

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790666

研究課題名（和文） 星細胞を標的としたマイクロ RNA の強制発現による線維化治療法の開発

研究課題名（英文） Development of liver fibrosis therapy targeting hepatic stellate cells by microRNA

研究代表者

小川 智弘 (OGAWA TOMOHIRO)

近畿大学・工学部・助教

研究者番号：70448752

研究成果の概要（和文）：本研究により星細胞の活性化やコラーゲン産生に重要なマイクロ RNA が数種同定された。その中でも *collagen 1A1* に結合する可能性の高い miR-29b に着目した。このマイクロ RNA を星細胞で強制発現させると、I 型コラーゲンの発現が抑制された。また、miR-29b は、マウス星細胞の活性化に伴い発現が低下することを明らかにした。マウス星細胞に miR-29b を強制発現させると、I 型コラーゲンの発現が抑制されるだけでなく、星細胞の活性化まで抑えられることが判明した。このため、miR-29b の標的遺伝子は *collagen 1A1* だけでなく、星細胞の活性化に関与する遺伝子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Some microRNAs important for activation and collagen production of stellate cells were identified. Among them, we showed that miR-29b is one of regulators of type I collagen mRNA and protein expression. Moreover, miR-29b downregulated in mouse activated stellate cells *in vitro*. Overexpression of miR-29b in mouse stellate cells not only decreased type I collagen mRNA and protein expression, but also inhibited stellate cell activation. We suggested that targeted genes of miR-29b were not only collagen 1A1 but stellate cell activation-related genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：星細胞・マイクロ RNA・肝臓・コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA はこれまでその機能がほとんど不明な 20-25 塩基のノンコーディング RNA である。マイクロ RNA に関する研究はここ数年、癌研究やウイルス学の分野で急速に進展しており、肝臓病研究においてはウイルス肝炎などの新たな治療法の標的分子として注

目されていた。そこで、我々はマイクロ RNA による肝線維化治療法の開発を目的に研究を進めた。肝線維化治療の標的となる細胞は主に星細胞であり、マイクロ RNA を星細胞で強制発現することにより星細胞の増殖およびコラーゲンの産生を抑制することで線維化抑制効果を期待した。

2. 研究の目的

我々は星細胞におけるマイクロ RNA の発現が遺伝子およびタンパク質発現制御に重要であり、星細胞の活性化や増殖に影響を与えると考えた。そこで、ヒト星細胞株 (LX-2) を用いて、TGF β および IFN 添加による星細胞の活性化およびコラーゲン産生、増殖に関与すると考えられるマイクロ RNA を同定し、その標的遺伝子を明らかにした。そして、マイクロ RNA を標的とした肝線維化治療法の開発を目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

ヒト肝星細胞株 LX-2 細胞に TGF β および IFN を培地中にそれぞれ添加した際、発現が変動するマイクロ RNA を調べた。マイクロ RNA の発現は、アプライドバイオシステム社の TaqMan MicroRNA Assay により調べた。(1) コラーゲンの発現に関与するマイクロ RNA の同定: マイクロ RNA のデータベース TargetScan を用いて、ヒト *collagen 1A1* の 3' UTR に結合すると想定されるマイクロ RNA (miR-143, 218, 29b) が、ヒト星細胞株 LX-2 に TGF β および IFN を培地中にそれぞれ添加した際、発現が変化するか調べた。次に、これらのマイクロ RNA が *collagen1A1* や *SP1* の 3' UTR に結合することが予想されたため、pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) を用いて、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 末端側にマイクロ RNA 標的サイトを導入し、miRNA precursor (Ambion) との結合実験を行なった。また、miRNA precursor を LX-2 細胞に導入することで、星細胞のコラーゲンの発現に変化が見られるかを Real-time PCR および Western blot により調べた。(2) 星細胞の増殖に関与するマイクロ RNA の同定: IFN の作用によりヒト星細胞株 LX-2 の増殖が抑制された。同条件下で発現の変動が見られるマイクロ RNA (miR-195) を同定した。このマイクロ RNA が *cyclin E1* の 3' UTR に結合することが予想されたため、pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector を用いて、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' 末端側にマイクロ RNA 標的サイトを導入し、miRNA precursor との結合実験を行なった。また、miRNA precursor を LX-2 細胞に導入することで、星細胞の増殖に変化が見られるかを WST-1 により解析した。また、細胞の増殖に関連する遺伝子およびタンパク質の発現が変化するかを Real-time PCR および Western blot により調べた。(3) (1) と (2) の結果をもとに、マウスの肝臓から分離・培養した星細胞の miR-29b と miR-195 の発現を調べた。マイクロ RNA のヒト星細胞への導入実験と同様の手法を用いて、miRNA precursor をマウス

