

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07115

研究課題名(和文) Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル阻害剤による肝線維化抑制と肝機能回復の機序解析研究課題名(英文) Analysis of mechanism by which a Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibitor ameliorates NASH-induced liver fibrosis and disorder

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・疾患制御研究分野・主任研究員

研究者番号：40508628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)において、肝線維化の進展が予後や肝がんに関与することからその治療が重要となる。これまでに肝硬変を対象として開発が進んでいるWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル阻害剤PRI-724がNASHに起因する肝線維を有意に減弱させることを見出している。本研究課題では1) PRI-724投与によるNASH肝線維化を減弱させる機序にCd68+Mmp9+マクロファージが重要なこと、2) PRI-724投与でNASHによるプロトンピン時間の低下および肝アルブミン発現の低下を有意に改善することが明らかとなった。PRI-724はNASH肝線維化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

肝硬変や肝不全に対しては肝移植以外に根治的治療法はなく、肝移植にはドナー不足や患者負担など大きな問題がある。Wnt/ $\beta$ -カテニン/CBPシグナル阻害剤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臨床試験が進んでいる薬剤であり、その有効性が示されている。NASHの有病数は世界で約4億4千万人であり、今後はさらに増加すると推定されている。アメリカでは、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。本研究課題の結果から、PRI-724はNASHに起因する肝硬変に対しても治療薬となりうる可能性を示すことができた。

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. Our previous study showed that PRI-724 treatment to NASH-related liver fibrosis decreased hepatic expressions of SMA, type I and type III collagens, liver fibrosis markers. Moreover, expression of matrix metalloproteinase Mmp8 and Mmp9 in the liver were significantly increased. In the present study, we analyzed which types of macrophage play a role in MMP9 production. The number of Mmp9-positive cells in hepatic Cd68+ macrophages isolated from livers treated with PRI-724 increased 5.5-fold. Marco+Mmp9+Cd68+ Kupffer cells were only observed in the livers of mice treated with PRI-724, and Mmp9 expression in Marco+Cd68+ Kupffer cells increased 4.3-fold. PRI-724, a selective CBP/ $\beta$ -catenin inhibitor, thus shows a potent therapeutic effect for NASH-related liver fibrosis.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝線維症 NASH Wnt/ $\beta$ -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

肝硬変の患者数は世界で2,000万人(国内で30万人)いるとされるが、肝移植以外に有効な治療法はない。国内においてはC型肝炎ウイルス(HCV)を原因とする肝硬変が最も多い。肝硬変は肝がんへと進行し、死亡数は世界で年間150万人(国内では4万人以上)と非常に多いが、根治可能な治療薬は存在しない。

肥満などを原因とする非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の有病率は、全人口の約20-30%と報告されており最も頻度が高い肝疾患である。NAFLDは非アルコール性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に大別されるが、臨床的に重要な疾患は、肝硬変や肝がんへ進行する可能性が高いNASHである。2008-16年の統計でウイルス性肝炎による肝硬変は73.4%から48.2%へと減少しているのに対し、NASH肝硬変は2.0%から9.1%と増加している(*J. Gastroenterol.*, 2020)。NASHの罹患率増加に伴って今後はさらに増加すると考えられている。また近年の大規模疫学研究から、NAFLD/NASHの予後を規定する因子は、肝線維化であることが明らかとなった(*Gastroenterology*, 2015)。さらに肝臓の線維化は肝硬変や肝細胞がんの発生だけでなく、心疾患イベントの発生や肝臓以外のがんの発生にも強く関与することが報告されている(*J. Hepatol.*, 2017)。したがって、NASHに起因する肝線維症/肝硬変を治療できれば、患者の死亡リスクを大幅に軽減できると考えられるが、現在のところ臨床での使用可能な肝線維症/肝硬変に対する治療薬は存在しない。

