am.J.Pathol 2006)。また肝線維化の研究として、Concanavalin A の頻回投与による肝線維化モデルを提唱し (Int.Immunol 1999) 実験モデルとして多数引用されている (Nat.Med 2001)。また接着因子の一つである CD44 が四塩化炭素誘導肝線維化モデルにおいて重要な働きをしており、特に骨髄由来の単球、マクロファージが CD44 を介して線維化に関与していることを示した (J.Hepatol 2008)。(右上図参照)

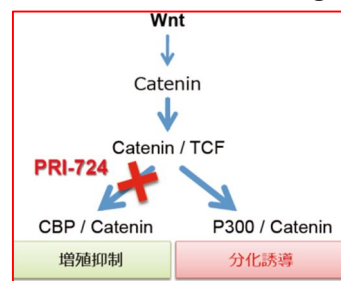


以上の研究成果を踏まえ肝線維化の制御機構として骨髄由来の炎症細胞特に、単球、マクロファージが重要であると推定された。HCV 発現肝線維化モデルにおいても PRI-724 投与群では肝臓内に単球、マクロファージが増加しており、これらの炎症性細胞の解析が重要であるという着想に至った。

## 2. 研究の目的

申請者は最近 C 型肝炎ウイルス (HCV) 持続発現マウスモデルを作製し、慢性肝炎、肝線維化を経て肝細胞癌を生じることを見いだした。また Wnt/ $\beta$ -catenin 阻害剤である PRI-724 をこのマウスに投与することにより肝線維化の著明な改善を認めた。本研究は、HCV 発現肝線維化モデルを用いて新たな抗線維化治療薬の開発に向け、Wnt シグナル阻害薬による抗線維化作用の解明を宿主の免疫学的機構に焦点をあて行うことが目的である。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 40 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(右図参照)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 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(下図参照)。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化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。



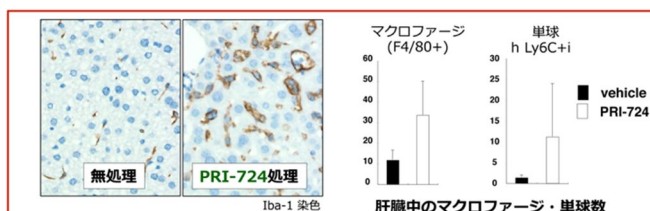
### 3. 研究の方法

#### 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 型肝炎硬変の場合、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/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)。

#### 2)HCV 肝線維化モデルにおける PRI-724 の治療効果の検討

申請者らは上述したように、HCV Tg マウスに PRI-724(1mg/kg)を 6 週間持続投与することにより肝線維化像の改善を認めた。Wnt シグナルが線維化に関与していることは良く知られているが詳細なメカニズムは不明な点が多い。一般的に HCV による肝線維化は、軽度な肝障害が持続して起こるためアルコールや薬物等による肝線維化とは病態が異なる。抗線維化を誘導する因子として大きく線維の合成抑制と分解系の亢進である脱線維化に分けられる。我々は線維化が形成された HCV Tg マウスに PRI-724 を投与後抗線維化作用を有することから、まず脱線維化に注目する。脱線維化作用を有するサイトカインや MMP、TIMP 等のプロテアーゼを解析する。また最近、マクロファージが M1/M2 に分けられ前者は細菌感染に対して TNF- $\alpha$ , IL-6、IFN- $\gamma$ などを産生し防御機構を有しており、一方 M2 マクロファージは寄生虫、アレルギー等の発症に関与し、IL-4、IL-10、IL-13 等のサイトカインを産生すると言われている(Wynn, Nat Review. 2011)。また肝線維化とくにリーシュマニア寄生虫による線維化モデルで M2 マクロファージの関与が示唆されている(Wynn, Nat Med.2012)。これまでに我々は PRI-724 を投



与後肝臓内にマクロファージ、単球、好中球の増加を確認している(上図参照)。以上の知見より、PRI-724の抗線維化作用機序の解明として  
1)脱線維化を誘導する因子の同定 2)肝臓内に増加するマクロファージ、単球の機能解析および誘導因子の同定に焦点を当てる。

#### 4. 研究成果

HCV Tg マウスを用いた肝線維化に対してPRI-724は抗線維化作用を認めた。作用機序として、マクロファージからのMMP-8, 9の産生亢進および肝星細胞の活性化抑制が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0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 Kimura Kiminori	4. 巻 54
2. 論文標題 Long-awaited treatment for hepatitis C virus decompensated cirrhosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-01538-6	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yosuke Osawa, Ekumi Kojika, Koji Nishikawa, Masamichi Kimura, Shigenori Osakaya, Hiromi Miyauchi, Tatsuya Kanto, Yutaka Kawakami, Kiminori Kimura	4. 巻 10
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) blockade attenuates metastatic colon cancer growth in cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/ $\beta$ -catenin inhibitor-treated livers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3013-3026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26892	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kobayashi Sayaka, Saio Masanao, Fukuda Toshio, Kimura Kiminori, Hirato Junko, Oyama Tetsunari	4. 巻 41
2. 論文標題 Image analysis of the nuclear characteristics of emerin protein and the correlation with nuclear grooves and intranuclear cytoplasmic inclusions in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 133-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6848	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Nishikawa Koji, Osawa Yosuke, Kimura Kiminori	4. 巻 19
2. 論文標題 Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling as a Potential Target for the Treatment of Liver Cirrhosis Using Antifibrotic Drugs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3103 ~ 3103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19103103	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Osawa Yosuke, Kojika Ekumi, Hayashi Yukiko, Kimura Masamichi, Nishikawa Koji, Yoshio Sachiyo, Doi Hiroyoshi, Kanto Tatsuya, Kimura Kiminori	4. 巻 2
2. 論文標題 Tumor necrosis factor mediated hepatocyte apoptosis stimulates fibrosis in the steatotic liver in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 407 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1158	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Kimura Masamichi, Nishikawa Koji, Sakamaki Hisashi, Mizokami Masashi, Kimura Kiminori	4. 巻 48
2. 論文標題 Reduced therapeutic effect of antiviral drugs in patients with hepatitis B virus reactivation after hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 469 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13044	査読の有無 無
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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

#### 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
---------	---------