

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04932

研究課題名(和文) 肝線維化進展におけるマクロファージと肝星細胞間の糖鎖シグナルの分子機能解析

研究課題名(英文) The biological analysis of sugar chain signal between hepatic stellate cells and macrophages in the progression of liver fibrosis.

研究代表者

調 憲 (Shirabe, Ken)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70264025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはWFA-M2BPを肝星細胞が産生することを明らかにした。WFA-M2BPは肝星細胞が産生し、galectin 3を介したマクロファージへのメッセンジャーとしての役割を担っており、肝の線維化の亢進に係っている。われわれはgalectin 3阻害剤による肝線維化の進展の阻止を目指す実験を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We have shown that hepatic stellate cells (HSC) produces M2BPGi and it works as messenger between HSC and macrophage. Therefore, M2BPGi might have important role in progression of liver fibrosis. Galectin 3 inhibitor may stop the linkage between HSC and macrophage in progression of liver fibrosis. We now have plan to examine the effects of galectin 3 inhibitor in live fibrosis animal model.

研究分野：消化器外科

キーワード：WFA-M2BP 肝線維化 galectin 3 マクロファージ

### 1. 研究開始当初の背景

産業総合研究所の成松 久と国立国際医療研究センター肝炎免疫センターの溝上雅史らはC型肝炎患者血清中にWFA-M2BPを見出し、この値が肝炎線維化のサロゲートマーカーとなることを示した。われわれはいち早く、その臨床的な意義を報告した。ところが、その分子機序は不明であり、WFA-M2BPの産生細胞や生理活性も不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ヒト検体を用いてまず、その産生細胞を明らかにし、さらにマクロファージと肝星細胞の分子機能解析を推進し、WFA-M2BP・galectin-3の肝線維化における役割を分子レベルで解明することで、マクロファージ・肝星細胞の線維化における相互関係を明らかにし、肝線維化抑制を治療のターゲットとした革新的な肝線維化治療を開発することを目標とする。

すなわち、マクロファージと肝星細胞の分子機能解析を推進し、WFA-M2BP・galectin-3の肝線維化における役割を分子レベルで解明することを本研究の目標とする。

### 3. 研究の方法

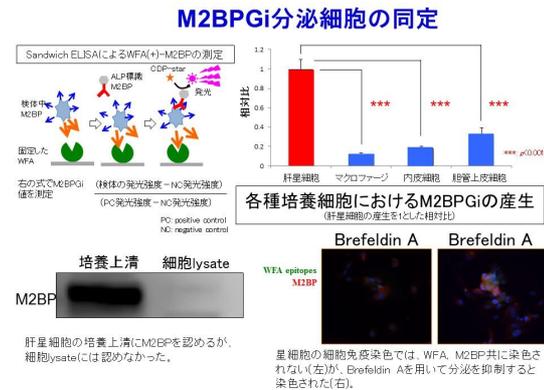
ヒト肝硬変患者の肝組織におけるWFA-M2BPの局在の検討(免疫組織化学染色) 現在、抗WFA、M2BP、CD68、 $\alpha$ -SMA、galactin-3 CD31、CK19、gal-3、CSF1R、CD163抗体を用いた蛍光多重免疫組織化学染色の手法は確立している。

ヒト肝硬変患者の肝組織から単離した肝星細胞によるWFA-M2BPの発現の検討・WFA-M2BPによるマクロファージへの作用の検討：ヒト肝組織からのマクロファージ、肝星細胞などの分離、精製の手技は確立している。これらの細胞の共培養を行うことで生体内のマクロファージ、星細胞の連関を明らかにする。

### 4. 研究成果

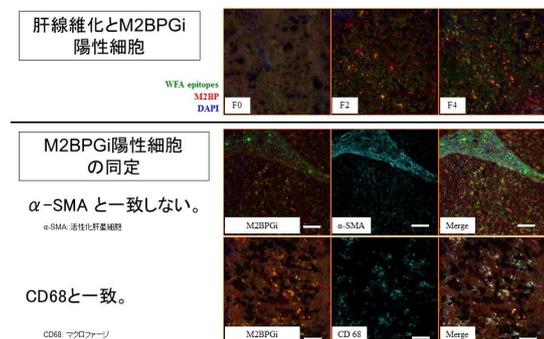
われわれは、肝の新規線維化マーカーであ

るWFA-M2BPを肝星細胞が産生することを明らかにした。肝星細胞は産生するとただちに分泌していることも明らかになった。



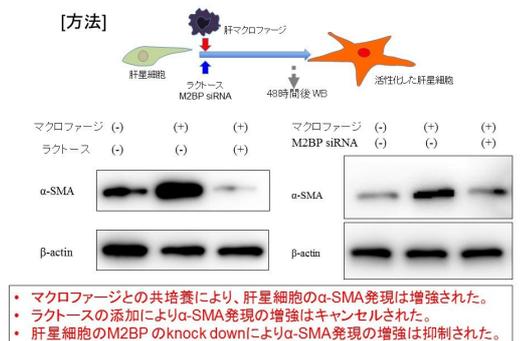
肝硬変(肝移植における摘出肝)においてはCD68陽性細胞と局在が一致していることも見出した。

### 肝組織におけるM2BPGi陽性細胞



さらにgalectin 3の局在と一致しており、生体内ではWFA-M2BPはgalectin 3の陽性Kupffer細胞に存在しているのではないかと推察している。

