

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15620

研究課題名(和文) 肝線維化を促進する蛋白ペリオスチンの機序解明と治療への展開

研究課題名(英文) The role of periostin in liver and strategy for hepatic fibrosis therapy: therapeutic application of periostin antisense oligonucleotide

研究代表者

杉山 晶子 (Sugiyama, Akiko)

広島大学・病院(医)・研究員

研究者番号：30788469

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)：細胞外マトリックス蛋白ペリオスチンは肝臓において線維化を促進する。本研究では、ペリオスチン受容体であるインテグリンに着目し肝線維化促進機序を明らかにするとともに、病態の異なる肝線維症モデルマウスを作製し、ペリオスチンアンチセンス核酸の抗線維化効果を評価することで、ペリオスチンの制御が肝線維化治療の新たな治療戦略となりうることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国を含め、アジアを中心としたウイルス性肝炎の罹患率は未だに高い状況である一方、肥満を背景とした非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)の罹患率も増加の一途をたどっており、肝線維化の病態解明とその治療開発は急務である。本研究を通し、ペリオスチンが肝線維化の新たな治療ターゲットとなりうることを提案する。

研究成果の概要(英文)：Periostin, a secreted matricellular protein, promotes hepatic fibrosis. We have investigated periostin-integrin interaction on hepatic stellate cells to reveal the mechanism of periostin on hepatic fibrosis. Moreover, to evaluate the potential treatment using periostin targeting of antisense oligonucleotide on hepatic steatosis and fibrosis, we used mouse NASH models. Our results indicate a critical role of periostin in the progression of hepatic steatosis and fibrosis both of which are critical aspect of NASH pathophysiology, and suggest that antisense oligonucleotide-based therapies targeting periostin have the potential strategies for the treatment of NASH.

研究分野：病態医科学

キーワード：ペリオスチン 肝線維化 肝星細胞 細胞外マトリックス インテグリン 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は、肝炎ウイルスの持続感染やアルコール多飲、脂肪沈着など種々の原因によって生じた慢性肝炎が治癒せず、肝線維化が高度に進展することで生理機能が維持できなくなった病態を指す。全国で40～50万人が罹患しており、肝臓病が多い我が国において国民の健康を害する要因の一つである。病態が進行することで肝臓癌や肝不全へと進む可能性があるが、有効な治療法は未だにない。近年、C型肝炎ウイルス起因の肝炎であれば飲み薬だけで9割以上が完治するようになった。しかし、線維化自体を抑制または改善する治療薬は存在せず、高度進行例や肝炎ウイルス以外の原因による肝硬変患者への治療開発は危急の課題である。

本研究で着目した細胞外マトリックス蛋白ペリオスチンは組織の構造維持に関与しているが、近年では細胞の接着や遊走、増殖、分化の制御など生物学的機能を有していることが明らかになり、大きな注目を集めている。ペリオスチンは皮膚の創傷治癒や肺や心臓の線維化の病態形成に重要な役割を果たすことが報告されており、申請者はこれまでの研究でペリオスチンが肝臓でも線維化において重要な役割を担っていることを明らかにした。

2. 研究の目的

ペリオスチンが肝線維化を促進する機序を受容体であるインテグリンとの相互作用を中心に明らかにすると同時に、肝線維症モデルマウスを作製し、ペリオスチンアンチセンス核酸を投与し肝線維化抑制効果を調査することで、新たな治療戦略の探索を目的とした。

3. 研究の方法

① 肝星細胞活性化に関わるインテグリンの同定と活性化機序の解明

ペリオスチン受容体であるインテグリンに着目し、線維化において中心的な役割を担う肝星細胞を用い、インテグリンサブタイプの同定を行った。

a) 肝星細胞株および初代培養肝星細胞におけるインテグリンの同定

肝星細胞におけるインテグリンサブタイプを同定するため、ヒト肝星細胞株 LX2 を用い real-time PCR による mRNA の解析、抗体標識を用いフローサイトメーターによる細胞表面上のインテグリンの発現を確認した。

b) インテグリン中和抗体による肝星細胞接着阻害試験

a) で発現が確認されたインテグリンとペリオスチン相互作用を調査するため、肝星細胞上で同定したインテグリンの中和抗体および siRNA をペリオスチン刺激した LX2 に同時添加し、細胞接着能の変化を定量した。

c) インテグリンにおけるペリオスチン認識部位の同定

ペリオスチンの各ドメインに対するインテグリンの結合を、LX2 を用いた接着阻害試験により評価した。

② ペリオスチンアンチセンス核酸による肝線維化治療効果の評価

肝線維症モデルマウスに対しペリオスチンアンチセンス核酸を投与し、線維化抑制効果を評価した。

a) 急性肝障害モデルにおけるペリオスチンアンチセンス核酸の効果

四塩化炭素 (CCl₄) 単回投与 による急性肝障害モデルマウスを作製し、ペリオスチンアンチセンス核酸を腹腔内に同時投与を行った。肝臓を採取し、経時的なペリオスチンの発現変化を

