

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19470

研究課題名（和文）分泌経路を含むマルチステップを標的とした核酸医薬による肝線維化治療

研究課題名（英文）Liver fibrosis treatment with nucleic acid medicine targeting multi-step including secretory pathway

研究代表者

齋藤 康太（Saito, Kota）

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60549632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、従来のシャペロンに加え分泌経路関連因子や転写因子を標的とした核酸を組み合わせた新規核酸医薬を開発することを本研究の目的とした。このために、siRNAに替わり、AAVウイルスを用いたshRNAによる標的因子の発現抑制の系の構築を試みたが、ウイルスのタイターを十分に上げることができず、代わりにsiRNAをもちいたHTVi法について今後検討していくことにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化はアルコール、肥満等の生活習慣病的要因により引き起こされ、肝硬変・肝癌へと進行するが、根本的な治療法は確立していない。肝線維化を直接抑制する薬剤、特に早期から線維化の進展を予防する、あるいは肝硬変に対して繊維の蓄積を減少させ、肝癌の発症抑止に寄与する薬剤の開発が強く望まれている。研究代表者は、分泌経路に着目することで、肝線維化の初期段階と進行段階のそれぞれにおける肝線維化抑制の標的を新たに見出している。本研究を継続することで、肝線維化抑制につながる新たな治療法の開発へとつながることが期待される。

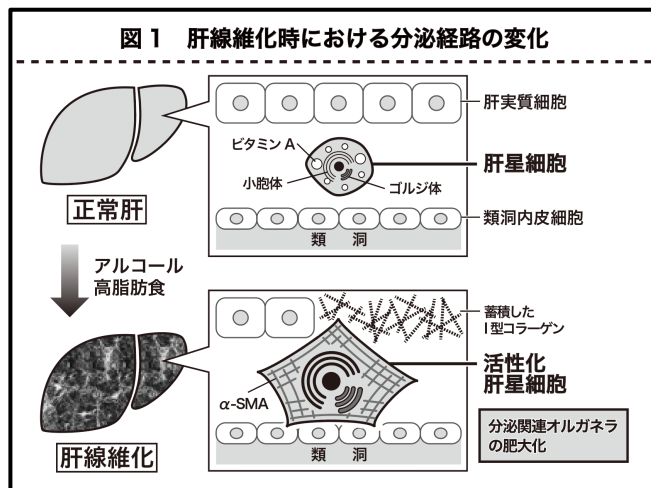
研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop siRNAs for efficiently inhibiting liver fibrosis in mice. For this purpose, we combined siRNAs targeting for chaperones with other novel secretory factors. In addition, we attempted to construct a system to inhibit the expression of target factors by shRNA using the AAV virus instead of siRNA, but were unable to sufficiently increase the viral titer, and decided to investigate the HTVi method using siRNA instead.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分泌 肝線維化 コラーゲン COPII siRNA

1. 研究開始当初の背景

肝線維化はアルコール、肥満等の生活習慣病的要因により引き起こされ、肝硬変・肝癌へと進行するが、根本的な治療法は確立していない。ウイルス性慢性肝炎に対する治療薬の開発により、今後はアルコール性および非アルコール性脂肪肝炎が慢性肝疾患の主因となることが予想される。一方で、抗ウイルス薬の投与によって進行していた肝線維化に改善が見られることから、**肝線維化の可逆性**が明らかにされてきた。よって**肝線維化を直接抑制する薬剤**、特に早期から線維化の進展を予防する、あるいは肝硬変に対して繊維の蓄積を減少させ、肝癌の発症抑止に寄与する薬剤の開発が強く望まれている (図 1)。



