

令和元年8月28日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19364

研究課題名(和文) エピジェネティックアプローチによる肝線維化治療の開発

研究課題名(英文) Epigenetic approach to antifibrotic treatment for liver fibrosis

研究代表者

鍛治 孝祐 (Kaji, Kosuke)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：20623490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：グローバルなメチル化を担うDNMT1の阻害による新しい抗肝線維化治療の開発を目的に基礎的検討を行った。DNMT1阻害薬である5-azadCが肝星細胞(LX-2)の増殖、線維化マーカー発現を濃度依存的に抑制させることを明らかとした。また同剤により肝星細胞の老化が促進された。さらにマウス肝線維化モデルにおいて5-azadC投与により、肝線維化、線維化マーカー発現が有意に抑制されていたことを病理学的に明らかとした。

網羅的メチル化解析では、5-azadC投与により肝星細胞におけるTGF- β 、NF- κ B、CyclinDなどの低メチル化状態を呈しており、RASAL1の脱メチル化が顕著に認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝疾患治療において肝線維化を直接抑制する治療法の開発は大きな課題であり、本研究ではDNMT1阻害によるメチル化制御を介した活性化肝星細胞の細胞老化を伴った新たな治療の可能性を見出した。また網羅的メチル化解析を行い、肝線維化治療の効果を予測し得る新規のエピジェネティックマーカーの開発に有用なデータ結果を見出した。本研究の結果から、“治療効果予測に基づく個別化医療”が可能となり、将来的に肝硬変患者の治療効果および予後を改善するのに大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel antifibrotic therapy targeting DNMT1. 5-azadC, a DNMT1 inhibitor, significantly inhibited proliferation and downregulated expressions of fibrotic markers in the activated hepatic stellate cells (Ac-HSC) in concentration dependent manners. Moreover, 5-azadC potently promoted a cellular senescence in Ac-HSCs. In murine models of liver fibrosis, 5-azadC suppressed a pathological liver fibrosis development with downregulation of hepatic expressions associated with profibrotic markers.

Comprehensive DNA methylation analysis elucidated that 5-azadC induced hypomethylation in CpG loci associated with TGF- β , NF- κ B, and Cyclin D in the Ac-HSCs. Remarkably, 5-azadC induced demethylation in CpG loci associated with RASAL1 which is involved in persistent liver fibrosis development.

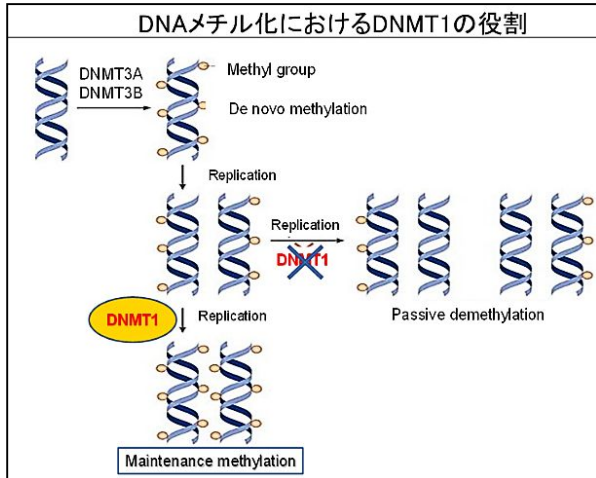
研究分野：肝線維化

キーワード：DNMT1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

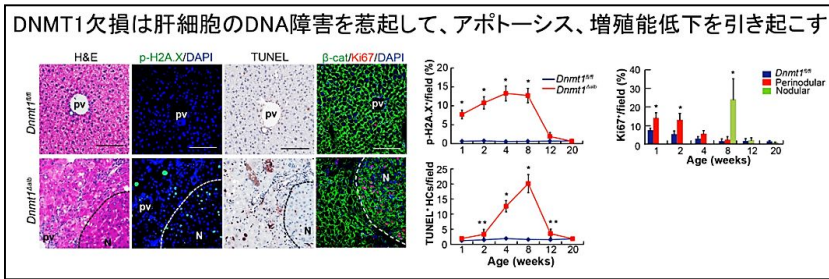
1. 研究開始当初の背景

慢性肝炎患の線維化進展の終末像である肝硬変は長年にわたり、予後不良で非可逆的なステージとして考えられてきた。そのため、線維化改善に向けた治療戦略の開発は現在も重要な研究



