

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23732

研究課題名(和文) 羊膜上皮細胞由来エクソソーマルmiR483-5pによる肝星細胞活性制御機序の解明

研究課題名(英文) The Role of Amniotic Epithelial Cell-derived miRNAs in the Regulation of Hepatic Stellate Cell Activation

研究代表者

三木 敏生 (MIKI, Toshio)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：80845305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、羊膜上皮細胞由来エクソソーマルmicroRNAによる肝線維化抑制作用機序の解明を目的として行われた。われわれは、羊膜上皮細胞由来エクソソーマルmicroRNAが重要な役割を果たしていることを発見し、網羅的解析によりmiR483-5pを同定した。本研究では、初代ヒト肝星細胞を用いて定量的プロテオーム解析を行いmiR483-5pの標的タンパク質を同定した。様々な検証実験を行うことによって、羊膜上皮細胞由来エクソソームに含まれるmiR483-5pは、PDLIM3などアクチン重合に関連する分子の発現を制御する作用機序で肝星細胞の活性化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化の進行過程においては、肝細胞傷害に起因する炎症反応によって肝星細胞が筋線維芽細胞様に活性化する過程が最も重要な要因であるとされる。そこでわれわれは肝星細胞活性化を抑制する一つ的手段として、羊膜上皮細胞由来エクソソームによって伝達されるマイクロRNAに注目し、その肝線維化抑制作用を解明した。これらの成果から、肝硬変の新規治療法として、羊膜上皮細胞由来エクソソームの応用や、今回同定した細胞内シグナル経路をターゲットとした治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to elucidate the antifibrotic mechanism of the amniotic epithelial cell (AEC)-derived exosomal micro RNA (miRNA). It has been shown that AEC condition media possess an anti-fibrotic effect using rodent models. In the effort to find the potent factors, we found the AEC-derived exosome contained miRNA plays a key role. Using exosome RNA sequencing, we identified one uniquely expressed exosomal miR, miR-483-5p. In this study, we performed quantitative proteomic analysis, which revealed miR-483-5p affected signaling pathway in spontaneously activating human primary HSCs. The involvement of the identified protein was validated with the hAEC-derived exosome-treated HSC cell line cells. In conclusion, our findings elucidated the contribution of hAEC exosomal miR483-5p represents a previously undescribed and unique anti-fibrotic mechanism via suppressing PDLIM3 and other actin-related molecule expressions.

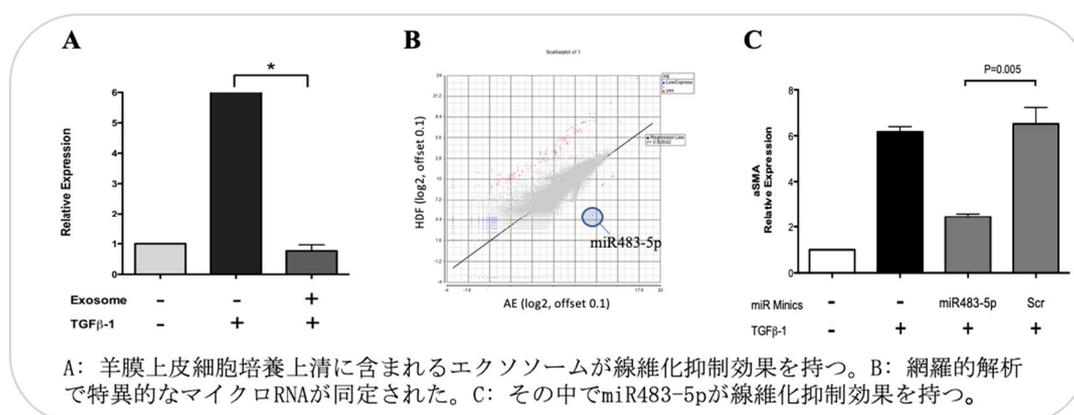
研究分野：生理学

キーワード：羊膜上皮細胞 肝線維化 エクソソーム マイクロRNA 肝星細胞 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

わが国の肝硬変患者数は40万から50万人と推定され、年間約17,000人が肝硬変を主因として死亡している。その原疾患は多岐にわたるが、慢性的な肝細胞傷害による線維化の進展によって最終的には肝機能不全をきたすことや、あるいは高頻度に合併する肝細胞癌により死に至ることも多い。かつて肝硬変は、進行性かつ不可逆的な病態と考えられてきたが、近年、肝硬変の背景にある慢性ウイルス肝炎の分子標的治療が進歩するとともに、肝線維化改善による肝硬変の可逆性が報告されるようになった。しかし現時点では、特異的に肝線維化の進展を抑制する治療法はなく、その開発が熱望されている。

