

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19530

研究課題名(和文) 肝硬変の組織学的進展を抑制する糖鎖修飾構造を標的とした薬剤開発系の構築

研究課題名(英文) Development of drugs targeting liver fibrosis by modulation of protein/lipid glycosylation

研究代表者

坂本 直哉 (Sakamoto, Naoya)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10334418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝線維化を標的とした新規治療標的を探索するため、肝硬変症例の肝組織および血清、さらに培養肝星細胞の表面蛋白の複合糖鎖構造の変化とその関連機構の解析を目的として遂行し、下記の結果を得た。1. 培養肝星細胞由来および初代ヒト肝星細胞を用いて、LPS刺激、TGF- β 添加培養などにより活性化状態構築のための条件設定を行った。2. 培養肝星細胞活性化に関連し、4種の分泌型micro RNAの発現が上昇した。当該micro RNAの培養肝星細胞への遺伝子導入により、線維化に関連する SMA、I型コラーゲン、ケモカイン遺伝子の発現増強が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化に関連する患者血清中の複合糖鎖解析とその機能解析から抗体薬等の開発の可能性を見いだした。また、血清分泌型microRNAの網羅的探索、MSC培養液から肝線維化抑制効果を担う蛋白、小分子の探索など、多くの治療標的を同定し、創薬につながる基盤を形成することができた。

今後、同定された候補miRNAの制御遺伝子のpathway解析、さらにanti-miRNAによる発現抑制が星細胞活性化抑制、肝線維化抑制効果をもたらすか否かを検証する。さらに、SILAC法による活性化星細胞のプロテオーム解析および候補蛋白の抽出をおこなう。

研究成果の概要(英文)：In order to search for novel therapeutic targets targeting liver fibrosis, which was previously thought to be an irreversible pathological condition, the complex sugar chain structure of the liver tissue and serum of liver cirrhosis cases, and the surface protein of cultured hepatic stellate cells was investigated. The purpose of this study was to analyze the changes along with the disease stage and their related mechanisms. (1) Using cultured hepatic stellate cell-derived RI-T cell line and primary human hepatic stellate cells, set culture conditions for constructing activated stellate cells by LPS stimulation, TGF- β addition culture, etc. under Kupffer cell co-culture. (2) We found that 4 secretory micro RNAs was overexpressed in relation to the activation of cultured hepatic stellate cells. Gene expression of alpha-SMA, type I collagen, and chemokine genes associated with fibrosis was observed when each micro RNA was introduced into cultured stellate cells.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は、種々の原因により起こる肝細胞の慢性壊死炎症反応により肝線維化、肝機能低下および門脈圧亢進症を来す慢性肝疾患の終末像である。肝硬変は従来不可逆性の病態と考えられていたが、近年肝星細胞活性化、線維化に関わる宿主因子の探索とそれらを標的とした薬物療法の開発が進展している。

タンパク質や脂質に結合している糖鎖構造は、近年“第3の生命鎖”として注目され、疾患病態への関与が報告されている。担者古川はグライコプロッティング法やBEP法をはじめとする定量的でハイスループットな糖鎖解析法を開発しており、細胞の網羅的な複合糖質糖鎖解析を構築し、疾患などに伴う各糖鎖の発現変化や機能解析を幅広く展開している。

2. 研究の目的

本研究で申請者は、肝硬変症例の肝組織および血清、さらに培養肝星細胞の表面蛋白の複合糖鎖の解析を行い、同定された特異修飾糖鎖を非侵襲的診断マーカーとしてのみならず、糖鎖構造に対する抗体、結合小分子を大規模探索し、未だ unmet needs である肝線維化を標的とした新規治療に対する、糖鎖修飾構造を標的とした分子標的治療薬開発の proof of concept 獲得を目的とする。

3. 研究の方法

(1) NASH、ウイルス性肝炎による肝硬変における糖鎖解析を行い、同定された診断マーカー候補分子の疾患特異性について精査を進める。さらに NASH に伴う組織病態の解析のため、高精度プロテオミクス解析 (SILAC 法、後述により肝線維化、脂肪化、肝発癌カスケードに関連する宿主蛋白の探索を行い、新たな標的分子の探索を行う。

(2) 肝星細胞の初代・継代培養株を用いた解析：肝線維化に重要な肝星細胞の初代培養細胞、継代培養株を樹立し、肝線維化制御機構を明らかにするとともに、星細胞活性化を抑制する合成化合物、生理活性物質、miRNA 等の大規模スクリーニングを行う。

