

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19330

研究課題名(和文) Ras阻害薬による慢性進行性肝炎の新たな治療法と肝発癌抑止法の開発

研究課題名(英文) Development of Ras Inhibitory Therapy for Chronic Liver Diseases

研究代表者

中川 良 (Ryo, Nakagawa)

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：60594596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ras阻害剤の慢性肝炎治療開発のため研究を行った。それにより、自己免疫性肝疾患で特に原発性胆汁性胆管炎(PBC)でRas阻害剤が有用である可能性が示唆された。PBCのリンパ球ではN-Ras分子の高発現が認められ、それが炎症性サイトカインの産生を強く制御していた。これにRas阻害剤を用いることでPBCの炎症を抑制し、その病態改善を改善させる可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To develop a treatment for chronic liver diseases, I study about Ras-inhibitors. Then the autoimmune liver disease, especially primary biliary cholangitis (PBC) is seemed to be adopted to Ras-inhibitor therapy. In PBC-CD4+ T cells, upregulated N-Ras induced inflammatory cytokines. Then Ras-inhibitors suppressed inflammatory cytokines from CD4+ T cells by regulating N-Ras. Therefore, Ras-inhibitors could be an attractive and novel therapeutic option for PBC.

研究分野：肝臓学

キーワード：自己免疫性肝疾患 Ras阻害剤 リンパ球

1. 研究開始当初の背景

慢性進行性肝炎は様々な原因による肝障害が継続し肝硬変へと至る疾患群である。その80-90%はウイルス性肝炎が占め、長年にわたり慢性肝炎の治療=ウイルス性慢性肝炎の治療という図式が形成されてきた。しかし、核酸医薬の発達によりウイルス性慢性肝炎の治療開発は一つの区切りを迎えた。そして近年では非ウイルス性慢性肝炎の治療開発に注目が集まっている。非ウイルス性慢性進行性肝炎には自己免疫性肝炎(AIH)、原発性胆汁性肝硬変(PBC)、原発性硬化性胆管炎(PSC)、アルコール性肝障害(ALD)、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)が含まれる。特に自己免疫性肝疾患の治療については既存治療への抵抗症例が多くあり、慢性進行性肝疾患の病態に基づいた新たな治療の開発が急がれている。

Rat sarcoma(Ras)は癌の増殖を制御する因子で癌の20-30%に変異を認められる。Ras阻害薬はRas変異を伴う癌への抗腫瘍効果を期待され開発が行われている。しかしRas活性化機序の煩雑さから期待される抗腫瘍効果はあげられていない。一方Rasは免疫反応においても中心的な役割を果たす事が知られ、特にCD4⁺T細胞分画においてeffector T細胞の活性化に強く関わる事が報告されている。例えばTh1細胞におけるIFN- γ の産生制御やregulatory T細胞のmaster遺伝子であるFOXP3の発現制御にRasが強く関わる事が挙げられる。そしてRas阻害薬の免疫抑制作用について徐々に報告がなされている。

申請者は自己免疫性肝疾患のCD4⁺T細胞におけるmicroRNA(miRNA)とその標的遺伝子の統合解析を行いその報告発表を行ってきた。それらの解析によりPBCのCD4⁺T細胞において、(1)PBCでN-Ras発現が亢進を示すこと、(2)PBCで減少を示すmiRNA群はN-Rasを標的とすること、(3)減少を示すmiRNA群はN-Ras発現を亢進させサイトカイン産生を亢進させることを報告してきた。そしてPBCではN-Rasとそれらを制御するmiRNAが新たな治療標的となり得る可能性を見出してきた。

さらに興味深い事にN-Rasは細胞老化シグナルの制御を行う事が知られている。PBCとPSCの胆管上皮細胞でN-Rasが亢進を示し、老化シグナルを亢進させ、その病態形成に関わることが報告されている。そしてRas阻害薬はN-Rasの活性化を抑制することでPSCの胆管上皮細胞における老化シグナルを抑制する可能性がある。そのためRas阻害薬はPBCとPSCの胆管上皮細胞への治療効果を有する可能性があると考えられる。

これらの背景より申請者はPBCやPSCを中心とした慢性進行性肝疾患の病態形成にRasが強く関わり、Ras阻害薬によりその病態に合わせた新たな治療が開発できると考えた。そのため申請者は慢性進行性肝疾患の新たな治療戦略としてRasに注目し、Ras

