

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03640

研究課題名(和文)肝線維化制御を目指した新規治療標的の同定とそのメカニズム解明

研究課題名(英文) Identification of novel therapeutic target for liver fibrosis and elucidation of the mechanism

研究代表者

田中 靖人 (Tanaka, Yasuhito)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・客員教授

研究者番号：90336694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎ウイルス(HCV)排除後あるいは脂肪性肝炎において、肝線維化は重要な肝発癌や予後不良リスク因子である。線維化促進サイトカインTGF $\beta$ とTLL1による肝線維化・肝発癌メカニズム、コラーゲン遺伝子の発現を抑制するmiR-6133-5pの線維化制御機構を検討した。miR-6133-5pは細胞内の主要なシグナル伝達経路のリン酸化を抑制すること、JNKの上流に作用することが明らかとなった。肝細胞特異的hTLL1高発現マウス系統を樹立し、肝発癌への影響を検討した。マイクロ流体デバイスiLiNPによるsiRNA搭載脂質ナノ粒子(LNP)について、最適なLNPを同定し、マウス肝臓での安全性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCV感染症の治療は飛躍的に進歩し、ほぼ全例でウイルス排除が達成可能となった。しかし、肝線維化進展例ではHCV排除後も肝発癌リスクが高く、脂肪肝炎を含む他の慢性肝炎においても線維化は予後不良因子となるため、肝線維化の制御は重要な課題である。本研究結果から、miR-6133-5pの抗線維化効果がTGFBR2およびJNKによって媒介されることを示した。肝細胞特異的hTLL1高発現マウスを樹立し、長期間のコリン欠乏高脂肪食給餌により肝癌を誘発させるマウスモデルを確立した。さらに、肝細胞をターゲットとしたLNPの開発により、肝細胞のみに薬剤を直接作用させる身体に負担の少ない治療への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Liver fibrosis is an important risk factor for the development of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with after hepatitis C virus (HCV) eradication or with steatohepatitis. In this study, we investigated the mechanisms of liver fibrosis and hepatocarcinogenesis by TGF $\beta$  and TLL1, as well as by miR-6133-5p, which suppresses collagen gene expression. MiR-6133-5p was found to inhibit phosphorylation of major intracellular signal transduction pathways and act upstream of JNK. In addition, we have established lines of transgenic mice with the hepatocyte-specific overexpression of hTLL1. For siRNA-loaded lipid nanoparticles (LNP) by iLiNP microfluidic device, we identified the optimal LNPs and verified the safety in mouse liver.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝線維化 TLL1 TGF miR-6133-5p MEND

## 1. 研究開始当初の背景

肝炎ウイルス持続感染は肝線維化の進行をきたし、高率に肝硬変、肝発癌に至る。わが国で肝細胞癌(HCC)の発症要因として最も多いC型肝炎ウイルス(HCV)感染症の治療は飛躍的に進歩し、ほぼ全例でウイルス排除が達成できるようになった。しかし、肝線維化進展例では、HCV排除後も肝発癌リスクが高いままであり、肝線維化の制御は重要な課題である。これまでの我々のゲノム研究からHCV排除後の肝発癌に関連するリスク因子として、高齢、男性、線維化進展などに加えて、アスタシン様分泌型メタロプロテアーゼに属するToll-like 1(TLL1)遺伝子の7番イントロンに存在する遺伝子多型rs17047200が発癌と有意に関連することを同定し、TLL1遺伝子の機能亢進が線維化促進サイトカインであるTGF $\beta$ の活性化を介して肝線維化に寄与することを突き止めた(Matsuura K, Tanaka Y. et al. Gastroenterology. 2017)。TLL1は当初脊椎動物の初期発生を制御する分子として同定され、心臓形態形成などに必須であることが示されていた。しかし正常の肝臓におけるTLL1遺伝子発現は低いため、肝疾患におけるTLL1の関与はこれまで検討されていない。また我々はB型肝炎ウイルス(HBV)複製を抑制するmiRNAを網羅的に検討し、miR-6133-5pがHBV-DNAおよびHBs抗原を抑制することを同定した。このmiR-6133-5pはTGF $\beta$ 刺激によるコラーゲン遺伝子の発現を強力に抑制し、肝星細胞活性化に関連する遺伝子の抑制も認められた。さらに、肝線維化と非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の予後との関連性も報告されており、肝線維化の制御は肝疾患全般において重要な課題といえる。