肝線維化の進行過程においては、肝細胞傷害に起因する炎症反応によって肝星細胞が筋線維芽細胞様に活性化する過程が最も重要な要因であるとされる。われわれは、組織幹細胞の一つである羊膜上皮細胞の肝線維化抑制効果に着目し、その効果が羊膜上皮細胞由来エクソソームを介することを見いだした。さらに、エクソソーム RNA の網羅的解析により、羊膜上皮細胞由来エクソソームに優位に含まれる miR483-5p が特異的に肝線維化抑制効果を有することを解明した。



2. 研究の目的

本研究では上記の成果をもとに、miR483-5pによる肝線維化抑制作用の分子生物学的な機序を解明することを目的とした。

まず、miR483-5pが肝線維化の主体である肝星細胞の活性化において、どのようなタンパク質の発現に影響を与えるのか明らかにし、次にここで同定した標的タンパク質が関与する細胞内シグナル伝達はなにかを解明することを目的とした。本研究で得られた知見をもとに、明らかにされた細胞内シグナル伝達系を制御することで肝線維化の進展を抑制する新たな治療法の開発が期待される。

3. 研究の方法

miR483-5pの肝線維化抑制作用機序に関与する細胞内シグナル伝達経路を解明するため次の二つのアプローチから研究を行った。

(1) in silico 分析により類推される細胞内シグナル伝達因子の解析

Web-based マイクロ RNA 標的分子検索エンジン(miRbase)により標的配列を持つ遺伝子を複数選抜した。これらの情報から Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)を用いて miR483-5p が制御している可能性のある細胞内シグナル伝達経路を類推すると、PDGFR-ERK-SRF 経路が示唆された。PDGFR は活性化された肝星細胞表面に発現し、肝線維化に関与しているため、ヒト肝星細胞(LX2)と初代培養肝星細胞を用いて、PDGFによって活性化される PDGFR-ERK-SRF 経路の下流遺伝子の発現が、合成 miR483-5p の導入によって変化するかどうか明らかにする。

(2) ヒト初代培養肝星細胞を用いた定量プロテオーム解析による未知の標的分子の探索

ヒト初代培養肝星細胞の自発的活性化を誘導し、その過程で合成 miR483-5p あるいは miR-Scramble(コントロール)を導入する。その後、全細胞タンパクを回収し液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いた定量的プロテオミクス解析を行い、miR483-5p の導入によって有意に発現が変化したタンパク質を同定する。IPA パスウェイ解析ソフトを用

いて同定されたタンパク質を関連づけるとともに、増加・減少した上位 10 のタンパクの遺伝子発現を qRT-PCR によってヒト初代培養肝星細胞と LX2 で確認する。

(3) 同定した細胞内シグナル伝達の機能評価

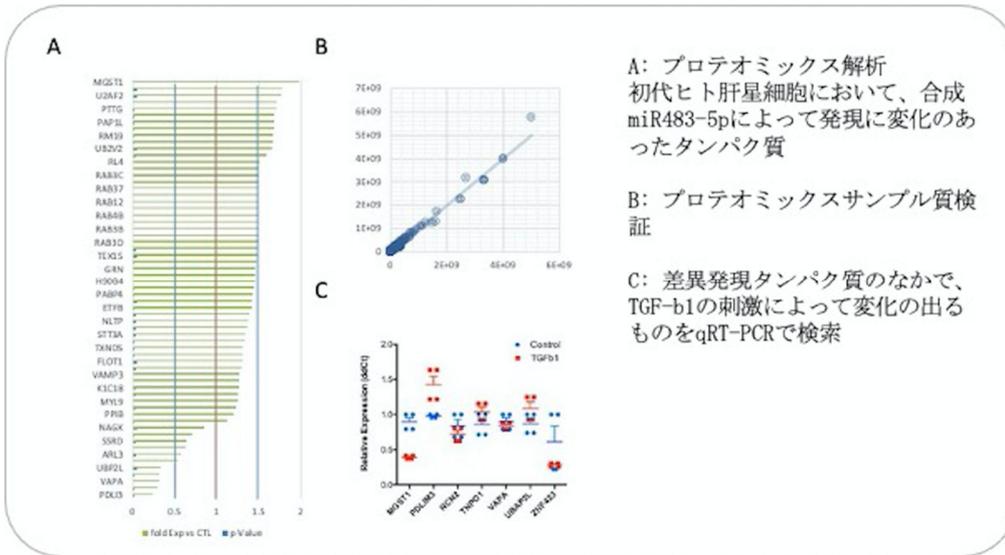
上記のアプローチによって同定された細胞内シグナル伝達経路は、対応する既知の小分子阻害剤を用いて遺伝子およびタンパク質の発現を確認したのち、ヒト肝星細胞(LX2)を用いて同定したタンパクの機能獲得/機能喪失実験を行い、細胞外マトリックス代謝への影響を調べる。

