

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390053
 研究課題名（和文） 肝星細胞活性化，肝線維化に関する機能性ノンコーディングRNA制御機構解析
 研究課題名（英文） Functional non-coding RNA expression in activated hepatic stellate cells
 研究代表者
 池田 一雄（IKEDA KAZUO）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：80275247

研究成果の概要（和文）：

肝星細胞活性化，肝線維化に関するマイクロRNAの発現を肝星細胞（*in vitro*）ならびに肝臓（*in vivo*）で調べると，それぞれ星細胞の活性化，肝臓線維化によって，その発現量が増加するマイクロRNAが，数十個ずつ認められた。これらの中で，miR-17-92は，クラスターを形成し，細胞の増殖，線維化に関連する遺伝子を制御していることが明らかになった。また，miR-200bは，上皮間葉系移行と深く関連する因子，ZEB2の発現を抑制していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

MicroRNA, which are endogenous small non-coding RNA, have recently become a focus of interest as post-transcriptional regulators of gene expression. Using a microRNA array and Applied Biosystem's Taq Man micro-RNA assay, we profiled microRNA expression in activated stellate cells and fibrotic liver. More than 20 microRNAs changed their expression levels in activated stellate cells and in fibrotic liver. Among them, miR-17-92 were closely related to cell's proliferation and the liver injury. miR-200b had an association with epithelial-mesenchymal transition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	7,400,000	2,220,000	9,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化・組織形成 肝星細胞 マイクロRNA 肝線維化 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

我々は，これまで肝臓の線維化過程に中心的な役割を果たすと考えられている肝星細胞の機能，特に活性化の分子機構のメカニズム解明のため，肝星細胞分離法を確立し，この分離培養星細胞を用いて星細胞活性化に伴って変動する各種分子動態を遺伝子レベ

ルおよび蛋白質レベルでの解析を行ってきた。また，星細胞の活性化の制御による肝線維化，肝硬変の治療を開発することを目標に，実験的に，血管内皮細胞増殖抑制剤，TNP-470が肝星細胞の活性化を抑制することや膵炎の治療薬として使用されているセリンプロテアーゼインヒビターがTGF- β の発現

および活性を抑制することで、肝線維化を抑制すること、さらに、組み換えアデノウイルスベクターを用いてコラーゲンプロモーターによる細胞特異的遺伝子制御により肝線維化を抑制することを明らかにしてきた。これまでの研究成果の集積からは、DDR2, Cytoglobin, NCAM 等、我々が星細胞での発現をはじめて見いだした分子や活性化星細胞のマーカーとなる分子が、DNA アレイやプロテオミクスに代表される遺伝子解析とタンパク質解析で、発現が一致して変動することを確認してきたが、また同時にその発現が一致しない分子も認められる事実も確認している。そして、この発現の不一致に対する答えの手掛かりを示してくれるのが、ノンコーディングRNAの解析であるのではないかと考えている。

ポストゲノム時代において、トランスクリプトーム研究の進展により、リボゾームRNAや転移RNAを除く蛋白質をコードしていないノンコーディングRNAが数多く転写されていることが明らかになり、それらの機能についても明らかにされつつある。その中でもとりわけマイクロRNAはよく研究されているノンコーディングRNAで、下等動物から植物、ヒトに至るまで幅広く存在し、発生、分化、増殖といった様々な生命現象に深く関与していることが明らかとなってきた。マイクロRNAは、DNAメチレーションにより転写を制御し、mRNAに結合し、mRNAを切断、分解し、さらにタンパク質の翻訳抑制することが明らかになってきた。マイクロRNAの特徴は、ある特定のマイクロRNAがいくつもの遺伝子に作用するという点である。転写因子に関していうと特定の転写因子やその複合体が特定の遺伝子の転写を制御しているが、マイクロRNAの場合、一つのマイクロRNAは、百を超える遺伝子を制御している可能性も示唆されている。本研究においては、トランスクリプトーム研究を行い、肝臓の炎症再生、線維化に伴いどのようなマイクロRNAがゲノムから転写され、どのような標的遺伝子の転写制御や翻訳抑制に関わっているのかを突き止めることを目的に研究を進める。また、上皮系細胞である肝実質細胞と間葉系細胞である肝星細胞についてのマイクロRNA解析を行うことで、上皮細胞の癌化およびその進展、臓器線維症といった生命現象に深く関与していることが明らかになりつつある上皮間葉

系移行 (EMT) のメカニズムの解明につながることも期待している。

2. 研究の目的

臓器線維症は、いまだ特出すべき治療法が開発されていない難治性疾患の一つで、肝硬変、腎硬化症、肺線維症、心臓線維化など様々な臓器で慢性炎症や物理的負荷によってもたらされる疾患である。本研究においては、その中でも特に、肝臓の線維化に重要な役割を果たす筋線維芽細胞 (活性化肝星細胞) に着目し、最近注目を集めているノンコーディングRNAの中でもマイクロRNAに焦点を当て、筋線維芽細胞でのマイクロRNAの網羅的解析を行い、線維化に関連する分子制御を明らかとし、その中で、線維化を抑制する新規のマイクロRNAを同定し、線維化治療開発を最終目標にしてマイクロRNAの制御による線維化抑制を試みる。

