

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15584

研究課題名(和文) Wnt/ $\beta$ -カテニン/CBPシグナル阻害剤による肝線維化の改善と作用機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism by which a Wnt/beta-catenin/CBP signaling inhibitor ameliorates NASH-induced liver fibrosis

研究代表者

山地 賢三郎 (YAMAJI, Kenzaburo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：40508628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の罹患数は世界的に増加傾向にある。特に肝線維化の進展が予後や発がんに寄与することからその治療が重要となるが、NASH肝線維症治療薬は存在しない。PRI-724はB型およびC型肝炎ウイルスに起因する肝硬変を対象として開発が進んでいるが、本研究ではPRI-724がNASHに起因する肝線維症/肝硬変の治療薬となりうるか検討した。PRI-724は肝星細胞でのコラーゲン合成抑制とマクロファージや好中球が産生されたコラーゲン線維分解酵素亢進の2つの作用機序を有する薬剤であり、NASH肝線維症の治療薬となりうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHを含めて肝硬変や肝不全に対しては、肝移植以外にまだまだ有用な根治的治療法はない。しかし、肝移植にはドナー不足や患者負担などの大きな問題がある。米国では肝移植が必要な疾患の第一位はNASHであり、大きな問題になっている。PRI-724はB型およびC型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者を対象として開発が進んでいる薬剤であるが、本研究ではNASHに起因する肝硬変に対してもPRI-724は治療薬となりうる可能性を示す結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：NASH is a progressive fibrotic disease, which increasing the risk of developing hepatocellular carcinoma, however, there are still no efficient therapeutic strategy. In the present study, we examined efficacy of PRI-724 treatment to NASH-related liver fibrosis and characterized the mechanism of PRI-724 efficacy. By daily administering PRI-724 in NASH-induced liver fibrosis mice, normalization of hepatic architecture and decrease of collagen fibrils were observed after administration of PRI-724. Hepatic expressions of SMA, type I and type III collagens, liver fibrosis markers, were significantly decreased. Moreover, expression of matrix metalloproteinase Mmp8 and Mmp9 in the liver were significantly increased. PRI-724 increased MMP-9 production in liver neutrophils and macrophages, therefore, MMP-9 is possibly contributing the improve of liver fibrosis. In conclusion, PRI-724, a selective Wnt/ $\beta$ -catenin/CBP inhibitor, shows therapeutic effect for NASH-related liver fibrosis/cirrhosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 肝線維化  $\beta$ -カテニン/CBPシグナル阻害剤

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝がんは予後が不良な疾患であり、世界的にはがんによる死因の第2位である。肝がんの原因はB型あるいはC型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染による慢性肝疾患であり、我が国ではC型肝炎を背景とした肝がんが多い。最近ではHCVに関連した肝がん患者は減少傾向にあり、肝炎ウイルス感染のない、いわゆる非B非C型肝炎が増加傾向にある。その原因のひとつはメタボリック症候群や肥満などでみられる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)の増加である。NAFLD患者の10-20%が肝硬変や肝細胞がんに進行する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) であり、NASH患者の5-20%が肝硬変に進行するといわれる。NASHにおいて、肝線維化の進展がその予後や発がんに寄与することからその治療が重要となるが、NASH肝線維化/肝硬変の治療を含めてNASHに対する薬物療法は存在しない。

PRISM Pharma社が創製したPRI-724は、 $\beta$ -カテニンとCREB-binding protein (CBP)との結合を選択的に阻害することでWntシグナル伝達を阻害する化合物であり、固形がんや白血病の治療薬として臨床試験が実施された。最近、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルが組織の線維化に関与することが報告され、肝線維化に対する新たな標的と考えられている。研究代表者は、当研究室で作製したHCV誘発肝線維化モデルマウスにPRI-724を6週間投与したところ、1) 肝臓のコラーゲン量が減少し線維化が著しく改善されること、2) その機序にマクロファージや好中球から産生されるmatrix metalloproteinase (MMP)-8やMMP-9が関与している可能性を見出している (*Sci. Rep.*, 2017)。さらに、都立駒込病院などにおいてC型肝炎患者を対象とした医師主導型治験が開始された。

研究代表者は、NASH肝線維化モデルマウスを用いてPRI-724がNASH肝線維化に対する治療薬としての有用性を検討したところ、肝線維化の減弱が認められた。これらの結果から、PRI-724がNASHに起因する肝線維化の治療薬となる可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