阻害薬を用いた新たな治療法の開発を行う。

2. 研究の目的

本申請ではProof of conceptを目標に慢性進行性肝炎におけるRasの役割を明らかにし、Ras阻害薬を用いた慢性進行性肝炎への治療応用を計ることを目的とする。慢性進行性肝炎は肝硬変へと至る疾患群である。2011年JDDWの調査報告よりその内訳はC型肝炎61%、B型肝炎12%、非ウイルス性肝炎26%とされる。そして治療の進展によりC型肝炎、B型肝炎による肝硬変は減少していくことが予想されている。しかし非ウイルス性慢性肝炎では、治療抵抗性を示す症例も多くあること、高齢化に伴い緩徐ながら肝硬変へと至る症例が存在することなどから、非ウイルス性肝硬変の割合が増加していくことが予想されている。また肝癌についてもウイルス性慢性肝炎が95%を占めるが、非ウイルス性慢性肝炎でも健常人と比して肝発癌リスクが高いことが知られている。非ウイルス性慢性肝炎の発癌は純粋な炎症性発癌と考えられ、肝内の炎症を改善することで発癌抑制へと繋がる事が予想される。本研究の遂行により慢性進行性肝炎における肝硬変・肝不全への進展を抑制し、更には肝発癌の抑止に繋がると考える。

本申請を行うに当たり申請者は上記仮説の根拠となる知見を先行研究により得ている。まずPBCのCD4⁺T細胞では健常人、自己免疫性肝炎(AIH)患者と比べてN-Ras発現が亢進を示すということである。特にPBCの標準治療であるウルソデオキシコール酸(UDCA)に治療抵抗性を示す症例でN-Ras強く亢進を示していた。つまりN-RasはPBCのCD4⁺T細胞で亢進し、特に治療抵抗性で高値を示すことが示された。先述のようにRasはCD4⁺T細胞の活性化を制御し、炎症性サイトカインの産生を制御する。このことから申請者はPBCの治療抵抗性においてN-Rasが新たな治療標的となる可能性を見出した。また先述のようにPBCの胆管上皮細胞でもN-Ras発現が亢進していることが報告されている。このためN-RasをPBCの治療標的とすることで免疫細胞と組織の相互反応についても抑制が行えると考える。

次に申請者はRas阻害薬であるFarnesylthiosalicylic acid (FTS)の免疫抑制作用についても確認を行っている。T細胞系培養細胞であるJurkat細胞にCD3刺激を与えた際にIL-2をはじめとする炎症性サイトカイン産生が誘導される。この系を用いFTSによるJurkat細胞のIL-2産生抑制能を解析した。これによりCD3刺激によるJurkat細胞のIL-2産生はFTS濃度依存性に抑制されることが示された。特に投与時のヒト血中濃度に当たる5-10 μ MでもIL-2産生を抑制する事が示された。また100 μ Mという高濃度であっても細胞死はほとんど誘発されず細胞毒性も低いことが示された。FTSの米国での治験におい

て肺癌の Phase I、白血病の Phase II study で重篤な副作用はほとんどなく Grade1-2 程度の副作用が大部分であったと報告されている。これらより Ras 阻害薬は T 細胞へ免疫抑制作用を有し、毒性の低い薬剤であるといえる。そして本研究が遂行された際には FTS は迅速に臨床において慢性進行性肝炎患者に使用できると考える。

この二つの知見を元に本研究では慢性進行性肝炎における Ras の病態への関連性を解析し、FTS を中心とした Ras 阻害薬を用いた治療の妥当性を検討する。本研究により今まで難治とされていた慢性進行性肝炎に新たな治療を進展させ、不幸な転帰をたどる患者を減らすことで公共の福祉へと繋がると考える。

3. 研究の方法

本研究では Ras 変動を認める慢性進行性肝炎の抽出及び、Ras 阻害薬による抗炎症作用の評価を行った。これらを解析することで Ras 阻害薬による慢性進行性肝炎の治療開発の礎とする。そのため本申請は主に下記の計画で研究を行った。

(1)慢性進行性肝炎 CD4⁺T 細胞の Ras および炎症関連分子の発現解析

(2)Ras 阻害薬による慢性進行性肝炎で亢進する炎症関連分子抑制能の解析

(3)各肝炎モデルを用いた Ras 阻害薬の炎症作用の解析

(1)慢性進行性肝炎 CD4⁺T 細胞の Ras および炎症関連分子の発現解析

対象は慢性進行性肝炎患者 (AIH、PBC) と健常人とした。対象の末梢血から magnetic cell sorter を用いて CD4⁺T 細胞を単離し totalRNA の抽出を行う。得られた検体より定量的マイクロアレイと RT-PCR(qRT-PCR)を行い炎症分子の変動を解析し、その病態機序および Ras 阻害剤の適応を解析する。

(2)Ras 阻害薬による慢性進行性肝炎で亢進する炎症関連分子抑制能の解析

Ras 阻害薬存在下で Jurkat 細胞および検体 CD4⁺T 細胞に対し抗 CD3/28 抗体刺激および各腫サイトカイン刺激を与え 1) で得られた炎症関連分子の発現変動を解析した。