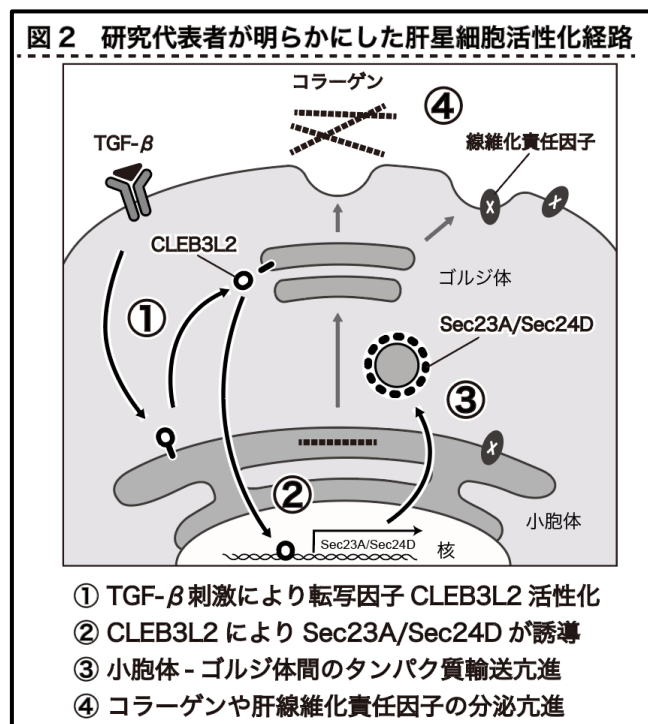
肝線維化において肝星細胞は重要である。肝星細胞は、通常はビタミンA貯蔵細胞であるが、炎症性サイトカインによって活性化し筋繊維芽細胞様に分化するとI型コラーゲンを大量に分泌する。これが線維化の主要な要因となる (図 1)。以前から、細胞内の分泌を司る小器官である小胞体やゴルジ体が、肝星細胞の活性化の過程で肥大化することは知られていたが、**肝星細胞の分泌経路の変化に着目した研究はほとんど行なわれていなかった。**

さらに研究代表者は、活性化した肝星細胞が転写因子 CREB3L2 依存的に小胞体形成因子である Sec23A/Sec24D を特異的に発現上昇させることを見出した (図 2)。この発現上昇は、小胞体からゴルジ体への輸送を亢進し、コラーゲンとは異なる未同定の肝線維化責任因子を輸送することで、**肝星細胞活性化の初期段階に関与することを見出した (\*Sci Rep 2017) (図 2)。**また、この過程において Sec23A/Sec24D の発現を抑制することで、I型コラーゲンの分泌のみならず、肝線維化マーカーの発現を抑制できることを明らかにしている。

このように研究代表者は分泌経路に着目することで、肝線維化の初期段階と進行段階のそれぞれにおける肝線維化抑制の標的を新たに見出している。

2019年から2021年までの挑戦的研究(萌芽)において研究代表者らは、マウス由来 NIH3T3 細胞を用いた siRNA オリゴ配列の検討から、Sec23A, Sec24D, HSP47 を効率的に発現抑制できる siRNA オリゴを同定した。さらに、High Fat Diet 投与による肝線維化モデルマウスを作成し、継時的に肝組織切片を作製し、alpha-SMA の上昇を確認している。

さらに種々の小胞体輸送関連因子に対する組織染色の条件検討のため、研究代表者が先に作製した Sec23A ラットモノクローナル抗体、Sec16 ウサギポリクローナル抗体、TANG01 ウサギポリクローナル抗体、Sec13 ウサギポリクローナル抗体に対して肝線維化病理組織の染色に適応する



ための条件検討を行なった。その結果、いずれの抗体も組織染色可能であることが明らかになった。さらに、線維化組織においては Sec23A 及び Sec13 の発現量が増加しており、TANG01 及び Sec16 の発現量に変化は認められなかった。

## 2. 研究の目的

これらの準備状況をふまえて、研究代表者らは、1) **従来のシャペロンに加え分泌経路関連因子や転写因子を標的とした核酸を組み合わせた新規核酸医薬を開発することを本研究の目的とした。**これにより様々な段階において線維化に寄与する因子群を包括的に発現抑制することで線維化抑制効果の増強を図ることが期待される。一方で、個々の siRNA は投与量を減少させることが可能となり、オフターゲットによる副作用低減に繋がると考えられた。さらに、2) **分泌経路によって活性化される肝線維化責任因子を同定し、新規標的とすることも本研究の目的とした。**