### 肝マクロファージによる肝星細胞の活性化促進



WFA-M2BPの肝線維化における役割を明らかにする目的で、以下の実験を行った。WFA-M2BPをマクロファージに添加し培養すると、マ

クロファージにおけるgalectin 3の発現が誘導された。肝星細胞とマクロファージを共培養すると肝星細胞の  $\alpha$ -SMAの発現が上昇したが、糖鎖と競合阻害作用のあるラクトースを添加すると発現の増強は阻害された。さらに肝星細胞のM2BP発現をsiRNAで抑制したところ、肝星細胞における  $\alpha$ -SMAの発現は抑制された。このことから、肝星細胞とマクロファージの間に存在する肝星細胞の活性化メカニズムにWFA-M2BPが重要な役割を担っている可能性が明らかになった。

T細胞との連関を確認した。末梢血単核球をWFA-M2BP存在下に培養したところ、インターフェロンの産生亢進が認められた。このインターフェロンの産生はT細胞に依存していることも明らかにした。さらに肝星細胞にインターフェロンを添加して培養したところ、インターフェロン濃度依存性にWFA-M2BPの分泌は増加した。

これらのIn Vitroの実験から、WFA-M2BPは肝星細胞が産生し、galectin 3を介したマクロファージやT細胞の間のメッセンジャーとしての役割を担っており、肝の線維化の亢進の分子機序の一端が明らかになったと考えている。

これらの結果より、WFA-M2BPは肝星細胞が産生し、マクロファージへの作用を経て肝線維化の亢進に重要な役割を果たしている可能性がある。

現在、市川 聡（北海道大学薬学研究院創薬科学研究教育センター教授）が開発した新規 galectin 3 阻害剤を入手し、その効果について確認しえたところである。in vivo 研究に向けて準備中である。

#### 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 2 件) 全て査読有り

1. Bekki Y, Yoshizumi T, Shimoda S, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Kuno A,

Narimatsu H, Shirabe K, Maehara Y. Hepatic stellate cells secreting WFA+ -M2BP: Its role in biological interactions with Kupffer cells. J Gastroenterol Hepatol. 2017 Jul;32(7):1387-1393. doi: 10.1111/jgh.13708.

2. Shirabe K, Bekki Y, Gantumur D, Araki K, Ishii N, Kuno A, Narimatsu H, Mizokami M. Mac-2 binding protein glycan isomer (**M2BPGI**) is a new serum biomarker for assessing liver fibrosis: more than a biomarker of liver fibrosis. J Gastroenterol. 2018 Jan 9. doi: 10.1007/s00535-017-1425-z. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 別城悠樹、調 憲、栗原 健、吉田佳弘、今井大祐、松本佳大、木村光一、武石一樹、伊藤心二、山下洋市、池上 徹、吉住朋晴、川中博文、前原喜彦. 血清中の糖鎖タンパク WFA(+)-M2BPの発現の分子機序解明と肝線維化マーカーとしての意義. 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年04月16日～2015年04月18日名古屋国際会議場.

2. Yuki Bekki, Ken Shirabe, Koichi Kimura, Shinji Itoh, Norifumi Harimoto, Yoshihiko Maehara. Macrophages exacerbates liver fibrosis via WFA(+)-M2BP secreted by hepatic stellate cells. 第70回日本消化器外科学会総会 2015年07月15日～2015年07月17日アクトシティ浜松.

3. Yuki Bekki, Ken Shirabe, Shinji Shimoda, Shinji Itoh, Toru Ikegami, Hideaki Uchiyama, Tomoharu Yoshizumi, Yoshihiko Maehara WFA(+)-M2BP interacts with liver macrophages which activates hepatic stellate cells. APASL 2016 in Tokyo (国際学会) 2016年02月20日～2016年02月24日. グランドプリンス新高輪.

4. 別城悠樹、調 憲、坂田一仁、下川雅弘、吉田佳弘、王 歆林、木村光一、伊藤心二、播本憲史、池上 徹、内山秀昭、吉住朋晴、前原喜彦. 新たな肝星細胞のバイオマーカーWFA+ -M2BPの肝線維化進展における役割の解明. 第116回日本外科学会定期学術集会.

2016年04月14日～2016年04月16日.大阪国際  
会議場.

5. 調 憲、別城悠樹、戸島剛男、吉  
屋匠平、伊藤心二、池上 徹、吉住朋晴、間  
野洋平、考藤達哉、溝上雅史、久野 敦、成  
松 久、前原喜彦. 肝星細胞の新しいバイオ  
マーカーWFA-M2BPの肝臓外科における意義と  
展望. 第116回日本外科学会定期学術集会.

2016年04月14日～2016年04月16日.大阪国際  
会議場.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

調 憲 (SHIRABE, Ken)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70264025

### (2) 研究分担者

山下 洋市 (YAMASHITA Youichi)  
熊本大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号：00404070

川中 博文 (KAWANAKA Hirofumi)  
独立行政法人国立病院機構別府医療セン  
ター・臨床研究部・臨床研究部長

研究者番号：10363334

下田 慎治 (SHIMODA Shinji)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：30279319

成松 久 (NARIMATSU Hisashi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・そ  
の他部局等・研究員  
研究者番号：40129581

久野 敦 (KUNO Atsushi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・そ  
の他部局等・研究員  
研究者番号：50302287

池田 哲夫 (IKEDA Tetsuo)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：60585701

前原 喜彦 (MAEHARA Yoshishiko)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号：80165662

吉住 朋晴 (YOSHIZIMI Tomoharu)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80363373

池上 徹 (IKEGAMI Tohru)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：80432938

佐藤 隆 (SATO Takashi)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・そ  
の他部局等・研究員  
研究者番号：90371046