

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03630

研究課題名(和文) 肝硬変の組織学的進展・軽快を担う間質微小環境因子の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive screening of microenvironmental factors that affect liver fibrosis

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：1. 血清糖鎖修飾構造の網羅的解析を行い、NASHの肝線維化進展例でA2F bisect 糖鎖の発現が上昇することを見いだした。2. A2F bisect糖鎖のキャリア蛋白としてIgAをはじめとする複数の蛋白を同定した。3. 培養肝星細胞活性化に関連するmicro RNAの包括的解析を施行し、miR-29a、miR-449a、その他特定のmiRNAが活性化星細胞で高発現しており、Pathway解析で細胞骨格、細胞外マトリックス、chemotaxis関連経路の蛋白の発現を調節していた。4. C型肝炎SVR後発癌症例では血清中のAng2が有意に高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、肝星細胞を標的とした細胞・薬物療法による肝線維化の組織修復を促進する治療法開発の基盤となる。肝疾患と糖鎖発現変動に関する研究は多数報告があるが、主要な全てのクラスの糖鎖の包括的な解析例はない。包括的糖鎖修飾解析の結果同定された特異修飾糖鎖は、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、糖鎖修飾構造を標的とした分子標的治療が構築される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：1. Comprehensive analysis of serum glycan modification structures revealed that the expression of A2F bisect glycans is upregulated in patients with advanced liver fibrosis in NASH. 2. We identified several carrier proteins of A2F bisect glycans including IgA. We identified several carrier proteins of A2F bisect glycans, including IgA. 3. Comprehensive analysis of micro RNAs associated with the activation of cultured hepatic astrocytes revealed that miR-29a, miR-449a, and other specific miRNAs were highly expressed in activated astrocytes and regulated the expression of proteins in the cytoskeleton, extracellular matrix, and chemotaxis-related pathways by pathway analysis. 4. serum Ang2 was significantly elevated in hepatitis C post-SVR carcinoma cases.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝線維化 糖鎖修飾

## 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り、国内に約 50 万人、世界では約 2,000 万人の患者がいる。肝硬変は従来不可逆性の病態と考えられてきたが、肝炎ウイルス排除など原因の除去により多くの症例で炎症の沈静化、肝線維化の消退が起こることが明らかとなった。しかし高度肝線維化例などでは治療後も組織学的修復は限定的である。以上より肝硬変の組織病態の修復機構の解析、および修復を促進する新規治療法の開発が望まれる。近年国内外で、薬物・細胞治療、核酸導入療法などにより積極的に肝線維化の消退を目指した治療開発の取り組みがなされている。

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。しかし、その構造や合成経路の複雑さから構造・機能解析は大きく立ち遅れていた。近年、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が開発され、細胞の網羅的な複合糖質糖鎖解析(総合グライコムクス)により疾患などに伴う各糖鎖の発現変化や機能解析が可能となった。

## 2. 研究の目的

本研究で申請者らは、従来の肝庇護、原疾患治療を主体とした肝硬変治療から視点を新たにし、肝硬変の組織病態の修復機構を解析し、肝星細胞を標的とした細胞・薬物療法による肝線維化の組織修復を促進する治療法の効果、作用機構等を解析する。さらに NASH に伴う組織病態の解析のため、包括的糖鎖修飾解析により肝線維化、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。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、糖鎖修飾構造を標的とした分子標的治療の可能性についても探索を進める。

## 3. 研究の方法

本研究では、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、総合グライコムクス(糖鎖修飾構造の包括解析)、miRNA プロファイル解析、血清プロテオミクスを行い、病態の進行、軽快に関連する蛋白、分子、核酸を探索する。さらに、抗線維化効果の確認された間葉系幹細胞および培養上清から、同様の方法で生理活性部室の成分分析をおこなう。同定された候補分子については、機能解析を進めると共に、化合物ライブラリーを用いた阻害活性物質の探索、抗体、レクチンライブラリーの探索を進め、治療標的としての解析を進める。

- (1) 血清組織糖鎖修飾構造の網羅的探索
- (2) 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
- (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
- (4) 培養星細胞、間葉系幹細胞をもちいた肝線維化・修復に関連する成分分析
- (5) 肝星細胞活性化により再構築される宿主因子と肝線維化、肝脂肪化機構の解析
- (6) 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

## 4. 研究成果

(1) 血清組織糖鎖修飾構造の網羅的探索：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD/NASH) C型肝炎、肝発癌症例の血清の網羅的解析を行い、NASHの肝線維化進展例でA2F bisect糖鎖の発現が上昇し、さらに生合成経路でA2F bisectの上流に位置する5種の前駆体糖鎖群も同様に発現上昇を示した。独立した検証用検体セットで再現性を確認した。

(2) 培養星細胞をもちいた肝線維化・修復に関連する成分分析：我々は、従来区別困難であった糖鎖末端に付加されるシアル酸の構造異性体を特異的かつ短時間に検出する方法(aminolysis-SALSA法)を開発し、A2F bisect糖鎖のキャリア蛋白としてIgAをはじめとする複数の蛋白を同定した。NASHの患者血清検体を用いた解析にて、A2F Bisect糖鎖は、ROC解析にて高度肝線維化(F3)診断能はAUROC=0.804と高い診断能であることが確認できた。培養星細胞の解析により、G1FおよびG2F糖鎖は、TGF添加により線維化を誘導した細胞で上昇した糖鎖と同じであった。培養肝星細胞活性化に関連するmicro RNAの包括的解析を施行し、miR-29a、miR-449a、その他特定のmiRNAが活性化星細胞で高発現し、knock downにより星細胞alpha-SMA、type-I collagen発現が抑制されることを示した。Pathway解析では、これらのmiRNAは細胞骨格、細胞外マトリックス、chemotaxis関連経路の蛋白の発現を調節していることが明らかとなった。

