

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860312

研究課題名(和文)新規肝硬変治療薬候補による脱肝線維化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of anti-fibrotic effect by a liver cirrhosis treatment drug candidate

研究代表者

宗片 優子(徳永優子)(MUNEKATA (TOKUNAGA), Yuko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：80555011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はHCV誘発性慢性肝炎モデルマウスを用いて、Wnt/ β -cateninシグナル伝達阻害剤が新規肝硬変治療薬候補となる可能性を見出した。本研究では、コラーゲン線維の合成と分解を担う分子への作用に着目し、脱線維化機構を解析した。肝臓中mRNA発現解析の結果、阻害剤はコラーゲン線維合成系を担う分子の発現には影響を与えなかった。一方、コラーゲン分解系を担うMMP-8のmRNA発現上昇が認められ、蛋白質レベルと酵素活性の増加も示された。阻害剤により肝臓内に誘導されるマクロファージ・好中球がMMP-8の産生細胞であることが明らかとなり、これらの細胞群が脱線維化作用を担うと考えた。

研究成果の概要(英文)：Chronic hepatitis C virus (HCV) infection is one of the major causes of serious liver diseases, including liver cirrhosis. There are no anti-fibrotic drugs with efficacy against liver cirrhosis. Wnt/ β -catenin signaling has been implicated in the pathogenesis of a variety of tissue fibrosis. We showed that ICG-001 derivative, a selective inhibitor of β -catenin/CBP interaction, exhibits the anti-fibrotic activity on HCV-induced fibrosis. In the present study, we investigated the molecular mechanism of the compound using HCV transgenic mouse model. Administration of ICG-001 derivative for 6 weeks led to increased levels of matrix metalloproteinase (MMP)-8, which was shown with mRNA and protein expression, enzymatic activities. The induced intrahepatic neutrophils and macrophages/monocytes were identified as the source of MMP-8. In conclusion, we hypothesize that induction of fibrolytic cells expressing MMP-8 contribute to the remission of fibrosis by ICG-001 derivative.

研究分野：ウイルス学、分子生物学

キーワード：新規肝硬変治療薬候補 脱線維化作用 コラーゲン線維分解系 マクロファージ 好中球 マトリック
スメタロプロテアーゼ 1細胞トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は容易に持続感染が成立し、持続感染(慢性肝炎)により誘導された肝線維症から肝硬変を経て肝細胞癌へと進展する。本邦には20万人ものC型肝炎患者がいると推定され、国内肝硬変患者数の約70%を占める。高度な肝線維症である肝硬変の治療は難しく、発症原因であるウイルス持続感染の根本治療を目的とした抗ウイルス剤の開発が多数行われてきた。抗ウイルス剤の効果が十分でない場合や肝硬変の程度により適用外である場合があり、肝線維症を含めた肝硬変を改善する薬剤の開発が求められている。そのためには、免疫系が複雑に寄与する持続炎症による肝線維症から離脱できる方法を見出すことが重要である。研究代表者は、免疫系が正常でHCV持続感染と同様に肝線維症と肝細胞癌を発症するHCV誘発性慢性肝炎モデルマウス(以下、HCV-Tgマウス)を作出した。本モデルの樹立により、C型肝炎肝硬変治療薬の探索が可能となった。Wnt/ β -cateninシグナル伝達経路は、種々の組織の線維化に寄与することが知られている。研究代表者は本経路が肝線維症においても重要な役割を担うと考えて、Wnt/ β -cateninシグナル伝達阻害剤に着目した。HCV慢性肝炎モデルマウス(肝線維症を発症)を用いて、選択的に β -catenin/CBPの相互作用を阻害するWnt/ β -cateninシグナル伝達阻害剤ICG-001誘導体のHCV誘発性肝線維症に対する脱線維化作用を解析し、新規肝硬変治療薬候補となる可能性を見出した。