課題である。我々はこれまでに、既存の薬剤を用いて、肝線維化進展に重要な役割を果たす肝星細胞(HSC)の活性化、増殖抑制をターゲットにした肝線維化治療の開発を行ってきた。ところが、実臨床では単独薬剤による効果は不十分であり、新規の肝線維化治療薬の開発が望まれている。一方で、近年エピジェティクスに注目した病態の解析、治療へのアプローチが進んでいる。維持メチル化を担う DNMT1 は、各臓器の組織発生、再生に深く関与していることが知られている。肝細胞特異的 DNMT1 欠損マウス(KO)において、生後初期の増殖の盛んな時期の肝細胞では、著明に DNA 障害が惹起され、アポトーシス、細胞老化および細胞増殖能の低下を引き起こすことが報告さ

れている。そこで本研究では、“DNMT1 が増殖過程にある肝細胞の生存、恒常性維持に必須である”という病態メカニズムを、肝星細胞を標的とした治療へ応用し、“DNMT1 阻害による肝星細胞の活性化、増殖抑制を介した新しい抗肝線維化治療の開発”および“肝線維化治療の効果、予後の予測に有用な新規エピジェネティックマーカーの検索”を目標とする。



2. 研究の目的

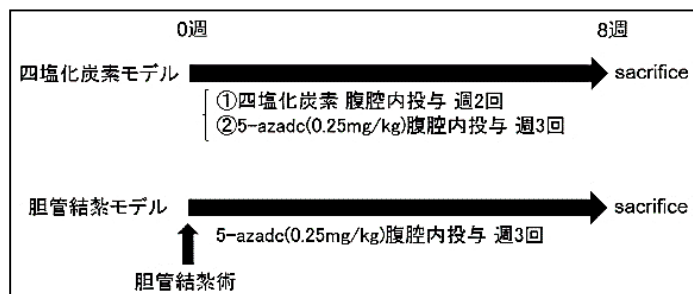
(1) 我々はこれまでに ACE 阻害薬や ARB などの降圧剤、DPP4 阻害薬などの糖尿病治療薬、さらに PDGFR 阻害薬などの分子標的治療薬が肝星細胞の活性化や増殖を抑制させることにより抗肝線維化抑制効果を示すことを報告してきた。今回我々は、DNA メチル化の制御因子である DNMT1 の阻害効果による肝線維化治療への応用の可能性を基礎的に検討する。DNMT1 阻害薬 (5-aza-2'-deoxycytidine:5-azadC) (一般名:Decitabine)は 2006 年に米国で承認され、臨床でも骨髄異形成症候群などの治療に使用されている。さらに過去には肝星細胞における PTEN や Smad7 のメチル化と DNMT1 との関与が報告されており、DNMT1 阻害による肝星細胞の活性化、増殖の抑制効果が示唆されている。そこで、まずヒト肝星細胞株を用いた in vitro の検討で、5-azadC の肝星細胞の増殖、コラーゲン産生能に対する抑制効果を評価する。さらに in vivo で、2 種類の肝線維化モデルマウス(四塩化炭素投与、胆管結紮)に 5-azadC を投与して、肝線維化抑制効果を評価する。

(2) (1)での検討結果を進展させ、5-azadC によって DNA メチル化を阻害した肝星細胞株、各肝線維化モデルマウスの肝組織より分離した Genomic DNA を用いて、メチル化特異的 microarray の手法により各遺伝子のメチル化状態の程度を網羅的に解析する。さらに、有意にメチル化の低下した遺伝子のうち、過去のデータベースより肝線維化に関連する遺伝子を抽出し、肝線維化治療効果、および予後予測に有用な新たなエピジェネティックマーカーを検索する。

3. 研究の方法

細胞試験: ヒト肝星細胞株 (LX-2)に 5-azadC を投与し、増殖能 (WST assay)、アポトーシス (FACS 解析)、コラーゲン産生能 (RT-PCR 法、Western blotting 法)を検討する。

マウス試験: in vivo における有効性を十分に検討するため、2 種類のモデルマウスを使用する。CCl₄ 誘発肝線維化誘発マウスに 5-azadC (0.25mg/kg を週 3 回腹腔内投与)を CCl₄ と同時期で投与し、8 週間後にマウスを犠死させ、病学的に肝線維化の程度、肝線維化関連マーカーを評価する。さらに胆管結紮誘



発した。さらに胆管結紮誘

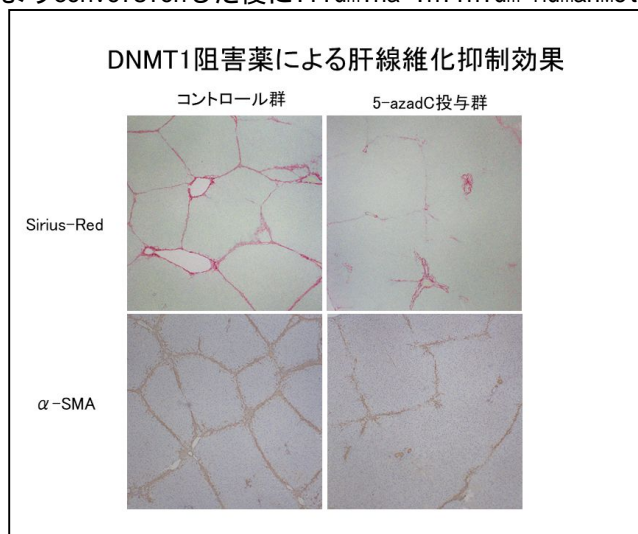
発肝線維化マウスに術後より同量の 5-azadC を投与して、8 週間後に犠死させ、同様の評価を行う。

