

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82685

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15768

研究課題名(和文) NASHにおけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナルを介した肝線維化の病態解明研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of liver fibrosis mediated by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway signal in NASH

研究代表者

木村 昌倫 (Kimura, Masamichi)

東京都立駒込病院(臨床研究室)・肝臓内科・非常勤医師

研究者番号：20805262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は国内に1000万人、その内、肝硬変や肝癌へと進行する非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は200万人いると推定されている。NASHの肝線維化は、インスリン抵抗性や酸化ストレスなどの様々な因子が肝臓に作用することで進展していくと考えられている。本研究の目的は、NASHにおけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナルを介した肝線維化機序の解明とWnt/ $\beta$ -catenin阻害剤であるPRI-724の抗線維化作用の解析であった。PRI-724はNASH肝線維化モデルにおいても抗線維化作用を認めた。また、肝細胞のCBPシグナルと肝線維化についても新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、Wnt/ $\beta$ -catenin阻害剤であるPRI-724をHCV Tg マウス及びC型肝硬変患者に投与して良好な抗線維化作用を確認した。本研究はHCVとは病態の異なるNASHモデルでの抗線維化作用の検討及びそのメカニズムを解明することを目的とした。結果的にNASHモデルにおいても、PRI-724投与により他の線維化モデルと同様に肝線維化の有意な改善が認められた。またCBP-flox/ALB-Creマウスを樹立し、肝細胞のCBPシグナルが肝線維化に作用する機序に関する新たな知見を得た。抗線維化治療薬が実現すれば、肝不全への進行や肝発がんを予防でき、肝硬変患者の予後の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is estimated that there are 10 million people in Japan with non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD), of which 2 million have non-alcoholic steatohepatitis (NASH) that progresses to cirrhosis and liver cancer. Liver fibrosis in NASH is thought to progress by the action of various factors such as insulin resistance. The purpose of this study was to elucidate the mechanism of liver fibrosis mediated by Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in NASH and to analyze the antifibrotic effect of PRI-724, a Wnt/ $\beta$ -catenin inhibitor. PRI-724 also showed an antifibrotic effect in the NASH liver fibrosis model. We also obtained findings on CBP signals in hepatocytes and liver fibrosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝硬変 肝線維化 NASH Wntシグナル

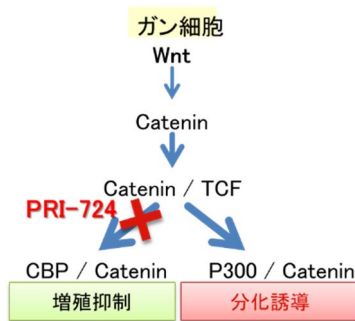
#### 1. 研究開始当初の背景

肝硬変に対して実用化された抗線維化治療薬は現時点ではない。近年、肝臓を含めた臓器の線維化には Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが重要であることが明らかになった。申請者らのグループは、Wnt/ $\beta$ -catenin 阻害薬である PRI-724 を HCV Tg マウス及び C 型肝硬変患者に投与して良好な抗線維化作用を確認した。本研究は HCV とは病態の異なる NASH 肝線維化モデルでの抗線維化作用の検討及びそのメカニズムを解明することが目的である。計画している具体的な研究項目は、肝臓内の Wnt/ $\beta$ -catenin のシグナル発現解析、PRI-724 の抗線維化作用の解析、肝臓内炎症細胞の脱線維化メカニズムの解明、の 3 つである。PRI-724 が NASH でも抗線維化作用があることが示せば、国内に 200 万人いると推定される NASH 患者にとって画期的な治療薬になると期待され、更に肝臓以外の他臓器の線維症にも治療効果を有する可能性があり、治療適応が拡大することが期待される。

#### 応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

非アルコール性脂肪性肝疾患(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)は国内に 1000 万人、その内、肝硬変や肝癌へと進行する非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は 200 万人いると推定されている。NAFLD の病因として肥満・糖尿病・脂質異常症などのインスリン抵抗性を基盤とする疾患が指摘されており、食の欧米化や運動不足により、肥満や糖尿病が増加していることから今後 NAFLD/NASH は増加すると予想されている。NASH から肝硬変へは 5-10 年で約 5-20%で進行するとされ、肝線維化が高度な例では 5 年で約 15%に発癌がみられると報告されている。実際、NASH における肝疾患死亡率は増加しており、肝線維化抑制を踏まえた NASH 治療は NASH 患者の予後改善のために極めて重要である。しかしながら、進行した肝線維化状態に対して抗線維化作用を示す実用化された薬物は現時点ではない。臓器線維症には Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが重要であることが報告されており、近年、Wnt シグナル伝達を阻害し、 $\beta$ -catenin と CREB-binding protein(CBP)の蛋白相互作用を選択的に阻害できる化合物 PRI-724(下図参照)が発見された。この化合物は、元々癌幹細胞をターゲットに開発され、CBP と  $\beta$ -catenin の結合を阻害することにより細胞増殖を強力に抑制し、相対的に p300 と  $\beta$ -catenin の結合を増加させることにより分化を誘導する効果も確認された。申請者らは C 型肝硬変の患者に PRI-724 を投与してヒトでの安全性、忍容性の検討を行う第 Ⅰ 相臨床試験を実施し、PRI-724 は良好な抗線維化作用を示した(EBioMedicine;2017)。