## 3. 研究の方法

### 1) AAV ウイルスを用いた shRNA 発現抑制系の確立

AAV ウイルスを用いて shRNA による発現抑制を行うため、まずは標的配列を組み込んだ shRNA を作成した。さらに、EGFP を発現する AAV ベクターを作成した。これを Helper ベクターとともに HEK2923T 細胞にトランスフェクションし、AAV ウイルスの産生を行い、つづいてマウスへの感染をおこなった。

### 2) マウス尾静脈からのハイドロダイナミクス法の検討

マウス尾静脈から核酸を含む溶液をハイドロダイナミクス法により肝へ導入した。GFP プラスミドを導入した際には、肝への GFP の到達を抗 GFP 抗体を用いた免疫染色によって検証した。

## 4. 研究成果

### 1) AAV ウイルスを用いた shRNA 発現抑制系の確立

これまで siRNA を用いてマウスへの投与を検討してきたが、siRNA は高価なため、さまざまな条件検討に適さない。そこで AAV ウイルスを用いて、shRNA による発現抑制系を構築することを試みた。すでにマウス由来細胞に対して効果のあった siRNA 配列を参考にして shRNA を設計し、AAV ウイルスを作成した。EGFP をコントロールとしてマウスに感染させたが、肝への感染効率があまり高くなく、その後ウイルスタイトーの上昇をさまざま試みたが、効率的な感染が難しく、AAV ウイルスを用いた shRNA 発現抑制系の構築を断念せざるを得なかった。

### 2) マウス尾静脈からのハイドロダイナミクス法の検討

2019 年から 2021 年までの挑戦的研究(萌芽)においてハイドロダイナミクス法によって GFP プラスミドを投与し、肝への GFP 発現を確認していた。この方法を応用して、siRNA を発現させるべく、ハイドロダイナミクス法による肝への導入効率を向上するための条件検討を行なった。今後、ハイドロダイナミクス法により siRNA を導入し、まずは発現抑制が可能か検討したのち、肝線維化モデルマウスに対し siRNA を導入後、線維化抑制効果を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 前田 深春、齋藤 康太	4. 巻 48
2. 論文標題 細胞分裂期における分泌停止メカニズムの解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 秋田医学	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20569/00005734	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 Saegusa Keiko, Matsunaga Kohichi, Maeda Miharu, Saito Kota, Izumi Tetsuro, Sato Ken	4. 巻 5
2. 論文標題 Cargo receptor Surf4 regulates endoplasmic reticulum export of proinsulin in pancreatic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03417-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 小胞体上の分泌ゾーンERESの局在決定機構
3. 学会等名 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 小胞体上の分泌ゾーンERESの局在決定機構
3. 学会等名 新学術領域研究「オルガネラ・ゾーン」班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞分裂期のER exit siteの崩壊と再形成はTANGO1のリン酸化状態により制御される
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期依存的なTANGO1のリン酸化による分泌制御機
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第87回 例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 Sec16のリン酸化による小胞体出芽部位ERESの制御機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第88回例会・シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 小胞体出芽部位ERESの形成制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第19回 生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 Sec16のリン酸化による小胞体出芽部位ERESの形成制御機構
3. 学会等名 第73回 薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 G. M. Cooper、須藤 和夫、堅田 利明、榎森 康文、足立 博之、富重 道雄、齋藤 康太	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 568
3. 書名 クーバー分子細胞生物学 第8版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://www.med.aki ta-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza/yakuri.html">https://www.med.aki ta-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza/yakuri.html</a>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織						
<table border="1"> <thead> <tr> <th>氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)</th> <th>所属研究機関・部局・職 (機関番号)</th> <th>備考</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	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			
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
---------	---------