miRNA導入システムの実用化には、miRNA導入効率、安全性およびスケールアップ製造が重要となる。脂質ナノ粒子(LNP)の粒子径は製剤安定性、体内・細胞内動態に影響を与える重要因子である。肝実質細胞を標的とする場合は貪食細胞によるクリアランスの回避と血管からフェネストラを通過する必要性から小さい方が好ましい一方で、我々は粒子径の低下は製剤の安定性の低下と細胞内動態の顕著な悪化を招くことを報告している(Sato Y et al., J Control Release, 2016, Sato Y et al., Acta Biomater, 2020)。マイクロ流体デバイスにより、比較的小さく均一なLNPを非常に再現性良く製造することが可能であるが、粒子径を適切に上方制御させる製造法は確立されていない。

## 2. 研究の目的

肝線維化および肝発癌におけるTLL1の役割、TLL1による新たな肝線維化メカニズムおよびTGF $\beta$ -TLL1相互活性化(autocrine)機構を明らかにするために、動物モデルとして「肝細胞特異的ヒトTLL1高発現マウス」や「肝臓特異的TLL1欠損マウス」を新たに作製し機能解析を行う。また、コラーゲン遺伝子発現や肝星細胞活性化を制御するmiR-6133-5pの標的分子の同定から機能解析、さらに臨床応用を想定して、複数の肝線維化動物モデルを用いてその制御機構を解明する。これらの一連の研究を通じて、TGF $\beta$ -TLL1が制御する肝線維化から肝発癌へのmiR-6133-5pおよびその標的分子の関与も明らかにし、慢性肝疾患に対する新たな治療法の開発を目指す。

LNPの生成工程としては、マイクロ流体デバイスにより正に帯電した疎水性微粒子の形成を経た後、精製工程中に微粒子間融合により成長し、最終的なLNPとなることが明らかになっている。初めに形成する疎水性微粒子の粒子径がLNPの粒子径に直結すると考えられるため、これを制御しうる製造条件を検討する。

## 3. 研究の方法

### TLL1による新たな肝線維化メカニズムの解明(名古屋市立大学:田中靖人・五十川正記・堤進)

初代ヒト肝細胞および肝細胞株にTGF $\beta$ を添加して誘導されるTLL1バリエーションをRNAseqにより解析した。TLL1発現定量には、TLL1の全長および短鎖が増幅可能なプライマーセットを用いたRT-qPCR、デジタルPCRシステムによるTLL1バリエーションの絶対定量系を確立し、測定を行った。

### コラーゲン遺伝子発現を制御するmiR-6133-5pの機能解析(田中・堤)

肝星細胞株LX-2にmiR-6133-5p mimicまたはターゲット候補遺伝子のsiRNAをトランスフェクトし、24時間後にrhTGF $\beta$ 1を含む培地で培養を継続した。培養終了後、回収した細胞からRNAおよびタンパクを抽出し解析を行った。

### 肝細胞特異的TLL1高発現およびTLL1欠損マウス系統の樹立(名古屋市立大学:大石久史)

肝臓特異的AFP/Albuminプロモータ下流にヒトTLL1全長あるいはTLL1バリエーションのORFを連結した組換え遺伝子を受精卵に注入することにより肝細胞特異的ヒトTLL1高発現マウスを作出した。TLL1欠損マウスについては、全身性のTLL1遺伝子欠損マウスは心血管系の発生異常により胎生致死となり、成獣の肝臓におけるTLL1の機能を解析できない(Clark TG. et al.