NASH の肝線維化は、インスリン抵抗性や酸化ストレスなどの様々な因子が肝臓に作用することで進展していくと考えられている。本研究の目的は、これまでのモデルとは線維化のメカニズムが異なる NASH における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを介した肝線維化メカニズムの解明と Wnt/ $\beta$ -catenin 阻害剤である PRI-724 の抗線維化作用の解析が必要であるという着想に至った。



## 2. 研究の目的

Wnt シグナル阻害剤の PRI-724 が抗線維化作用を有することを四塩化炭素投与による肝線維化モデルマウス及び C 型肝硬変患者で確認した。今回、四塩化炭素や C 型肝炎とは病態の異なる NASH 肝線維化モデルに対して PRI-724 を投与することで、NASH に対する抗線維化作用を確認し、NASH における肝線維化メカニズムを解明することを目的としている。

申請者らは四塩化炭素投与による肝線維化モデルマウス及び C 型肝硬変患者に Wnt シグナル阻害剤である PRI-724 を投与し、良好な抗線維化作用を認めた。更に PAS 染色とチトクローム C 染色では、PRI-724 投与後には肝細胞が強陽性を示しミトコンドリアの機能の改善が示唆された。ミトコンドリア障害に起因する酸化ストレスが NASH の病態進展に重要な役割を担っているとされる。これまで NASH の線維化に対する治療薬はトライアルされてきたが、これまで実用化に至ったものはない。今回 PRI-724 が NASH の肝線維化にも有効であることが明らかになれば、非常に本研究に価値があるが、更にミトコンドリア機能改善も認められれば画期的な研究と考えた。

## 3. 研究の方法

本研究では、NASH 肝線維化モデルマウスに Wnt シグナル阻害剤である PRI-724 を持続投与し、以下の研究項目を実施する。

1. NASH 肝線維化モデルマウスにおける肝臓内の Wnt/  $\beta$ -catenin のシグナル発現解析
2. PRI-724 投与による抗線維化作用の解析
3. PRI-724 投与後肝臓内炎症細胞は増加しているか？またこれらの炎症細胞の脱線維化のメカニズムは？

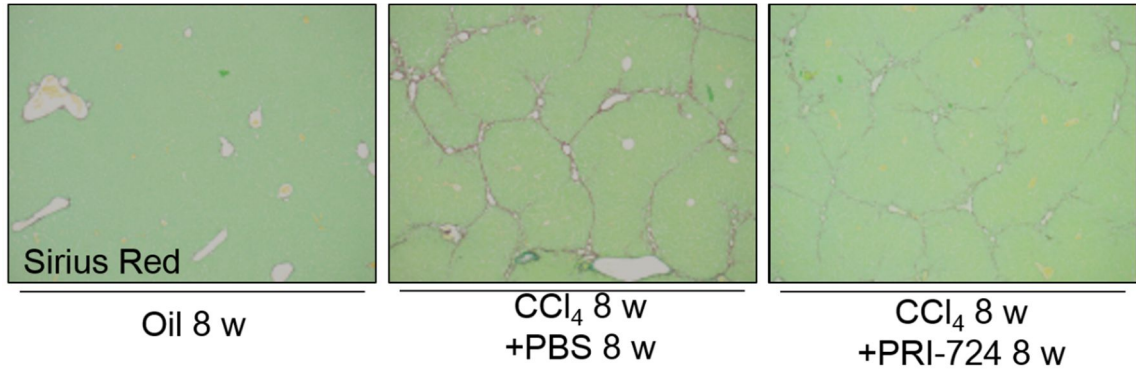
### 1.NASH 肝線維化モデルマウスでの肝臓内の Wnt/ $\beta$ -catenin のシグナル発現解析

高脂肪食を与え、肝障害を誘発する薬剤(ガラクトサミン;GalN)を投与することで NASH 肝線維化モデルマウスを作製し、このモデルを用いて肝臓組織より RNA を抽出し、Wnt1-11 までの発現を real-time PCR(RT-qPCR)で行う。また、同組織より蛋白質を抽出し、western blotting で  $\beta$ -catenin, CBP の発現を確認する。 $\beta$ -catenin は免疫組織でも解析を行う。

