

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22612

研究課題名（和文）分泌経路に着目した肝線維化責任因子の同定と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Identification of Factors Responsible for Liver Fibrosis Focusing on Secretory Pathways and Development of Novel Therapeutic Agents

研究代表者

齋藤 康太（Saito, Kota）

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60549632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者は本挑戦的研究（萌芽）において、siRNAを用いた肝線維化抑制効果をマウスで検討すべく、マウスに対するsiRNAオリゴの選定および肝へのsiRNAの標的化の方法に関し、さまざま検討をおこなった。さらに小胞輸送関連因子の組織染色の条件検討および肝線維化モデルマウスの作成に対する条件検討を完了した。今後、本結果に基づき、マウスにおいてsiRNAによる種々の小胞輸送関連因子の発現抑制による肝線維化抑制効果の検証を行いたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化はアルコール、肥満等の生活習慣病的要因により引き起こされ、肝硬変・肝癌へと進行するが、線維化に対する根本的な治療法は確立していない。今後非アルコール性脂肪肝炎(NASH)が慢性肝炎の主因になることが予想されることから、ウイルスを標的とせず肝線維化を直接阻害する治療薬の開発がますます期待されている。研究代表者は分泌経路に着目し、種々の分泌経路関連因子の発現抑制によって肝線維化を抑制できる可能性を提示しており、本研究を継続することで、その抑制効果の検証を行いたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have examined various methods for selecting siRNA oligos for mice and targeting siRNA to the liver in order to investigate the inhibitory effect of siRNA on liver fibrosis in mice. In addition, we have completed the examination of conditions for tissue staining of vesicle trafficking-related factors and the creation of a mouse model of liver fibrosis. Based on these results, we would like to verify the inhibitory effect of siRNA on liver fibrosis by suppressing the expression of various vesicular trafficking-related factors in mice.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分泌

### 1. 研究開始当初の背景

肝線維化はアルコール、肥満等の生活習慣病的要因により引き起こされ、肝硬変・肝癌へと進行するが、線維化に対する根本的な治療法は確立していない。ハーボニーをはじめとしたウイルス慢性肝炎に対する治療薬の開発により、今後非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が慢性肝炎の主因になることが予想されることから、ウイルスを標的とせず肝線維化を直接阻害する治療薬の開発がますます期待されている。

肝線維化の標的として、肝星細胞は重要である。肝星細胞は、通常はビタミンAを貯蔵しているが、炎症性サイトカイン

によって活性化され筋繊維芽細胞様に分化する。分化した肝星細胞は I 型コラーゲンの分泌を異常亢進し、これが線維化の主要因となっている (図1)。以前から、細胞内の分泌を司る小器官である小胞体やゴルジ体が、肝星細胞の活性化の過程で肥大化することは知られていたが、肝星細胞の分泌経路の変化に着目した研究はほとんど行なわれていなかった。