Development, 1999)。そのため本研究では条件付き Tll1 遺伝子欠損マウスの作成を行った。樹立したヒト Tll1 高発現マウスにコリン欠乏高脂肪食あるいは CCl4 を与え、肝線維化および肝細胞癌誘導に差が出るかを検討した。

#### miRNA 送達脂質ナノ粒子の実用化を目指した製剤検討 (北海道大学：佐藤悠介)

肝臓への核酸導入に最適な pH 感受性カチオン性脂質 CL4H6 を用いた LNP を高精度にスケールアップ製造するマイクロミキサー内蔵流路 (iLNP) を用いて、miRNA 搭載 CL4H6-LNP の製造法最適化を行い、in vivo における核酸導入効率検証および安全性試験を実施した。

#### 4. 研究成果

Tll1 遺伝子からは long variant および複数の short variant による mRNA が発現し、short variant は酵素活性部位のみをコードする。Tll1 遺伝子多型のリスクアレル (AT/TT) 保因者では AA 保因者に比べて short variants の発現比率が高い。デジタル PCR システムを用いた Tll1 高感度測定法を構築し、微量な各 variant の絶対定量を試みた。TGF により初代星細胞の Tll1 は最も高く誘導され、初代ヒト肝細胞では Tll1 short variants が優位に誘導された (図 1)。

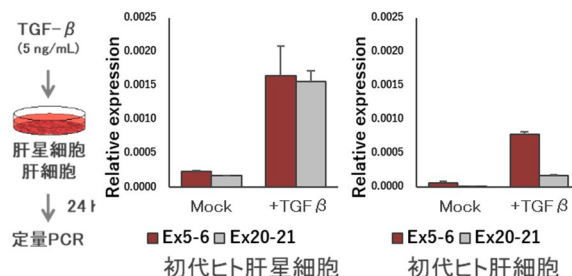


図 1

肝星細胞株 LX-2 に miR-6133-5p mimic または control miRNA mimic (miControl) をトランスフェクト後、rhTGF-1 で処理した結果、miControl では rhTGF-1 により COL1A1 と ACTA2 の発現が劇的に増加した。また、COL1A1 と ACTA2 は rhTGF-1 に関係なく miR-6133-5p により有意に減少した。Western blotting の結果 Col 1 と  $\alpha$ -SMA も rhTGF-1 に関係なく miR-6133-5p による減少が認められ、miR-6133-5p が強力な抗線維化特性を有することを示唆した (図 2)。