星細胞に導入させることで、星細胞の活性化およびコラーゲン産生、増殖に変化が見られるかを調べた。

4. 研究成果

(1) ヒト星細胞に TGF β を添加すると I 型コラーゲンの mRNA の発現が増加し、IFN を同時添加することによりその発現は有意に低下した。同条件下で、miR-143 の発現は TGF β を添加すると濃度依存的に増加した (Fig. 1)。一方で、miR-218 の発現は TGF β 添加により減少した。また、IFN をそれぞれ単独添加すると miR-143 の発現は減少し、miR-29b の発現は増加した。マイクロ RNA の結合実験では、miR-218 と miR-29b が、*collagen 1A1* と *SP1* の 3' UTR に結合することがルシフェラーゼ活性の有意な低下により確認された。miR-218 と miR-29b の precursor を細胞導入した結果、miR-29b が I 型コラーゲンの発現を遺伝子およびタンパク質レベルで有意に抑制した (Fig. 2)。miR-218 は I 型コラーゲンの発現を遺伝子レベルでは抑制しないが、タンパク質の翻訳を抑制することがわかった。また、miR-218 と miR-29b が *SP1* の翻訳を抑制している可能性も示唆された。

Fig. 1

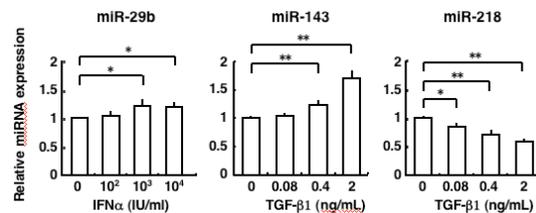
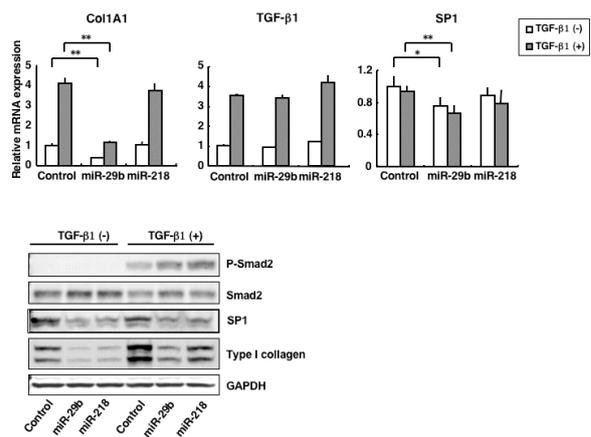


Fig. 2



(2) IFN を星細胞にそれぞれ単独添加すると、細胞増殖が有意に抑制されることがわかった。同条件下で、IFN 添加により発現が変動するマイクロ RNA として、miR-195 の発現が濃度依存的に減少することがわかった (Fig. 3)。このマイクロ RNA は、TargetScan により

cyclin E1 の 3' UTR に結合すると予想された。マイクロ RNA の結合実験では、miR-195 は *cyclin E1* の 3' UTR に結合することがルシフェラーゼ活性の有意な低下により立証された。また、miR-195 の precursor を細胞導入した結果、miR-195 は *cyclin E* の発現を遺伝子およびタンパク質レベルで有意に抑制し、細胞の増殖も抑制することがわかった (Fig. 4)。