肝線維化/肝硬変を改善させる薬剤や治療法は定まっておらず、その進行を遅らせることにとどまっているのが現状である。NASH患者は年々増え続けており、総人口の2-5%がNASH罹患患者であると考えられている。NASH患者の5-20%が肝硬変に進展することから、肝細胞がんのリスクファクターであるNASH肝硬変に対する対策が今後はますます重要になる。

現在、C型肝炎患者を対象にPRI-724の医師主導型治験が進んでおり、新たな抗線維化薬候補として期待されている。一方、C型肝炎から肝硬変に進行する機序とNASHから肝硬変に進展する機序は異なるという報告があり、PRI-724がNASH肝硬変の治療薬となりうるかを考えるうえで、作用機序を明らかにする必要がある。本研究の目的は、Wnt/ $\beta$ -カテニン/CBPシグナル阻害剤PRI-724がNASHに起因する肝線維化を減弱させる機序を明らかにすることを目的とし、PRI-724のNASH肝線維化/肝硬変に対する治療薬としての可能性について検証した。

### 3. 研究の方法

NASH肝線維化モデルマウスはコリン欠乏・メチオニン減量高脂肪食 (CDAHFD) をマウスに14週間与えることで作製し、その後PRI-724を20もしくは60 mg/kgを6週間腹腔内投与した。脱肝線維化の解析には、肝臓サンプルもしくは肝臓内リンパ球を用いた。

#### (1) PRI-724のコラーゲン合成系への作用解析

PRI-724のコラーゲン合成に関与する遺伝子レベルでの制御を解析する目的で、qPCRを用いた肝臓内mRNA発現解析を行った。変化の認められた分子については、イムノブロットティングによるタンパク質レベルでの解析を行った。

#### (2) PRI-724のコラーゲン分解系への作用解析

コラーゲン線維の分解に寄与するプロテアーゼ (MMP-2, 8, 9, 12, 13) やその阻害分子 (TIMP-1, 2) を中心に遺伝子発現変化を肝臓内mRNA発現解析により定量的に解析した。発現変化が検出された分子については、イムノブロットティングやELISA法などによりタンパク質レベルの比較解析および酵素活性を測定した。

#### (3) FACSや免疫組織学的解析を用いたMMP-9産生細胞の同定

PRI-724を投与したマウスから肝臓内リンパ球を分離し、FACSを用いてMMP-9産生細胞の同定を試みた。また、免疫組織化学染色を行うことでも同定を試みた。

### 4. 研究成果

NASH誘発性肝線維化モデルマウスを用いてPRI-724の抗線維化作用を検討した結果、PRI-724投与群でコントロール群と比較し肝線維化像において著しい改善が認められた。続いて、PRI-724の作用機序を明らかにするため、まず始めにコラーゲン線維の産生に対する影響を解析したところ、PRI-724投与群では、Vehicle投与群と比較してコラーゲン合成系 (*Col1a1*, *Col3a1*) および肝星細胞マーカー (*Desmin*) の遺伝子発現の低下、またI型およびIII型コラーゲンや $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) タンパク質の発現抑制が認められた (図1)。続いてコラー

ゲン線維分解系に着目して解析したところ、線維分解系に関わる遺伝子 (*Mmp8*, *Mmp9*) の有意な亢進が認められた (*Mmp8*: 3.5 倍, *Mmp9*: 5.9 倍)。さらに、フローサイトメトリーおよび免疫組織染色の結果から、MMP-9 はマクロファージや好中球が産生することが明らかとなった (図 2)。以上の結果から、PRI-724 は肝星細胞でのコラーゲン合成抑制とマクロファージや好中球が産生されたコラーゲン線維分解酵素亢進の 2 つの作用機序を有する薬剤であることが示された。これらの結果は、HCV 発現肝線維化マウスを用いた解析の結果とほぼ一致しており、PRI-724 による NASH 誘発性肝線維の脱線維化は、HCV 誘発性肝線維の脱線維化と同様の機序で起こっている可能性が示唆された。

NASH の発症によって肝脂肪化や肝細胞障害、肝線維化が惹起されるが、これらの解析を進める中で PRI-724 投与によって脱肝線維化と並行して肝臓の組織構造が正常化する興味深い作用が認められた。肝臓組織構造の正常化に伴い、肝機能に改善が認められるか検討したところ、PRI-724 投与群において、NASH 肝線維化によって延長したプロトロンビン時間が有意に遅延し、NASH 発症によって低下した肝アルブミン発現は有意に改善された。これらの結果から、PRI-724 の投与によって肝臓組織構造および肝機能が改善することも明らかとなった。