(3) 糖鎖構造に結合する抗体、小分子のハイ・スループットスクリーニング：臨床薬、生理活性の知られている化合物ライブラリー、および多様志向性合成 (Diversity Oriented Synthesis, DOS) によるランダム化合物ライブラリーを用いた High-Throughput Screening (HTS) を行い、ウイルス増殖を特異的に抑制、または亢進する薬剤・化合物を探索する。

(4) グライコゲノミクス解析：ゲノム DNA を用いてゲノム解析 (エクソームシーケンシング、ゲノムワイド SNP タイピング) 行い、糖鎖解析により明らかとなる糖鎖修飾の有無を説明変数に入れたゲノムワイド SNP 関連解析を実施する。グライコゲノミクス解析により明らかとなる候補遺伝子領域を対象として、Replication 解析を実施する。

4. 研究成果

(1) 肝線維化、肝発癌や C 型ウイルス肝炎患者の DAA 治療後症例の血清を対象とし、糖タンパク質糖鎖 (N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖)、スフィンゴ糖脂質、グリコサミノグリカン (コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸)、遊離オリゴ糖等の複合糖質糖鎖等の包括的解析をおこない、組織障害のステージに有意に関連する修飾糖鎖構造およびそのキャリアタンパク質として、IgA をはじめとする複数の蛋白を同定した^{3,4,5}。

(2) 培養肝星細胞由来 RI-T 細胞株および初代ヒト肝星細胞を用いて、Kupffer 細胞共培養下の LPS 刺激、TGF- β 添加培養などにより活性化星細胞構築のための培養条件の設定等をおこなった。

(3) 肝線維化、星細胞活性化に関連する組織中、血清分泌型 microRNA の網羅的探索から、申請者が同定した肝線維化軽快例で上昇する miRNA4 種を培養星細胞に遺伝子導入解析し、SMA 発現、コラーゲン産生、ケモカイン分泌関連遺伝子が有意に上昇することを確認した (図 1)。

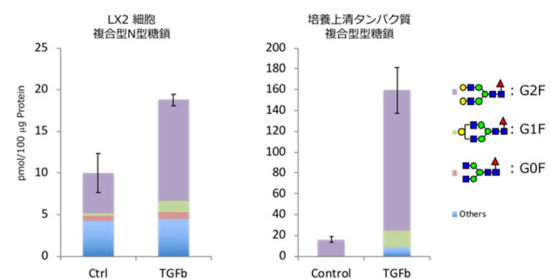


図1. 培養星細胞および培養上清タンパク質の N 型糖鎖解析:TGF- β による活性化による複合型 G0F、G1F、G2F 糖鎖の発現上昇

(4) ヒト肝星細胞株 LX2 の TGF 刺激により、培養上清に N 型糖鎖である G1F、G2F が増加した。キャリアタンパク質としてフィブロネクチン、M2BP、Nidogen-I が同定された。星細胞の Nidogen 抗体処理によりコラーゲン産生が抑制されたことから、創薬の標的となる可能性が示された (図 2)。

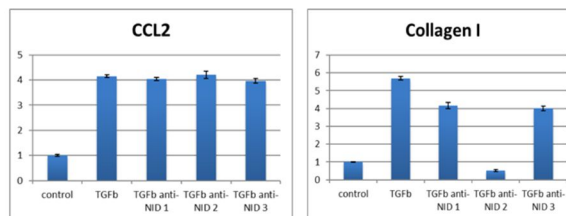


図2. Nidogen-1の糖鎖修飾部位近傍を含む抗体は、TGF-βによるCollagen I産生誘導を抑制した

(5) MSC 培養液から肝線維化抑制効果を担う蛋白、小分子の探索および上清蛋白糖鎖修飾構造の網羅的解析をおこなった^{1,2}。

引用文献

Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Fu Q, Maehara O, Suda G, Sakamoto N, Palmitoylethanolamide Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats.. *Front Pharmacol.* 2018, 9, 709, 10.3389/fphar.2018.00709.

Ohara M, Ohnishi S, Hosono H, Yamamoto K, Yuyama K, Nakamura H, Fu Q, Maehara O, Suda G, Sakamoto N, Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats.. *Stem Cells Int.* 2018, 2018, 3212643, 10.1155/2018/3212643.

Kobayashi T, Ogawa K, Furukawa JI, Hanamatsu H, Hato M, Yoshinaga T, Morikawa K, Suda G, Sho T, Nakai M, Higashino K, Numata Y, Shinohara Y, Sakamoto N, Quantifying Protein-Specific N-Glycome Profiles by Focused Protein and Immunoprecipitation Glycomics.. *J Proteome Res.* 2019, 18, 3133-3141, 10.1021/acs.jproteome.9b00232.