Fig. 3

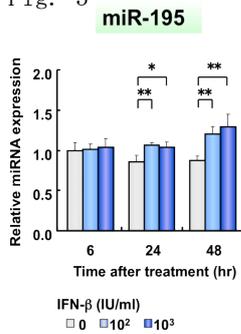
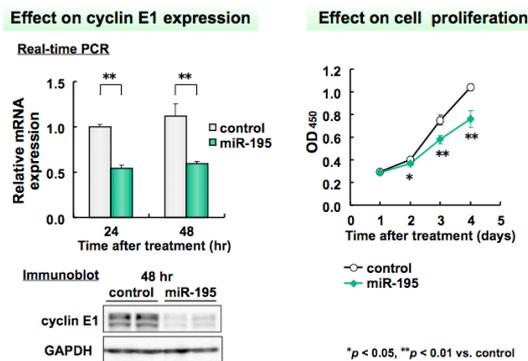


Fig. 4



(3) 培養ヒト星細胞に TGF β や IFN 添加によって発現に変動の見られるマイクロ RNA のうち、*collagen 1A1* の 3' UTR に結合する可能性の高い miR-29b に着目した。miR-29b はマウス肝星細胞において、星細胞の活性化に伴い発現が低下するマイクロ RNA であることがわかった (Fig. 5)。ヒト星細胞と同様に、マウス活性化星細胞に miR-29b の precursor を導入した結果、I 型コラーゲンの発現が遺伝子およびタンパク質レベルで抑制された (Fig. 6)。このことから、星細胞に miR-29b を強制発現することでコラーゲンの発現を抑制することができ、肝線維化抑制効果が期待された。また、星細胞の I 型コラーゲンの発現だけでなく、星細胞の活性化まで抑えられることが判明した。このため、miR-29b の標的遺伝子は *collagen 1A1* だけでなく、星細胞の活性化に関与する遺伝子である可能性が示唆された。

Fig. 5

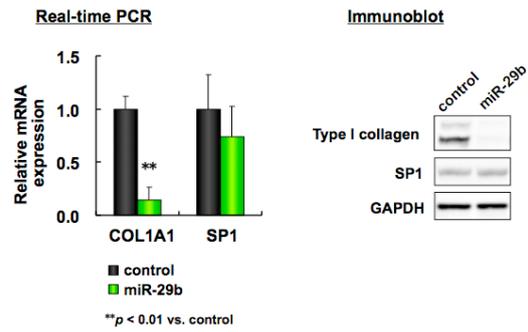
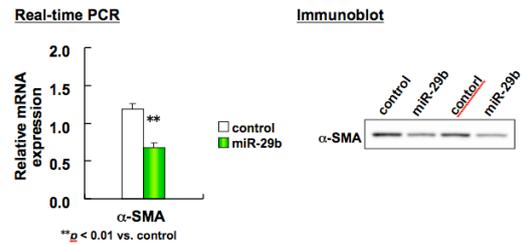


Fig. 6



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Ogawa T, Enomoto M, Fujii H 他 4 名, microRNA-221/222 up-regulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. Gut 査読有 2012, in press.
2. Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K 他 2 名, Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2011;412(1):74-79.
3. Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M 他 3 名, Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. J Cell Physiol. 査読有 2011;226(10):2535-2542.
4. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y 他 3 名, Suppression of type I collagen

production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2010;391(1):316-321.