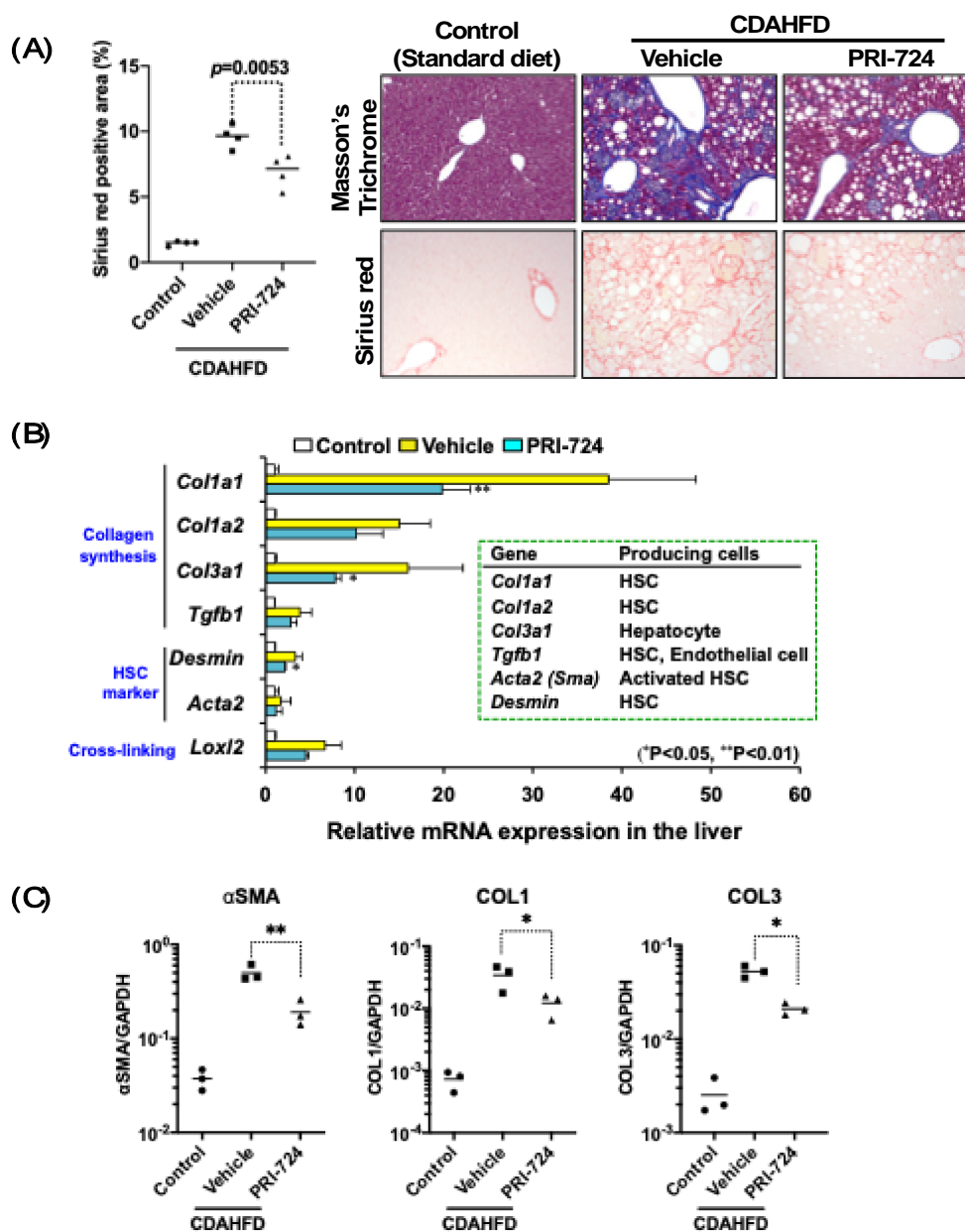
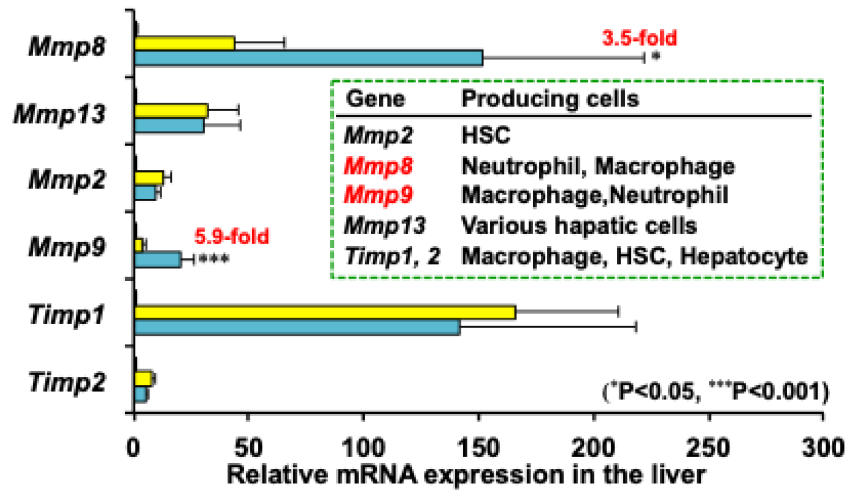