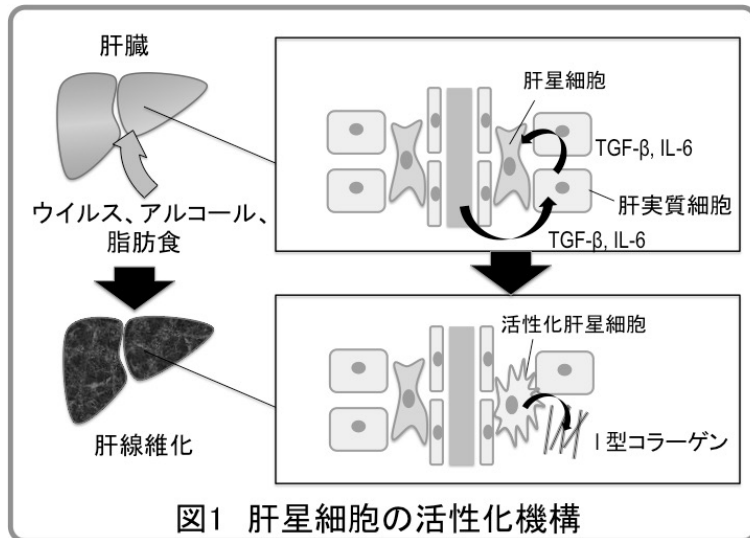


図1 肝星細胞の活性化機構

### 2. 研究の目的

研究代表者は、炎症性サイトカインによって刺激を受けた肝星細胞が、転写因子 CREB3L2 依存的に Sec23A/Sec24D を特異的に発現上昇させ、コラーゲンとは異なる未同定の肝線維化責任因子を小胞体からゴルジ体へ輸送することで、初期の肝星細胞活性化に関与することを新たに見出した。Sec23A/Sec24D は、COPII 小胞の内側被覆因子であり、積荷や積荷受容体と直接結合し、COPII 小胞へと濃縮する機能を有する。さらにこの過程において Sec23A/Sec24D の発現を抑制することで I 型コラーゲンの分泌のみならず、肝線維化マーカーの発現を抑制できることを明らかにしている (Sci Rep, 2017) (図2)。

そこで研究代表者は本挑戦的研究 (萌芽) において、分泌経路によって活性化される「肝線維化責任因子」を同定し、肝線維化を抑制する新規標的薬を開発することを目的として研究を遂行する。

### 3. 研究の方法

本研究は主に細胞生物学的な手法および生化学的手法を用いて解析した。

#### (1) 安定発現株による Sec23A 結合因子の探索

安定発現株の作成はレンチウイルスによるインフェクション法を用いた。ドキシサイクリン誘導性に発現を誘導できるシステムを用いた。

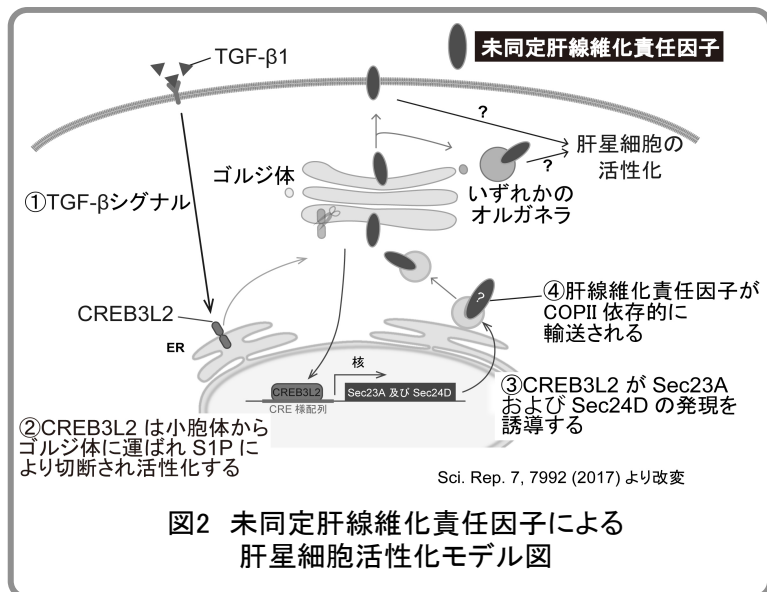


図2 未同定肝線維化責任因子による肝星細胞活性化モデル図

(2) マウス由来細胞種 NIH3T3 を用いた siRNA オリゴ配列の検討

NIH3T3 細胞に siRNA を Lipofectamine RNAi max を用いたリポフェクション法により導入した。Sec23A の発現低下は新たにマウス Sec23A に対して作製したポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットにより検証した。

(3) 個体における肝への標的化の検討

GFP を発現するプラスミドを用いてマウス肝への導入効率の確認を行った。マウス尾静脈にてハイドロダイナミクス法によりプラスミドを投与した後、肝臓を取り出し、免疫染色を行った。

(4) 組織染色に用いる抗体の検討

パラフィン切片に対して、常法により組織染色をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 安定発現株による Sec23A 結合因子の探索

未同定の肝線維化責任因子の探索に用いる細胞として、ヒト培養肝星細胞である LX-2 細胞を用いた。N 末端に Myc タグおよび FLAG タグの両方を付与した Sec23A をドキシサイクリンの濃度依存的に発現量をコントロールできる系を構築し、Sec23A に結合する因子をアフィニティー精製することを可能とした。

興味深いことに、Sec23A をドキシサイクリン誘導によって発現させることで、内在 Sec23A の発現量が減少した。このことは、LX-2 細胞において Sec23A の発現量が厳密に調整されていることを意味しており、また Sec23A の発現量を内在と同程度にすることで、Sec23A 過剰発現による影響を排除することに成功した。