Hanamatsu H, Nishikaze T, Tsumoto H, Ogawa K, Kobayashi T, Yokota I, Morikawa K, Suda G, Sho T, Nakai M, Miura N, Higashi-No K, Sekiya S, Iwamoto S, Miura Y, Furukawa JI, Tanaka K, Sakamoto N, Comparative glycomic analysis of sialyl linkage isomers by sialic acid linkage-specific alkylamidation in combination with stable isotope labeling of 2,3-linked sialic acid residues.. *Anal Chem.* 2019, , , 10.1021/acs.analchem.9b03617.

Ogawa K, Kobayashi T, Furukawa JI, Hanamatsu H, Nakamura A, Suzuki K, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Nakai M, Sho T, Suda G, Morikawa K, Baba M, Furuya K, Terashita K, Kobayashi T, Onodera M, Horimoto T, Shinada K, Tsunematsu S, Tsunematsu I, Meguro T, Mitsuhashi T, Hato M, Higashino K, Shinohara Y, Sakamoto N, Tri-antennary tri-sialylated mono-fucosylated glycan of alpha-1 antitrypsin as a non-invasive biomarker for non-alcoholic steatohepatitis: a novel glyco-biomarker for non-alcoholic steatohepatitis.. *Sci Rep.* 2020, 10, 321, 10.1038/s41598-019-56947-1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Sato C, Yamamoto Y, Funayama E, Furukawa H, Oyama A, Murao N, Hosono H, Kawakubo K, Sakamoto N, Ohnishi S	4. 巻 141
2. 論文標題 Conditioned Medium Obtained from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents Activation of Keloid Fibroblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg	6. 最初と最後の頁 390-398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PRS.0000000000004068	査読の有無 有
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 Hanamatsu H, Nishikaze T, Miura N, Piao J, Okada K, Sekiya S, Iwamoto S, Sakamoto N, Tanaka K, Furukawa JI	4. 巻 90
2. 論文標題 Sialic Acid Linkage Specific Derivatization of Glycosphingolipid Glycans by Ring-Opening Aminolysis of Lactones.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anal Chem	6. 最初と最後の頁 13193-13199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.8b02775	査読の有無 有
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 Ohara Masatsugu, Ohnishi Shunsuke, Hosono Hidetaka, Yamamoto Koji, Fu Qingjie, Maehara Osamu, Suda Goki, Sakamoto Naoya	4. 巻 9
2. 論文標題 Palmitoylethanolamide Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2018.00709	査読の有無 有
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 Ohara Masatsugu, Ohnishi Shunsuke, Hosono Hidetaka, Yamamoto Koji, Yuyama Kohei, Nakamura Hideki, Fu Qingjie, Maehara Osamu, Suda Goki, Sakamoto Naoya	4. 巻 2018
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/3212643	査読の有無 有
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 Takashi, Ogawa Koji, Furukawa Jun-ichi, Hanamatsu Hisatoshi, Hato Megumi, Yoshinaga Tomoyo, Morikawa Kenichi, Suda Goki, Sho Takuya, Nakai Masato, Higashino Kenichi, Numata Yoshito, Shinohara Yasuro, Sakamoto Naoya	4. 巻 18
2. 論文標題 Quantifying Protein-Specific N-Glycome Profiles by Focused Protein and Immunoprecipitation Glycomics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 3133 ~ 3141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jproteome.9b00232	査読の有無 有
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 Ogawa Koji, Kobayashi Takashi, Furukawa Jun-ichi, Hanamatsu Hisatoshi, Nakamura Akihisa, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Ohara Masatsugu, Umemura Machiko, Nakai Masato, Sho Takuya, Suda Goki, Morikawa Kenichi, Sakamoto Naoya	4. 巻 10
2. 論文標題 Tri-antennary tri-sialylated mono-fucosylated glycan of alpha-1 antitrypsin as a non-invasive biomarker for non-alcoholic steatohepatitis: a novel glycomarker for non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56947-1	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 -

1. 著者名 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Shimazaki Tomoe, Yamada Ren, Kitagataya Takashi, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Nakamura Akihisa, Ohara Masatsugu, Umemura Machiko, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuizaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 -
2. 論文標題 High serum angiopoietin 2 level predicts non regression of liver stiffness measurement based liver fibrosis stage after direct acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13490	査読の有無 有
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
研究 分担者	須田 剛生 (Suda Junichi) (20447460)	北海道大学・大学病院・特任助教 (10101)	
研究 分担者	古川 潤一 (Furukawa Junichi) (30374193)	北海道大学・医学研究院・特任准教授 (10101)	