(3) C型肝炎SVR後発癌症例では血清中のAng2が有意に高値であり、治療標的としての可能性が示された。

### 参考文献：

1. Ogawa K, Kobayashi T, Furukawa JI, Sakamoto N et al. Tri-antennary tri-sialylated mono-fucosylated glycan of alpha-1 antitrypsin as a non-invasive biomarker for non-alcoholic steatohepatitis: a novel glycobiomarker for non-alcoholic steatohepatitis. *Sci Rep.* 2020, 10, 321. 10.1038/s41598-019-56947-1.
2. Kawagishi N, Suda G, Kimura M, Maehara O, Shimazaki T, Yamada R, Kitagataya T, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Umemura M, Nakai M, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kudo Y, Nishida M, Sakamoto N, High serum angiopoietin-2 level predicts non-regression of liver stiffness measurement-based liver fibrosis stage after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C. *Hepatol Res.* 2020, 50. 671-681, 10.1111/hepr.13490.
3. Shigesawa T, Maehara O, Suda G, Sakamoto N et al. Lenvatinib suppresses cancer stem-like cells in HCC by inhibiting FGFR1-3 signaling, but not FGFR4 signaling. *Carcinogenesis.* 2021, 42, 58-69. 10.1093/carcin/bgaa049.
4. Shigesawa T, Suda G, Kimura M, Shimazaki T, Maehara O, Yamada R, Kitagataya T, Suzuki K, Nakamura A, Ohara M, Umemura M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuzaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N, Baseline angiopoietin-2 and FGF19 levels predict treatment response in patients receiving multikinase inhibitors for hepatocellular carcinoma. *JGH Open.* 2020, 4, 880-888. 10.1002/jgh3.12339.

5. Shigesawa T, Suda G, Kimura M, Maehara O, Tokuchi Y, Kubo A, Yamada R, Furuya K, Baba M, Kitagataya T, Suzuki K, Ohara M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N, Baseline serum angiopoietin-2 and VEGF levels predict the deterioration of the liver functional reserve during lenvatinib treatment for hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2021, 16, e0247728.  
10.1371/journal.pone.0247728.
6. Kawagishi N, Suda G, Kimura M, Maehara O, Yamada R, Tokuchi Y, Kubo A, Kitagataya T, Shigesawa T, Suzuki K, Ohara M, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kudo Y, Nishida M, Sakamoto N, Baseline elevated serum angiopoietin-2 predicts long-term non-regression of liver fibrosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C. *Sci Rep*. 2021, 11, 9207.  
10.1038/s41598-021-88632-7.
7. Maehara O, Suda G, Natsuizaka M, Shigesawa T, Kanbe G, Kimura M, Sugiyama M, Mizokami M, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Naganuma S, Okubo N, Ohnishi S, Takeda H, Sakamoto N, FGFR2 maintains cancer cell differentiation via AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther*. 2021, 22, 372-380.  
10.1080/15384047.2021.1939638.
8. Nakamura A, Yamamoto K, Takeda R, Sakamoto N et al. The potential of soluble CD14 in discriminating nonalcoholic steatohepatitis from nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2022, Epub ahead of print.  
10.1111/hepr.13757.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 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, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 50
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 671 ~ 681
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 -

1. 著者名 Shigesawa Taku, Maehara Osamu, Suda Goki, Natsuzaka Mitsuteru, Kimura Megumi, Shimazaki Tomoe, Yamamoto Koji, Yamada Ren, Kitagataya Takashi, Nakamura Akihisa, Suzuki Kazuharu, Ohara Masatsugu, Kawagishi Naoki, Umemura Machiko, Nakai Masato, Sho Takuya, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 Lenvatinib suppresses cancer stem-like cells in HCC by inhibiting FGFR13 signaling, but not FGFR4 signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 58 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa049	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 Shigesawa Taku, Suda Goki, Kimura Megumi, Shimazaki Tomoe, Maehara Osamu, Yamada Ren, Kitagataya Takashi, Suzuki Kazuharu, Nakamura Akihisa, Ohara Masatsugu, Umemura Machiko, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya	4. 巻 4
2. 論文標題 Baseline angiopoietin 2 and FGF19 levels predict treatment response in patients receiving multikinase inhibitors for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 880 ~ 888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12339	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 4.Suzuki K, Suda G, Yamamoto Y, Furuya K, Baba M, Nakamura A, Miyoshi H, Kimura M, Maehara O, Yamada R, Kitagataya T, Yamamoto K, Shigesawa T, Nakamura A, Ohara M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Ohnishi S, Sakamoto N	4. 巻 56
2. 論文標題 Tenofovir disoproxil fumarate modulates lipid metabolism via hepatic CD36/PPAR-alpha activation in hepatitis B virus infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 168 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01750-3	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 et al.	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 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 -

〔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 Goki)  (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 Jun-ichi)  (30374193)	北海道大学・医学研究院・特任准教授   (10101)	
研究分担者	森川 賢一  (Morikawa Kenichi)  (60384377)	北海道大学・医学研究院・准教授   (10101)	
研究分担者	大西 俊介  (Ohnishi Shunsuke)  (10443475)	北海道大学・医学研究院・准教授   (10101)	令和3年3月末まで参画

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
---------	---------