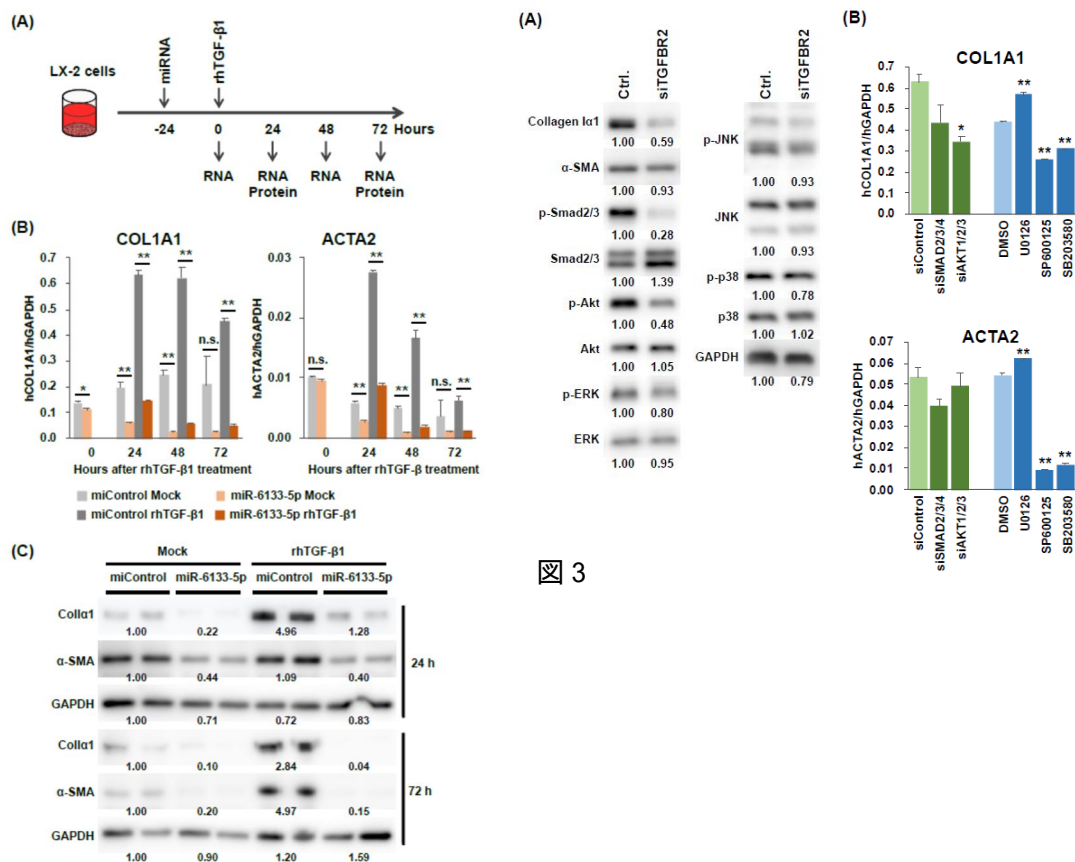


図 2

また、siRNA による TGF R2 ノックダウンにより、COL1A1 と ACTA2 の発現を大幅に抑制した。JNK 阻害剤である SP600125 も COL1A1 および ACTA2 の発現を抑制し、miR-6133-5p の抗線維化効果が TGFBR2 および JNK によって媒介されることを示した (図 3)。

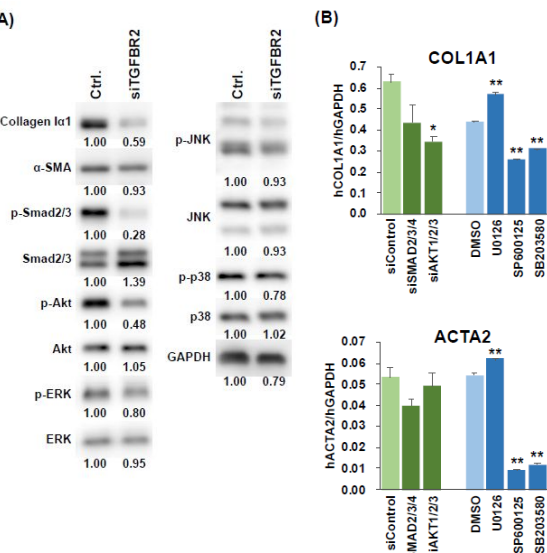


図 3

TLL1 の肝発癌における影響を検討するため、樹立した肝細胞特異的ヒト TLL1 高発現マウスにコリン欠乏高脂肪食を 11 ヶ月間与え、肝発癌の有無を調べた。その結果、発癌は TLL1 陰性個体で 9 匹中 1 匹、TLL1 陽性個体で 8 匹中 5 匹に認められ、TLL 陰性個体で 9 匹中 2 匹、TLL1 陽性個体で 4 匹中 2 匹に認められ、高頻度であった (図 4)。