・ Jurkat 細胞での検証

Jurkat 細胞を用いて細胞刺激による各炎症関連分子の発現系を構築し、Ras 発現と各炎症関連分子発現の相互性を検証した。

・ 患者 CD4⁺T 細胞を用いての検証

健常人 CD4⁺T 細胞を用い a. により得られた Ras 発現に相互性を持つ炎症関連分子と Ras 阻害薬による炎症関連分子の抑制を検証した。

(3)肝炎モデルを用いた Ras 阻害薬による

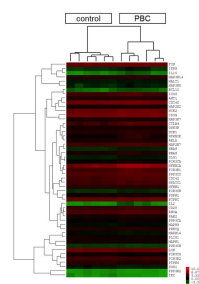
抗炎症作用の解析

本解析では PBC モデルを胆管上皮細胞とヒト CD4⁺T 細胞の共培養により構築した。これを用い Ras 阻害剤の機能解析を行った。

4. 研究成果

(1)慢性進行性肝炎 CD4⁺T 細胞の Ras および炎症関連分子の発現解析

PBC ではマイクロアレイにより PBC (7 例) 健常人 (7 例) の CD4⁺T 細胞の遺伝子発現解析を行った。これにより PBC では N-Ras を中心とし TCR signaling pathway の亢進が認められた。これらのうち N-Ras, MAP3K8, IL-2, IL-10, IFN- の優位な亢進が qRT-PCR により再現された。



AIH での解析でのマイクロアレイによる解析では未治療 AIH(nAIH, 2 例)、寛解 AIH(tAIH, 8 例)、健常人(7 例)の CD4⁺T 細胞の遺伝子発現解析を行った。これにより AIH では JAK-STAT シグナルの亢進及び TGF シグナルの低下が認められた。

(2)Ras 阻害薬による慢性進行性肝炎で亢進する炎症関連分子抑制能の解析

11 種の Ras 阻害剤 (非公開) の存在下で Jurkat 細胞に抗 CD3/28 抗体による TCR 刺激を行った。これにより 3 種の Ras 阻害剤が TCR シグナルを抑制し、炎症性サイトカインである IL-2 の産生を抑制した。次いでこれらの 3 つの Ras 阻害剤存在下でヒト CD4⁺T 細胞に TCR 刺激を行った。これにより、Ras 阻害剤はヒト CD4⁺T 細胞の IL-2、IFN- 産生を抑制した。

(3)各肝炎モデルを用いた Ras 阻害薬の炎症作用の解析

ヒト CD4⁺T 細胞と胆管上皮の共培養による PBC in vitro モデルの構築を行った。TCR 刺激を行った CD4⁺T 細胞をヒト胆管上皮細胞に加えることで、PBC で公知となる炎症性ケモカインが胆管上皮より産生されるモデルを構築した。今後は Ras 阻害剤を用い検討を行う予定である。

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 1 件)

査読有り、Nakagawa R, Muroyama R, Saeki C, Goto K, Kaise Y, Koike K, Nakano M, Matsubara Y, Takano K, Ito S, Saruta M, Kato N, Zeniya M. miR-425 regulates inflammatory cytokine production in CD4⁺ T cells via N-Ras upregulation in primary biliary cholangitis. *J Hepatol* 2017; 66: 1223-30.

〔学会発表〕(計 8件)

Nakagawa R. et al. Integral miRNA-mRNA analysis indicates novel therapeutic strategy for autoimmune liver diseases. Japan Digestive Disease Week 2017, International Session (Symposium)1, Autoimmune liver diseases in Asia. 2017.

中川ら. Ras を標的とした原発性胆汁性胆管炎の新規治療法開発. 第 53 回日本肝臓学会総会、WS10 難治性肝胆道疾患 (PBC/PSC/AIH) 診療の 進歩と今後の課題. 2017

中川ら. 寛解時自己免疫性肝炎の CD4+T 細胞では JAK-STAT signaling pathway が活性化している. 第 103 回日本消化器病学会総会. 2017.

中川ら. microRNA-mRNA 統合解析による自己免疫性肝疾患の病態解明と新規治療標的分子の探索. 第 42 回日本肝臓学会西部会、シンポジウム 3 自己免疫性肝疾患の最前線. 2017.

Nakagawa R. et al. Decreased miR-425 induced inflammatory cytokine production via N-Ras upregulation in CD4+ T cells of primary biliary cholangitis. The International Liver Congress 2016, EASL. 2016.

中川ら. Ras を標的とした原発性胆汁性肝硬変の新規治療法の開発. 第 52 回日本肝臓学会総会. 2016

中川ら. 自己免疫性肝炎患者の CD4+T 細胞では寛解状態でも JAK-STAT シグナル伝達系が活性化している. 第 103 回消化器病学会. 2016

Nakagawa R. et al. Ras inhibitors suppress the inflammatory cytokine production in T cells of primary biliary cholangitis. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference in Nagasaki. 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○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

6. 研究組織
(1) 研究代表者
中川 良 (Nakagawa, Ryo)
千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員
研究者番号：60594596

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()