これまでに研究代表者はWnt/ $\beta$ -カテニン/CBPシグナル阻害剤PRI-724をNASH肝線維化モデルマウスに投与すると、NASHに起因する肝線維が有意に減弱することを見出している。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、また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。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明らかとなった。

### 2. 研究の目的

肝線維症/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、B型およびC型肝炎患者を対象にPRI-724の臨床試験が進んでおり、新たな抗線維化薬候補として期待されている。一方、C型慢性肝炎から肝硬変へ進行する機序とNASHから肝硬変へ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、PRI-724によるNASHに起因する肝線維症からの脱肝線維化および肝細胞機能の正常化に伴って変化する細胞群の機能とその誘導機構を明らかにすることである。PRI-724はコラーゲン産生の抑制と線維分解系MMPの誘導を介して脱線維化作用を示すが、その作用機序はまだ十分に解明されていない。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ている。一方で、マクロファージや好中球はNASHの進展にも関与しているため、MMP-9を産生するマクロファージや好中球はNASH進展に関与するマクロファージとは異なるのか否かを明らかにする必要がある。そこで、PRI-724投与後の肝臓からマクロファージを分離し1細胞遺伝子発現解析を行なうことで、MMP-9産生による脱線維化に寄与する細胞集団の同定を試みた。

### 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60mg/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による肝機能の回復

肝機能の指標として、プロトロンビン時間と肝臓中のアルブミン発現量を検討した。プロトロンビン時間はコアグチェック®XSを用いて測定した。肝臓中のアルブミン発現量は肝臓よりRNAを抽出し、qPCRを用いて測定した。

#### (2) マウス肝臓からのマクロファージ分離

マウス肝臓をLiberase™THで消化した後、20% PercollおよびLympholyte Mで精製したマクロファージを実験に用いた。

### (3) 1 細胞遺伝子発現解析

1 細胞遺伝子発現解析は Nx1-seq 法 (*Sci. Rep.*, 2017) および BD Rhapsody Immune Response panel を用いて実施した。

### 4 . 研究成果

本研究課題では(1) PRI-724 の肝臓組織構造および肝機能の改善効果について検討し、(2) NASH 肝線維化誘発に寄与する細胞群の同定、(3) PRI-724 投与による肝線維化の改善に寄与する細胞の同定を試みた。

(1) 肝機能の正常化の指標として、プロトロンビン時間 (PT) と肝アルブミン発現で評価した。CDAHFD 摂餌による NASH 進行に伴い PT (%) および肝アルブミン発現は低下した。PRI-724 投与群において、NASH 発症や肝線維化によって低下した PT (%) および肝アルブミン発現は有意に改善された (図 1)。以上の結果から、PRI-724 が肝機能を改善することが明らかとなった。

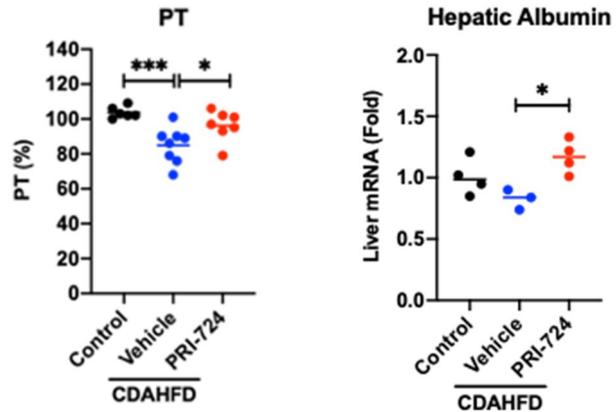
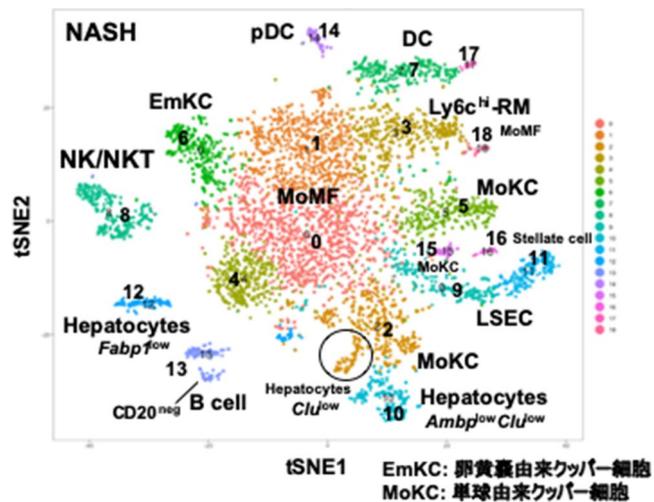