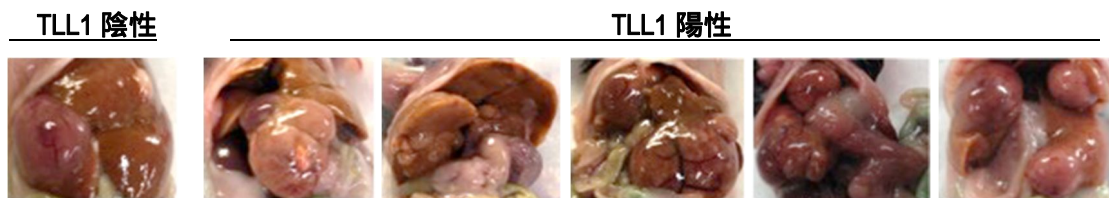


図 4 コリン欠乏食摂取後 11 ヶ月目の発癌マウス肝臓

また、TLL1 陽性個体では陰性個体に比べて血清中の AFP 量が上昇しており、コリン欠乏高脂肪食摂取後 4 ヶ月目で有意な差があった (図 5)。

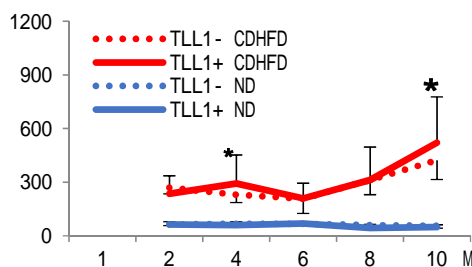


図 5 マウス血清中の AFP 量

LNP の粒子径を制御するための新たな因子を同定し、より精密な粒子径制御を可能とする製造戦略を確立した。また、LNP の核酸導入能およびイオン化脂質の生分解性の検証を行った。疎水性微粒子の溶液中での分散安定性理論として知られている DLVO 理論に照らし合わせて検討し、全 729 通りから 17 製剤を選抜した。製造条件により 60 ~ 260 nm の範囲で様々な粒子径の LNP が得られ、線形重回帰分析により予測モデルを作製した。得られたモデルの予測精度の検証を行い、粒子径 120nm 程度と予測されるそれぞれ異なる 5 種の製造条件で LNP を製造したところ、約 10nm 以内の誤差で同等の粒子径の LNP を得た (表 1)。得られた siRNA 搭載 LNP の肝臓における遺伝子ノックダウン活性を評価したところ、総流速の低い条件以外は同等の高い活性を示した (図 6)。

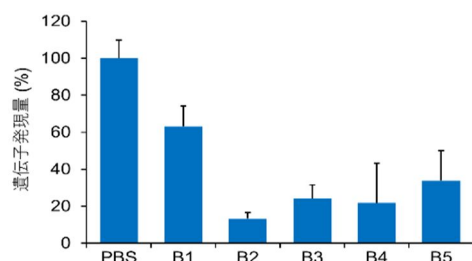


図 6 各 siRNA 搭載 LNP のマウス肝臓における遺伝子ノックダウン活性

表 1 粒子径約 120 nm と予測される異なる製造条件および製造された LNP の物性値

LNP#	総流速 (μL/min)	流速比	NaCl濃度 (mM)	PEG脂質添加量	脂質濃度 (mM)	pH	粒子径 (nm)	多分散度指数	ζ電位 (mV)	封入率 (%)
B1	100	3	100	1.5	10	4	103±6	0.08±0.02	2.7±0.9	95.6±0.4
B2	500	9	10	1	10	6	113±6	0.07±0.02	3.5±0.7	94.7±1.3
B3	500	3	250	2	10	4	117±10	0.06±0.02	2.2±1.3	96.3±0.9
B4	500	6	130	1.5	10	6	123±10	0.08±0.01	2.8±0.7	95.4±0.8
B5	300	6	250	2	10	6	119±11	0.13±0.02	2.7±1.1	95.2±2.0

LNP に含まれるイオン化脂質は核酸の効率的な搭載と導入に必須の因子であるものの、毒性の発現に寄与し得る。得られた LNP の安全性の検証を目的として、LNP をマウスに静脈内投与した後、標的臓器である肝臓におけるイオン化脂質 CL4H6 を LC/MS により経時的に定量した。その結果、CL4H6 は時間依存的に肝臓から消失した (図 7)。CL4H6 は疎水性足場内にエステル結合を有しており、これが内因性のエステラーゼにより分解を受けたためであると考えられる。