real-time PCR (qPCR) や immunoblot、免疫組織化学染色を行い、ペリオスチンの発現抑制効果および、抗線維化効果を評価した。

b) 慢性肝障害モデルにおける線維化抑制効果

病態の異なる慢性肝障害(薬剤性; CCl₄, NASH; コリン欠乏高脂肪飼料 (CDAHFD))モデルを製作し、肝臓における Collagen の蓄積を immunoblot や Azan 染色, Hydroxyproline の定量により評価した。また線維化関連遺伝子, 蛋白の発現の変化を qPCR および immunoblot, 免疫組織化学染色により確認した。

c) NASH モデルにおける脂肪肝改善効果

肝臓における中性脂肪の蓄積を評価するため、Oil red O 染色を行った。また血中および肝臓の脂質濃度を測定した。脂肪酸の β 酸化関連遺伝子, 蛋白の発現の変化は qPCR および immunoblot にて評価した。

4. 研究成果

① 肝線維化促進機序の解明

LX2 においてペリオスチン受容体として報告されているインテグリン $\alpha v \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 5$ の発現を確認した。中和抗体および siRNA による αv インテグリン阻害や発現抑制を行い、肝星細胞の接着能、活性化・線維化マーカーへの影響を解析すると、 $\alpha v \beta 5$ の中和抗体の使用により有意な接着能の低下を認め、さらに $\alpha v \beta 3$ 中和抗体の併用により相加的な接着阻害効果を認めた。また LX2 におけるインテグリン αv の発現抑制は、ペリオスチンへの細胞接着を抑制し、 α SMA、Collagen1a1 の有意な発現低下を認めた。以上の結果より、ペリオスチン-インテグリン αv 相互作用が肝星細胞の活性化・線維産生能に重要な役割を果たしていることが考えられた。肝星細胞の活性化、線維化には肝星細胞表面の細胞接着分子インテグリン $\alpha v \beta 5$, $\alpha v \beta 3$ が関与していることが示唆された。さらにペリオスチン認識部位の同定のため、ペリオスチンを各ドメインに分け接着試験を行うとドメイン 1 および 3 において接着が認められた。

② ペリオスチンアンチセンス核酸による肝線維化治療効果の評価

急性肝障害モデルマウスにおいてペリオスチンアンチセンス核酸はペリオスチンおよび、線維化関連遺伝子 (α SMA, Collagen1a1) の発現を抑制した。

CCl₄ および CDAHFD による慢性肝障害モデルマウスにペリオスチンアンチセンス核酸を投与すると、CDAHFD による NASH モデルにおいて肝臓で上昇したペリオスチンの発現が有意に低下した。それに伴い、線維化マーカーである α SMA, Collagen1a1 および細胞外マトリックス分解酵素である MMP-2, MMP-9 の有意な発現低下と、肝組織での線維化面積とコラーゲン含有量の減少を認めたことから、線維化モデルマウスにおいてペリオスチンアンチセンス核酸の抗線維化作用が示された。また TNF- α および IL-6 の発現低下を認めたことから、線維化の減弱に伴う炎症抑制作用も示唆された。さらに興味深いことに、NASH モデルにおいてペリオスチンアンチセンス核酸投与群は非投与群に比べて肝組織での中性脂肪蓄積量の有意な減少が観察された。また血清の中性脂肪, コレステロール, 遊離脂肪酸の上昇、脂肪酸の β 酸化を制御する PPAR α と関連遺伝子である Cpt1a, Acox, Mcad の有意な発現上昇および、脂肪酸分解産物である β -ヒドロキシ酪酸の血中増加を認めたことより、ペリオスチンアンチセンス核酸投与による脂肪蓄積の抑制効果は脂肪酸の分解促進に起因する可能性が示唆された。以上より、ペリオスチンの制御は肝線維化そして NASH の新たな治療戦略となりうることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. 杉山晶子, 菅野啓司, 田妻進. 肝線維化におけるペリオスチンの役割とその作用メカニズム. 肝胆膵 74(1): 27-33, 2017.
2. Mino M, Kanno K, Okimoto K, Sugiyama A, Kishikawa N, Kobayashi T, Ono J, Izuhara K, Kobayashi T, Ohigashi T, Ohdan H, Tazuma S. Periostin promotes malignant potential by induction of epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology Communication*. 2017 Oct 25;1(10):1099-1109.
【査読あり】

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Mino M, Sugiyama A, Kanno K, Okimoto K, Ono J, Kishikawa N, Kobayashi T, Kobayashi T, Ohdan H, Tazuma S. Periostin promotes malignant potential by induction of epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma, 118th Annual Meeting, American Gastroenterological Association (Chicago, USA). May 2017
2. Kobayashi T, Kanno K, Sugiyama A, Nguyen PT, Kishikawa N, Otani Y, Tazuma S: Periostin antisense oligonucleotide prevents hepatic steatosis and fibrosis in mice: A novel strategy for nonalcoholic steatohepatitis treatment. 69th Annual Meeting, American Association for the Study of Liver Disease (San Francisco, USA). November 2018

〔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：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。