図1. PRI-724 投与によりコラーゲン合成が抑制されて肝線維が減少する

(A) 肝線維の定量化, (B) qPCRによる各種遺伝子発現解析, (C) WBによる各種タンパク質発現解析

(A)



(B)

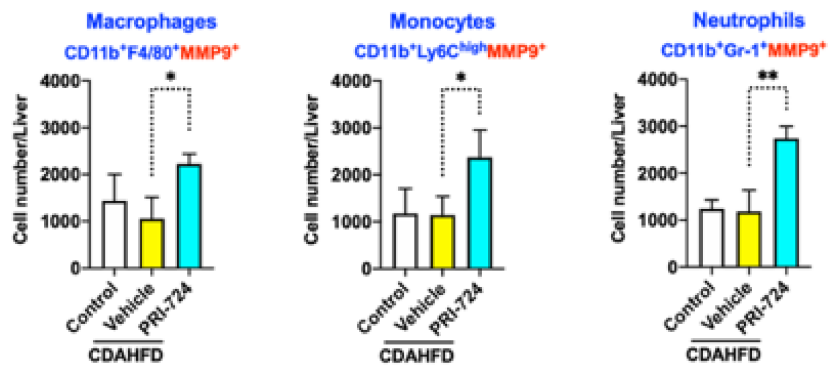


図2. PRI-724投与によりコラーゲン分解が促進される  
 (A) qPCRによる各種遺伝子発現解析, (B) FACSによるMMP-9発現細胞の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tokunaga Y, Osawa Y, Ohtsuki T, Hayashi Y, Yamaji K, Yamane D, Hara M, Munekata K, Tsukiyama-Kohara K, Hishima T, Kojima S, Kimura K, Kohara M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Selective inhibitor of Wnt/ -catenin/CBP signaling ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis in mouse model.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 325
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-00282-w	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 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kenzaburo Yamaji, Yuko Tokunaga, Daisuke Yamane, Bouchra Kitab, Yosuke Osawa, Kiminori Kimura, Chise Tateno, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara
2. 発表標題 CBP/ -catenin signaling inhibitor improved NASH-induced liver fibrosis and disorder.
3. 学会等名 Liver, Biology, Diseases & Cancer 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenzaburo Yamaji, Yuko Tokunaga, Daisuke Yamane, Bouchra Kitab, Yosuke Osawa, Kiminori Kimura, Chise Tateno, Yoichiro Hirose, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara
2. 発表標題 A CBP/ -catenin signaling inhibitor, PRI-724, improves NASH-induced liver fibrosis and disorder.
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenzaburo Yamaji, Yuko Tokunaga, Takahiro Ohtsuki, Yosuke Osawa, Kiminori Kimura, Go Sugawara, Yuji Ishida, Chise Tateno, Yoichiro Hirose, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Michinori Kohara
2. 発表標題 PRI-724, a selective inhibitor of Wnt/ -catenin/CBP signaling, ameliorates NASH-induced liver fibrosis
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuko Tokunaga, Kiminori Kimura, Kenzaburo Yamaji, Takahiro Ohtsuki, Yukiko Hayashi, Tsunekazu Hishima, Michinori Kohara
2. 発表標題 Intermittent administration of selective Wnt/ -catenin/CBP signaling inhibitor ameliorates hepatitis C virus-induced liver fibrosis
3. 学会等名 HCV2018: 25th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山地賢三郎、徳永優子、大槻貴博、大澤陽介、木村公則、小原道法
2. 発表標題 Wnt/ -catenin/CBPシグナル阻害剤PRI-724はNASHによる肝線維を消失させる。
3. 学会等名 第53回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大槻貴博、塩釜ゆみ子、徳永優子、山地賢三郎、保富康宏、小原道法
2. 発表標題 Heterologous prime-boost接種法によるC型肝炎ウイルス治療ワクチン効果の解析
3. 学会等名 第21回日本ワクチン学会学術集会
4. 発表年 2017年

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