2. 研究の目的

C型肝炎患者においては、コラーゲン線維の合成と分解に不均衡が生じている。合成系の亢進は肝星細胞の活性化によるものとされ、コラーゲン分解系はMMP(マトリックスメタロプロテアーゼ)やその阻害分子(TIMPs)の量的不均衡により阻害されている。Wnt/ β -cateninシグナル伝達阻害剤ICG-001誘導体は、コラーゲン線維の合成と分解に関与する遺伝子の発現制御を介してコラーゲン線維の消失を惹起する可能性を考えた。ICG-001誘導体を投与したHCV-Tgマウスでは肝臓内の単球とマクロファージおよび好中球が増加することを見出しており、これら免疫担当細胞も脱線維化機構に寄与していることが期待される。そこで本研究では、コラーゲン線維の合成と分解を担う分子への作用に着目し、新規肝硬変治療薬候補ICG-001誘導体による脱肝線維化機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ICG-001誘導体の脱線維化機序の解析には、化合物投与により脱線維化したHCV-Tgマウ

スの肝臓サンプルを用いた。

1) ICG-001 誘導体のコラーゲン線維合成系への作用解析

ICG-001誘導体のコラーゲン合成および線維合成に対する遺伝子レベルでの制御を解析する目的で、肝臓内mRNA発現解析を実施した。変化の認められた分子については、ウェスタンブロッティングによる蛋白質レベルでの解析や免疫組織学的解析による産生細胞の同定を行った。

2) ICG-001 誘導体のコラーゲン線維分解系への作用解析

コラーゲン線維の分解に寄与するコラゲナーゼ(MMP-2, 8, 9, 12, 13)やその阻害分子(TIMPs)を中心に遺伝子発現変化を肝臓内mRNA発現解析により定量的に解析した。発現変化が検出された分子については、ウェスタンブロッティングやELISA法により蛋白質レベルの比較解析および酵素活性を測定した。また、免疫組織学的手法により産生細胞の同定を行った。

AAV8を用いて見出した分子をHCV-Tgマウスに導入して脱線維化作用を解析する予定だったが、3)の細胞群誘導機序解析に時間と経費を集中させたため実施しなかった。

3) ICG-001 誘導体により増加する単球・マクロファージと好中球の機能および作用解析

ICG-001誘導体投与により増加する単球・マクロファージおよび好中球の機能について、1,2で絞り込んだ分子の産生をフローサイトメトリーで解析した。これら細胞群の誘導機構を解明する目的で、肝臓抽出液を用いた多項目解析を行った。本解析では肝臓組織内で変化するケモカイン等を見出すことが出来ず、1細胞トランスクリプトームの手法に切り替えて研究を進めた。

4. 研究成果

コラーゲン線維の合成および分解に関与する分子群の肝臓内mRNA発現解析の結果、ICG-001誘導体はコラーゲン合成や架橋を担う分子(α -SMA, LOX2など)の発現には影響を与えないことが明らかとなった。一方、コラーゲン分解系を担う分子群の肝臓内mRNA発現解析により、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-8)の発現がICG-001誘導体投与により誘導されることを見出した(図1)。MMP-8の発現上昇は、蛋白質レベルと酵素活性でも示された。また、主な産生細胞として知られる好中球やマクロファージ数は化合物投与により増加した。免疫組織学的手法により、これらの細胞群が主な