網羅的メチル化解析：上記のサンプルより分離した Genomic DNA を Bisulfite 反応により conversion した後に Illumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip array (Illumina 社) を用いて網羅的な CpG islands の同定を行う。

4 . 研究成果

(1)DNMT1阻害による肝星細胞の活性化、増殖抑制を介した新しい抗肝線維化治療の開発を目的に基礎的検討を行った。まず in vitro での検討において DNMT1 阻害薬である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) が肝線維化において重要な役割を果たす肝星細胞(ヒト活性化肝星細胞株)の増殖を濃度依存的に抑制し、線維化マーカーである α -SMA、TGF- β 、collagen1A1 およびCTGFのmRNA、蛋白発現を有意に低下させることを明らかとした。また同剤によりX-galで染色される肝星細胞の老化が促進され、細胞老化マーカーであるp21,p16,p27の発現が上昇していた。さらに in vivo で2種類のマウス肝線維化モデル(1.四塩化炭素 (CCl4) 投与、2.胆管結紮)において5-azadC (0.25mg/kgを週3回腹腔内投与)投与により、肝線維化が有意に抑制され、それに伴い肝内線維化マーカー発現 (α -SMA、TGF- β 、collagen1A1など)が有意に抑制されていたことを病理学的に明らかとした。上記の研究結果により、DNMT1を阻害することで増殖過程にある肝星細胞をターゲットとして、細胞老化の促進を介して増殖や線維化活性を抑制させることが明らかとなった。肝線維化治療におけるエピジェネティックなアプローチは現在まであまり行われておらず、今回使用したDNMT1阻害薬はDNAメチル化を介して肝線維化を抑制する可能性が示唆され、新たな抗線維化治療の開発に有用であると考えられる。

(2) 5-azadC で処理を行ったヒト活性化肝星細胞株より分離したGenome DNAをBisulfite 反応によりconversionした後にIllumina Infinium HumanMethylation450K BeadChip array (Illumina



社)を用いて網羅的なCpG islandsの同定を行った。TGF- β 、NF- κ B、CyclinDなどの制御の関連するCpG lociは低メチル化状態を呈しており、さらに、RASAL1の脱メチル化が顕著に認められた。RASAL1のメチル化は肝線維化の持続化に関連しており、5-azadCによる肝線維化抑制にRASAL1の脱メチル化が関与している可能性が考えられた。また、5-azadC処理により活性化肝星細胞におけるPTENの発現が上昇しており、これが活性化肝星細胞におけるERKやPI3K/AKTシグナルを抑制することで肝星細胞のviabilityを抑えていることが明らかとなった。さらにこの5-azadCによるPTENの発現上昇はsiRNAによりDNMT1をknockdownすると認められず、

DNMT1による制御が確認できた。5-aza-Cを投与したマウス肝におけるメチル化解析では、TGF- β gene signatureにおける脱メチル化が顕著であるのに加え、LPS/TLR4/NF- κ B signaling、Nrf2/Keap-1 signalingに関わる遺伝子での脱メチル化が認められた。これまでの結果と併せて、DNMT1阻害による肝線維化の抑制には、活性化肝星細胞におけるRASAL1の脱メチル化およびPTENの発現上昇に加え、肝組織内のglobalな脱メチル化による微小環境への影響が関与している可能性が示唆された。

参考文献

1. Song J, Teplova M, Ishibe-Murakami S, Patel DJ. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science* 2012;335:709-712.
2. Sen GL, Reuter JA, Webster DE, Zhu L, Khavari PA. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature* 2010;463:563-567.
3. Kaji K, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Tomokuni A, Marquardt JU, Matter MS, Hoang T, Conner EA, Thorgeirsson SS. DNMT1 is a required genomic regulator for murine liver histogenesis and regeneration. *Hepatology*. 2016 Aug;64(2):582-98.
4. Bian EB, Huang C, Wang H, Chen XX, Zhang L, Lv XW, Li J. Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Toxicol Lett*. 2014 Jan 13;224(2):175-85.

5 . 主な発表論文等

現在作成中

6 . 研究組織

研究協力者：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。