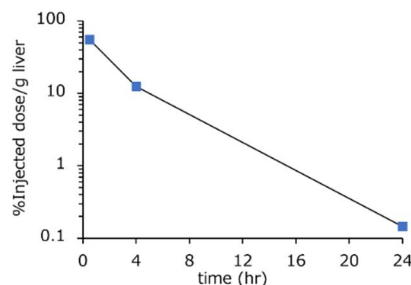


図 7 イオン化脂質 CL4H6 のマウス肝臓における残存量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Iio E, Matsuura K, Shimada N, Atsukawa M, Itokawa N, Abe H, Kato K, Takaguchi K, Senoh T, Eguchi Y, Nomura H, Yoshizawa K, Kang JH, Matsui T, Hirashima N, Kusakabe A, Miyaki T, Fujiwara K, Matsunami K, Tsutsumi S, Iwakiri K, Tanaka Y	4. 巻 54
2. 論文標題 TLL1 variant associated with development of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus by interferon-free therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 339 ~ 346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1526-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松浦健太郎, 田中靖人	4. 巻 56
2. 論文標題 C型肝炎ウイルス排除後の肝癌発症に関連するTLL 1遺伝子多型の同定および機能解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nagoya Medical Journal	6. 最初と最後の頁 145 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiso A, Toba Y, Tsutsumi S, Deguchi S, Igai K, Koshino S, Tanaka Y, Takayama K, Mizuguchi H	4. 巻 4
2. 論文標題 Tolloid Like 1 Negatively Regulates Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Through Transforming Growth Factor Beta Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 255 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1466	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 Hamada-Tsutsumi Susumu, Onishi Masaya, Matsuura Kentaro, Isogawa Masanori, Kawashima Keigo, Sato Yusuke, Tanaka Yasuhito	4. 巻 21
2. 論文標題 Inhibitory Effect of a Human MicroRNA, miR-6133-5p, on the Fibrotic Activity of Hepatic Stellate Cells in Culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7251 ~ 7264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197251	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 松浦 健太郎, 田中 靖人	4. 巻 274
2. 論文標題 C型肝炎治療後の肝発癌とTLL1遺伝子多型	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 359 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Sato Y, Hashiba K, Hashiba A, Okabe N, Harashima H.
2. 発表標題 Efficient delivery of macromolecules by molecular design of cationic lipids.
3. 学会等名 Liposome Research Days 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iio E, Matsuura K, Shimada N, Atsukawa M, Takaguchi K, Eguchi Y, Nomura H, Itokawa N, Abe H, Senoh T, Kato K, Matsui T, Kang JH, Kusakabe A, Miyaki T, Hirashima N, Fujiwara K, Tanaka Y
2. 発表標題 Predictors of hepatocellular carcinoma development after eradication of hepatitis C virus based on TLL1 variant, AFP and FIB 4 index.
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiso A, Toba Y, Tsutsumi S, Igai K, Koshino S, Takayama K, Tanaka Y, Mizuguchi H
2. 発表標題 Functional analysis of Toll-like 1 (TLL1) in the hepatic differentiation using TLL1-deficient human induced pluripotent stem cells,
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水口裕之, 田中靖人
2. 発表標題 Tollloid-like 1(TLL1)欠損ヒトiPS細胞を用いた肝分化過程におけるTLL1の機能解析
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田健斗, 佐藤悠介, 岩川和樹, 原島秀吉
2. 発表標題 脂質ナノ粒子の粒子径増大技術の確立とその有用性の検討
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第148回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田健斗, 佐藤悠介, 岩川和樹, 原島秀吉
2. 発表標題 脂質ナノ粒子の粒子径制御技術の確立と有用性の検討
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田健斗, 佐藤悠介, 岩川和樹, 原島秀吉
2. 発表標題 mRNA ワクチンへの応用を目指した脂質ナノ粒子の粒子径制御技術の確立
3. 学会等名 第42回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤悠介, 奥田健斗, 岩川和樹, 佐々木宏輔, 原島秀吉
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスによる脂質ナノ粒子の粒径制御と in vivo RNA送達
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	佐藤 悠介  (Sato Yusuke)  (10735624)	北海道大学・薬学研究院・助教   (10101)	
研究分担者	大石 久史  (Oishi Hisashi)  (30375513)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

	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
研究協力者	五十川 正記  (Isogawa Masanori)  (50723201)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・研究員   (23903)	
研究協力者	堤 進  (Tsutsumi Susumu)  (30367693)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・研究員   (23903)	



## 6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	水口 裕之 (Mizuguchi Hiroyuki)  (50311387)	大阪大学・大学院薬学研究科・教授  (14401)	
研究協力者	高山 和雄 (Takayama Kazuo)  (10759509)	京都大学・iPS細胞研究所・講師  (14301)	
研究協力者	村上 周子 (Murakami Shuko)  (50454848)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員  (23903)	
研究協力者	伊藤 恭子 (Ito Kyoko)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究助手  (23903)	

## 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