(2) マウス由来細胞種 NIH3T3 を用いた siRNA オリゴ配列の検討

マウス由来細胞種 NIH3T3 に Sec23A、Sec24D、HSP47 を発現させた後、免疫沈降とウエスタンブロッティングにより、それぞれに使用できる抗体の検討を行った。Sec23A はいくつかの市販の抗体にてブロットを行ったが、Sec23A 特異的に検出できる抗体がなかったため、新たに抗体を作製した。その後、NIH3T3 細胞において Sec23A、Sec24D、HSP47 を効率的に発現抑制できる siRNA オリゴを同定した。

(3) 個体における肝への標的化の検討

肝に siRNA オリゴを標的化するための手法を確立するため、まずは肝に cDNA を導入する手法の確立を目指した。マウス尾静脈にてハイドロダイナミクス法により GFP プラスミドを投与した後、肝臓を取り出し、抗 GFP 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、肝への GFP の発現が確認できた。

(4) 組織染色に用いる抗体の検討

種々の小胞輸送関連因子に対する組織染色の条件検討を行なった。我々はこれまで、Sec23A ラットモノクローナル抗体、Sec16 ウサギポリクローナル抗体、TANG01 ウサギポリクローナル抗体、Sec13 ウサギポリクローナル抗体を作製しており、これらを肝線維化病理組織の染色に適応するための条件検討を行なった。その結果、いずれの抗体も組織染色可能であることが明らかになった。さらに、線維化組織においては Sec23A 及び Sec13 の発現量が増加しており、TANG01 及び Sec16 の発現量に変化は認められなかった。この結果は我々の先行研究の結果と類似している。また、これらの抗体を用いることで、siRNA オリゴを作用させた後の各因子の発現量を評価することが可能となった。

(5) 肝線維化モデルマウスの作成

High Fat Diet 投与による肝線維化モデルマウスを作成し、継時的に肝組織切片を作製し、alpha-SMA の発現上昇を確認した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeda Miharū, Komatsu Yukie, Saito Kota	4. 巻 55
2. 論文標題 Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 237 ~ 250.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.07.017	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 Maeda Miharū, Komatsu Yukie, Saito Kota	4. 巻 7
2. 論文標題 Mitotic ER exit site dynamics: insights into blockade of secretion from the ER during mitosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 1832420 ~ 1832420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23723556.2020.1832420	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 Centonze Federica G., Reiterer Veronika, Nalbach Karsten, Saito Kota, Pawlowski Krzysztof, Behrends Christian, Farhan Hesso	4. 巻 218
2. 論文標題 LTK is an ER-resident receptor tyrosine kinase that regulates secretion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2470 ~ 2480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201903068	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 該当する
1. 著者名 Saito Kota, Maeda Miharū	4. 巻 166
2. 論文標題 Not just a cargo receptor for large cargoes; an emerging role of TANGO1 as an organizer of ER exit sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 115 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz036	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 Maeda Miharū, Kurokawa Kazuo, Katada Toshiaki, Nakano Akihiko, Saito Kota	4. 巻 9
2. 論文標題 COP11 proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43813-3	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞分裂期における分泌停止メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maeda, M., Komatsu, Y., Saito, K.
2. 発表標題 Mitotic ER exit site dissociation and reassembly are regulated by phosphorylation status of TANGO1
3. 学会等名 Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeda, M., Sasaki, N., Shiraiwa, M., Yorimitsu, T., Sato, K., Katada, T., Saito, K.
2. 発表標題 cTAGE5 acts as a Sar1 GTPase regulator for collagen export
3. 学会等名 Gordon Research Conferences, Molecular Membrane Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 巨大分子の分泌機構
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会・第17回アジア先天代謝異常症シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 深春、小松 幸恵、齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期に応じたリン酸化による分泌調節機構
3. 学会等名 第70回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤 康太
2. 発表標題 細胞周期に応じた小胞体出芽ゾーン「ERES」の崩壊と再形成の分子機構
3. 学会等名 第3回オルガネラ・ゾーン研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza/yakuri.html>  
 秋田大学大学院医学系研究科 情報制御学・実験治療学講座  
<https://www.med.akita-u.ac.jp/department/gs/kenkyu-org/kouza.php?koza=yakuri>

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

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