図1. NASH進行による肝機能の低下は、PRI-724投与で回復する (左) プロトロンビン時間(PT), (右) 肝アルブミン遺伝子発現

(2) ヒト NASH 患者において、NASH-associated macrophage と呼ばれる TREM2<sup>+</sup>マクロファージが増加することが報告されている (*Mol. Cell*, 2019)。そこで、CDAHFD 摂餌 NASH モデルマウスの Trem2<sup>+</sup>マクロファージの割合を調べたところ、Control 群では 25.1%であったのに対し、CDAHFD 摂餌 NASH 群では 97.2%とほぼすべてのマクロファージが Trem2<sup>+</sup>陽性であった。また NASH モデルでは、1 細胞あたりの Trem2 発現量が約 30 倍増加していた。CDAHFD 摂餌 NASH モデルで認められた Trem2<sup>+</sup>マクロファージは、*Cd9*, *Spp1* や *Lgals3* も高発現しており、肝星細胞を活性化する mSAMac (*Nature*, 2019) と呼ばれる細胞群と一致していた。Trem2<sup>+</sup>マクロファージは、肝星細胞を活性化することで肝線維化の進展に寄与していることが示唆された。



(3) 線維分解系のひとつである MMP-9 はマクロファージで産生されることが明らかとなっている。一方で、マクロファージは NASH の進展にも関与しており、MMP-9 を産生するマクロファージが NASH 進展に関与するマクロファージとは異なるのか検討した。その結果、cluster6 において *Mmp9* 陽性細胞の割合は PRI-724 投与で 2.0% から 11.2% と 5.6 倍増加したことから、PRI-724 による *Mmp9* 産生に寄与する細胞集団と考えられた。さらに、cluster6 は非炎症性のマクロファージである卵黄嚢由来のクッパー細胞 (EmKC) であることが明らかとなった (図 2)。

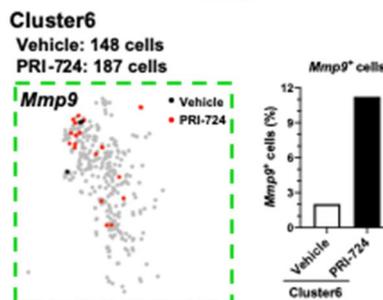
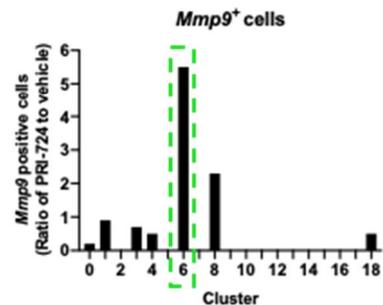


図2. NASHモデルマウスにおいて、PRI-724投与で誘導されるMmp9は卵黄嚢由来クッパー細胞で産生される

PRI-724 投与によって、Marco<sup>+</sup>陽性の *Mmp9*<sup>+</sup> *Cd68*<sup>+</sup>クッパー細胞が増加し、また Marco<sup>+</sup> *Cd68*<sup>+</sup>クッパー細胞での *Mmp9* 発現量は Marco<sup>+</sup> *Cd68*<sup>+</sup>クッパー細胞と比べて約 4 倍高いことが明らかと