4 . 研究成果

まず、予定した研究実施計画に従い、in silico 分析により類推される細胞内シグナル伝達因子の解析を行った。miRbase や KEGG などを用いた in silico 分析から miR483-5p は、PDGFR-ERK-SRF 経路に関連していることが示唆されたため、PDGFR-ERK-SRF 経路の下流遺伝子の発現が、合成 miR483-5p の導入によって変化するかどうか検討した。ヒト肝星細胞株である LX2 細胞にリポフェクション法を用いて合成 miR483-5p および miR-Scramble コントロールを導入し、PDGFR-ERK-SRF 経路の下流遺伝子である PDGFR、MAPK3、SRF の発現を qRT-PCR で確認したが、それぞれの群で優位な差は認められなかった。Knowledge base のデータベースである KEGG で参照されている先行研究は心筋を用いたものであったため、この先行研究データからの予想に反して、肝線維化の主体となる肝星細胞においては、miR483-5p の PDGFR-ERK-SRF 経路への直接の影響はないのではないかと考えられた。

そこで、米国 Samsara Sciences, Inc. より初代ヒト肝星細胞を入手し、初代ヒト肝星細胞に対する miR483-5p の未知の作用機序を解明するためプロテオーム解析を行った。ヒト初代肝星細胞は、生体内から分離されると培養下において速やかに自発的に活性化することを利用し、細胞増殖率と alpha-SMA mRNA 発現量によって活性化を確認した。培養 4 日目の活性化が進んでいる段階で、合成 miR483-5p および miR-Scramble を Lipofectamine RNAiMAX 試薬を用いて導入した。17 時間後、全細胞タンパクを回収し液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いた定量的プロテオミクス解析を行い、miR483-5p の導入によって有意に発現が変化したタンパク質を同定した。IPA パスウェイ解析ソフトを用いて同定された上位 10 のタンパク質のアノテーションを行ったところ、アクチン関連 LIM タンパク質として知られている PDLIM3 が、最も線維化に関連しているように考えられた。一方、発現の増加している MGST1 は、肺線維化への関連が示唆されるミトコンドリア膜酵素であるが、LX2 を TGFb で刺激した際に発現の低下が見られたので本研究の対象ではなく将来的な検討の対象とした。

これらの結果から、PDLIM3 が miR483-5p の標的遺伝子であると仮定し、ヒト肝星細胞株である LX2 細胞を用いてその影響を検証した。まず、LX2 細胞が初代培養肝星細胞と同様に PDLIM3 を発現していることを確認し、その発現が miR483-5p の導入によって減少することを検証した。次に、PDLIM3 タンパク質の減少と肝星細胞の活性化との関連を調べるため機能獲得/機能喪失実験を行った。LX2 細胞を親株とし、レンチウイルスベクターを用いて、PDLIM3 強制発現細胞株と shRNA を用いた PDLIM3 ノックダウン細胞株、およびそれぞれのコントロール株を作成した。リコンビナント TGF-b と PDGFbb を培地に添加することによってこれらの細胞株を刺激すると、PDLIM3 ノックダウン細胞株において優位に細胞増殖、alpha-SMA の産生が減少した。また、肝線維化に関わる遺伝子の発現を調べたところ、アクチンの骨格や微小管・転写活性・膜輸送に影響を及ぼす GTP アーゼ活性化タンパク質の関与も示唆された。これらのことより、miR483-5p はアクチン重合に関わる分子の発現を阻害することによって肝星細胞の活性化を抑制することが明らかとなった。



本研究は、羊膜上皮細胞由来エクソソーム microRNA による肝線維化抑制作用機序の解明を目的として行われた。本研究の成果より、羊膜上皮細胞由来エクソソームに肝線維化抑制作用のあるマイクロ RNA が含まれること、またその中でも miR483-5p は、アクチン重合に関連する分子の発現を制御することによって線維化を抑制する可能性が示唆された。これらの成果から、肝硬変の新規治療法として、羊膜上皮細胞由来エクソソームの応用や、今回同定した細胞内シグナル経路をターゲットとした治療薬の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三木敏生
2. 発表標題 羊膜上皮細胞由来エクソソームマルmiR483-5pによる肝星細胞活性制御機序の解明
3. 学会等名 第27回肝細胞研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 線維化抑制剤及び医薬組成物	発明者 三木 敏生	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、J 3 1 7 6 6 A 1	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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