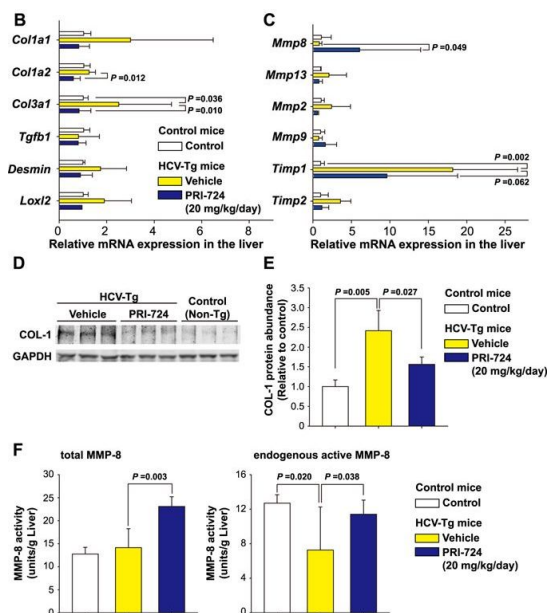


図 1. ICG-001 誘導体投与により発現が変化する分子の探索

(B, C) 肝臓内 mRNA 発現、(D, E) コラーゲン蛋白質、(F) MMP-8 の酵素活性

MMP-8 産生細胞であることが明らかとなり、ICG-001 誘導体の脱肝線維化作用に寄与していることが示唆された (図 2)。

肝臓抽出液を用いた多項目解析の結果 ICG-001 誘導体は HCV 遺伝子発現により増加した Interleukin-1 beta (IL-1 beta) を減少させることが明らかとなった。IL-1 beta は慢性肝炎の病態に寄与することが知られており、ICG-001 誘導体はコラーゲン線維の消失のみならず肝臓の慢性炎症に対しても改善作用を示すと考えた。一方で GM-CSF や M-CSF の産生上昇は認められず、肝臓組織内でのマクロファージ増殖は顕著でないことが示唆された。同様の手法でケモカイン産生量比較解析を実施したが、誘導体投与で変化する分子を見出すことが出来なかった。肝臓抽出液を用いた解析ではさらなる作用機序解析は難しいと考え、1 細胞トランスクリプトーム解析を用いて肝臓内リンパ球の個々の細胞の遺伝子発現解析を行った。その結果、ICG-001 誘導体により増加するマクロファージ・好中球を含むクラスターを見出した。線維分解酵素を産生する細胞群はそれらとは異なるクラスターに含まれており、ICG-001 誘導体により増加した上記のクラスターから影響を受けて細胞の性質が変化した可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Tokunaga Y, Osawa Y, Ohtsuki T, Hayashi Y, Yamaji K, Yamane D, Hara M, Munekata K, Tsukiyama-Kohara, K, Hishima T, Kojima S, Kimura K, Kohara M

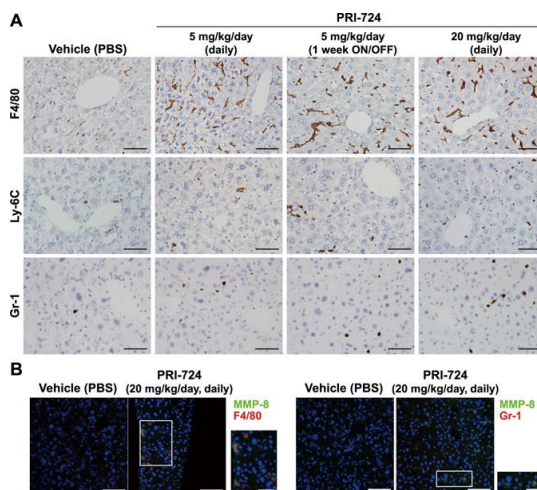


図 2. ICG-001 誘導体投与により増加する細胞群と MMP-8 産生細胞の同定

(A) 肝臓組織での細胞表面マーカーの発現 F4/80 (マクロファージ)、Ly-6C (単球)、Gr-1 (好中球) (B) MMP-8 と F4/80、Gr-1 の共染色像

Selective inhibitor of Wnt/ β -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model. Scientific Reports (2017) 7, 1-11.

査読有

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00282>

-w

[学会発表] (計 4 件)

Tokunaga Y, Kimura K, Kohara M
第 74 回日本癌学会学術総会 (2015 年)、口頭発表

Tokunaga Y, Kimura K, Ohtsuki T, Hayashi Y, Munekata K, Hishima T, Kohara M
第 50 回ヨーロッパ肝臓学会 (2015 年)、ポスター発表

徳永 優子, 木村 公則、大槻 貴博、林 幸子、原 詳子、宗片 圭祐、比島 恒和、小嶋 聡一、小原 道法
第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (2014 年)、口頭発表

Tokunaga Y, Kimura K, Ohtsuki T, Hayashi Y, Hara M, Munekata K, Hishima T, Kouji H, Kojima S, Kohara M
第 21 回国際 HCV 学会 (2014 年)、口頭発表

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

公益財団法人 東京都医学総合研究所
<http://www.igakuken.or.jp/>

5 . 研究組織

(1) 研究代表者

宗片 優子
(MUNEKATA (TOKUNAGA), Yuko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・
ゲノム医科学研究分野・研究員
研究者番号：80555011

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 林 幸子 (HAYASHI, Yukiko)