### 2.PRI-724 投与による抗線維化作用の解析

NASH 肝線維化モデルに PRI-724(1mg/kg)を 6 週間投与し、肝臓を採取して以下の項目を検討する。(A)病理学的には、肝線維化を Sirius Red 染色と鍍銀染色で評価し、3DHISTECH 社の PatternQuant 解析ソフトを用いて肝線維化面積を定量化する。四

塩化炭素投与による肝線維化モデルでは PRI-724 の抗線維化作用を確認している(下図参照)。



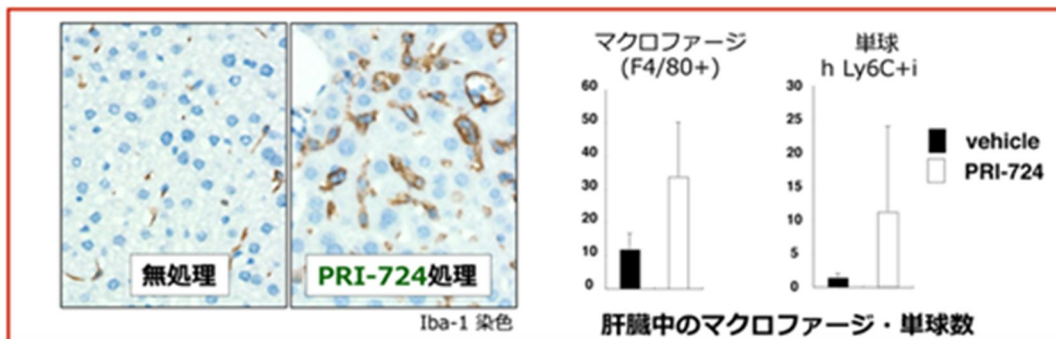
四塩化炭素モデルマウス  
に対する抗線維化効果

(B) 肝臓組織より RNA を抽出し、脱線維化作用を有する MMPs, TIMPs 等のプロテアーゼの発現を RT-qPCR にて解析する。また同組織より蛋白質を抽出し、western blotting にて collagen type1, Hydroxyproline の発現を確認し抗線維化治療効果を確認する。

3. PRI-724 投与後肝臓内炎症細胞が及ぼす脱線維化メカニズムの解析

マクロファージは M1 型と M2 型に分けられ、肝線維化とくにリーシュマニア寄生虫による線維化モデルで M2 型マクロファージの関与が示唆されている (Wynn, Nat Med.2012)。これまでに我々は他の肝線維化モデルで PRI-724 を投与後肝臓内でマクロファージ、単球の増加を確認している (下図参照)。

HCV Tg 線維化モデルに対する



NASH 肝線維化モデルでも同様な結果が得られるかを確認するため、肝臓よりリンパ球を採取しマクロファージ、単球の解析に焦点をあて、CD11b, F4/80, Ly-6c, CD11c, CD206 等の抗体を用いて M1, M2 マクロファージの shift および inflammatory monocyte の数量を検討する。更に線維溶解に重要な MMPs をマクロファージが産生

することが報告されている(Huang WC, PLoS One.2012)ことから、肝内白血球における mRNA 発現を検討する。

#### 4 . 研究成果

NASH モデルにおいても、PRI-724 投与により他の線維化モデルと同様に肝線維化の有意な改善が認められた。また CBP-flox/ALB-Cre マウスを樹立し、肝細胞の CBP シグナルが肝線維化に作用する機序に関する新たな知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yosuke Osawa, Ekumi Kojika, Koji Nishikawa, Masamichi Kimura, Shigenori Osakaya, Hiromi Miyauchi, Tatsuya Kanto, Yutaka Kawakami, Kiminori Kimura	4. 巻 10(32)
2. 論文標題 Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) blockade attenuates metastatic colon cancer growth in cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP)/ -catenin inhibitor-treated livers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3013 ~ 3026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget	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 -

1. 著者名 Osawa Yosuke, Kojika Ekumi, Hayashi Yukiko, Kimura Masamichi, Nishikawa Koji, Yoshio Sachiyo, Doi Hiroyoshi, Kanto Tatsuya, Kimura Kiminori	4. 巻 2
2. 論文標題 Tumor necrosis factor mediated hepatocyte apoptosis stimulates fibrosis in the steatotic liver in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 407 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1158	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村昌倫
2. 発表標題 C型肝硬変に対するWnt/ -catenin阻害薬PRI-724 による抗線維化作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村昌倫
2. 発表標題 C型肝硬変に対するWnt/ -catenin阻害薬PRI-724 による抗線維化作用メカニズムの解析
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

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