なった (図 3)。NASH モデルマウスにおいて、PRI-724 で誘導される *Mmp9* の産生に *Cd68<sup>+</sup>Marco<sup>+</sup>* クッパー細胞が寄与している可能性が示唆された。

以上の結果から、MMP-9 を産生するマクロファージは *Cd68<sup>+</sup>*クッパー細胞であり、NASH 進展に關与するマクロファージとは異なることが明らかとなった。特に *Marco* 陽性の *Mmp9<sup>+</sup>Cd68<sup>+</sup>*クッパー細胞は、*Mmp9* 発現量が高いことから PRI-724 投与による肝臓の脱線維化に大きく寄与していると考えられた。

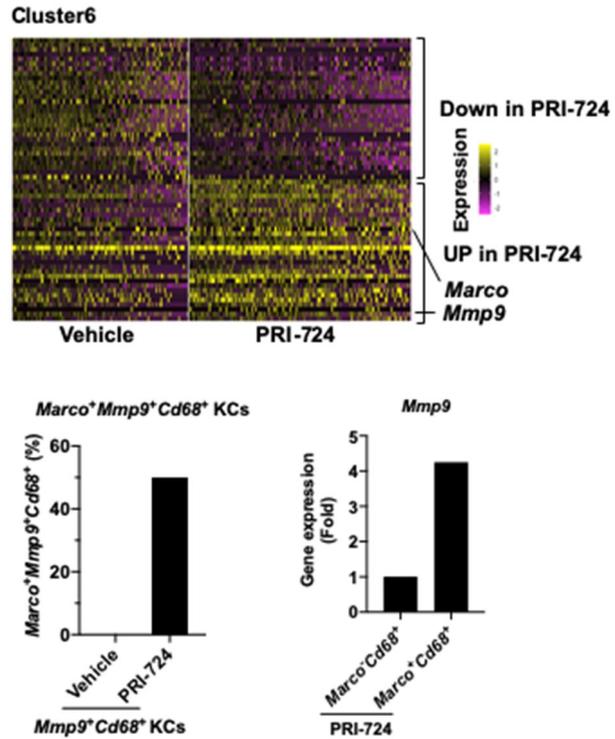


図3. NASHモデルマウスにおいて、PRI-724投与によって*Marco*陽性の *Mmp9*産生クッパー細胞が増加する

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 Masamichi Kimura, Koji Nishikawa, Yosuke Osawa, Jun Imamura, Kenzaburo Yamaji, Kenichi Harada, Hiroshi Yatsuhashi, Kazumoto Murata, Kouichi Miura, Atsushi Tanaka, Tatsuya Kanto, Michinori Kohara, Terumi Kamisawa, Kiminori Kimura	4. 巻 6
2. 論文標題 Inhibition of CBP/ -catenin signaling ameliorated fibrosis in cholestatic liver disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 2732-2747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.2043	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kenzaburo Yamaji, Yuko Tokunaga, Sadahiro Iwabuchi, Shinichi Hashimoto, Daisuke Yamane, Sakiko Toyama, Bouchra Kitab, Kiminori Kimura, Kyoko Tsukiyama-Kohara, Michinori Kohara
2. 発表標題 A CBP/ -catenin signaling inhibitor, PRI-724 ameliorates NASH-induced liver fibrosis and disorder
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山地賢三郎、徳永優子、岩淵禎弘、山根大典、橋本真一、小原道法
2. 発表標題 NASH肝線維化マウスに対する -catenin/CBP選択的阻害剤PRI-724の脱線維化に寄与する細胞集団の同定
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021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 AASLD2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenzaburo Yamaji, Yuko Tokunaga, Daisuke Yamane, Bouchra Kitab, 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 <a href="http://www.igakuken.or.jp">http://www.igakuken.or.jp</a> 公益財団法人 東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト <a href="http://www.igakuken.or.jp/project/detail/infectious.html">http://www.igakuken.or.jp/project/detail/infectious.html</a>
---

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