[学会発表] (14 件)

1. 小川智弘、榎本大、藤井英樹、他 3 名・マイクロ RNA の肝線維化診断マーカーとしての有用性とその機能・Kansai Liver Club 2012・2012 年 3 月 3 日・太閤園 (大阪)
2. 飯塚昌司、小川智弘、榎本大、他 3 名・慢性肝疾患における肝線維化バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の有用性・第 23 回肝類洞壁細胞研究会学術集会・2011 年 12 月 17 日・東京ガーデンパレス (東京)
3. 榎本大、小川智弘、河田則文・慢性肝疾患における肝線維化バイオマーカーとしてのマイクロ RNA の有用性・第 39 回日本肝臓学会西部会・2011 年 12 月 9 日・岡山コンベンションセンター (岡山)
4. 榎本大、小川智弘、飯塚昌司、他 5 名・Indication of the Activation of Stellate Cells and the Progression of Liver Fibrosis by MicroRNA-222・62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases・2011 年 11 月 6 日・Moscone West Convention Center (アメリカ)
5. 飯塚昌司、榎本大、小川智弘、他 6 名・慢性肝疾患における肝線維化バイオマーカーとしての miR-222 の有用性・第 15 回日本肝臓学会大会・2011 年 10 月 20 日・マリンメッセ福岡 (福岡)
6. 飯塚昌司、小川智弘、関谷由美子、他 4 名・肝線維化と星細胞活性化に關与するマイクロ RNA の解析・第 15 回日本肝臓学会大会・2011 年 10 月 20 日・マリンメッセ福岡 (福岡)
7. 飯塚昌司、榎本大、吉里勝利、小川智弘、他 2 名・肝線維化と星細胞活性化に關与するマイクロ RNA の解析・第 18 回肝細胞研究会・2011 年 6 月 24 日・東京ガーデンパレス (東京)
8. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、他 3 名・miR-195 の肝星細胞増殖における役割についての検討・第 47 回日本肝臓学会総会・2011 年 6 月 3 日・ホテル グランパシフィック LE DAIBA (東京)
9. 小川智弘、榎本大、河田則文・C 型慢性肝炎患者における肝線維化診断マーカーとしてのマイクロ RNA の有用性・第 97 回日本消化器病学会総会・2011 年 5 月 13 日・京王プラザホテル (東京)
10. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、他 3 名・Type I interferon inhibits hepatic stellate cell proliferation via downregulation of cyclin E1 by microRNA-195・15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid・2010 年 8 月 31 日・Hilton Hotel Pasadena (アメリカ)
11. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、他 3 名・星細胞活性化に關与するマイクロ RNA についての検討・第 6 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム・2010 年 6 月 4 日・ホテルグランヴィア広島 (広島)
12. 飯塚昌司、小川智弘、関谷由美子、他 3 名・マイクロ RNA による肝星細胞の I 型コラーゲン発現制御・第 46 回日本肝臓学会総会・2010 年 5 月 27 日・山形国際ホテル (山形)
13. 関谷由美子、小川智弘、飯塚昌司、他 3 名・I 型インターフェロンのマイクロ RNA 発現調節を介した肝星細胞増殖抑制作用・第 46 回日本肝臓学会総会・2010 年 5 月 27 日・山形国際ホテル (山形)

14. 小川智弘、飯塚昌司、関谷由美子、他 3
名・MICRORNA-29B SUPPRESSES TYPE I
COLLAGEN AND SP1 EXPRESSION IN
INTERFERON-TREATED STELLATE CELLS・45th
annual meeting of the European
Association for the Study of the Liver・
2010年4月17日・ウィーン（オーストリア）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：肝線維症の存在及び／又は肝線維症の重症度の判定方法、判定マーカー、判定用キット、肝線維症の治療の効果予測方法、効果予測マーカー、並びに効果予測用キット

発明者：河田則文、榎本大、小川智弘

権利者：大阪市立大学

種類：特許権

番号：特願 2010-281254

出願年月日：平成 22 年 12 月 17 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 智弘 (OGAWA TOMOHIRO)

近畿大学・工学部・助教

研究者番号：70448752

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：