3. 研究の方法

ラット肝臓よりコラーゲナーゼ、プロナーゼ還流消化法により肝星細胞を分離培養。静止期肝星細胞と活性化肝星細胞より small RNA を抽出し、マイクロRNAアレイおよびアプライドバイオシステムズ社の TaqMan MicroRNA Assay にて定量的解析をおこなった。

同様に正常肝臓とチオアセトアミド 200 mg/kg body を週 2 回投与投与して作製した障害肝臓より、small RNA を抽出し、マイクロRNAアレイおよびアプライドバイオシステムズ社の TaqMan MicroRNA Assay にて定量的解析をおこなった。

そしてこれら *in vitro* 及び *in vivo* 実験のデータをサンガー研究所の Web site での解析をおこなった。

続いて発現の変動が認められたマイクロRNAに関しては、細胞にそれらを強制発現させ、マイクロRNAによる細胞の活性化、線維化にに関連する機能制御に関して検討を行った。

4. 研究成果

上皮間葉移行 (EMT) は 1980 年代初めに Elizabeth Hay らが提唱した、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、神経提細胞の運動や心臓や腎臓また口蓋での器官形成過程に、重要であることがこれまでに明らかとなっている。近年、EMT の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、癌細胞の浸潤や線維症との関連も示唆されている。一方 TGF- β は以前より線維症との関連が示唆されており、間葉系マーカー

一の発現を誘導することも知られていた。また HGF による EMT 誘導時に TGF- β 産生の亢進が明らかになり、EMT における TGF- β の重要性が注目されるようになり、今日では、TGF- β が最も重要な EMT 誘導因子の 1 つとして考えられるようになってきている。今回、肝臓の臓器線維症である肝硬変と深く関わる肝星細胞活性化におけるマイクロ RNA の発現変動を検索したところ、12 の因子の発現上昇と 10 の因子の有意な発現減少が確認できた。これらを英国のサンガー研究所のデータベースや NCBI のデータベースを用いた解析を行ったところ miR-92 がゲノムシークエンス上で数個の他のマイクロ RNA (miR-17, 18, 19, 20) とクラスターを形成していることが明らかとなった。本研究では、特に星細胞の細胞増殖、細胞外マトリックスの産生にマイクロ RNA がどのような影響を及ぼしているかを検索したところ、増殖関連因子、TGF β シグナルと関連する興味深い因子の発現制御に影響を及ぼす因子をデータベース上で確認し、実験的にもこれらの因子を制御していることが明らかとなった。

マウスの正常肝臓と障害肝臓から RNA を抽出し、マイクロアレイをもちいて比較してみると、数十個のマイクロ RNA に発現の変動が認められた。その中で特徴的な数個を示すと、miR-29b は、col1A1 と col1A1 の転写因子として重要な役割を果たしている Sp1 の発現を制御し、コラーゲンの産生を抑制することを明らかにすることができたもので、さらに、miR-200b は、上皮間葉移行と深く関連する ZEB2 を制御することが明らかとなった。また、miR-18a は、上記の miR-17-92 とクラスターを形成していることが知られている因子であった。その他にデータベース上では確認できない線維化制御に関連する因子である MMP2 が間接的に、マイクロ RNA によって制御を受けていることも明らかとなった。これらは大変興味深く、今後さらに検討を深めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-beta-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol.* 2010 Dec

29. [Epub ahead of print] 査読有

② Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, 他 3 名の 4, 5 番目 Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):316-21. 査読有

③ Imanishi H, Tsuruta D, Ikeda K, 他 9 名の 8 番目 Laminin-511, inducer of hair growth, is down-regulated and its suppressor in hair growth, laminin-332 up-regulated in chemotherapy-induced alopecia. *J Dermatol Sci.* 2010 Apr;58(1):43-54. 査読有

④ Ozawa T, Tsuruta D, Ikeda K, 他 6 名の 5 番目 Dynamic relationship of focal contacts and hemidesmosome protein complexes in live cells. *J Invest Dermatol.* 2010 Jun;130(6):1624-35. 査読有

⑤ Otagawa K, Ikeda K, 他 3 名の 4 番目 Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. *Hepatol Int.* 2009 Jun;3(2):378-83. 査読有

⑥ Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Hepatol Int.* 2009 Sep;3(3):497-503. 査読有

⑦ Shinozaki M, Ikeda K, 他 4 名の 4 番目 Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNFalpha-null mice. *Arch Dermatol Res.* 2009 Aug;301(7):531-7. 査読有

⑧ Higashiyama R, Ikeda K, Inagaki Y. 他 8 名の 7 番目 Negligible contribution of bonemarrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1459-66. e1. 査読有

⑨ Yamanaka O, Ikeda K, 他 4 名の 最後 Suppression of injury-induced conjunctiva scarring by peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene transfer in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jan;50(1):187-93. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

① 杉山良典、富谷智明、池田一雄、小池亨、塩尻信義マウス肝臓発生過程における syntaxin2 の発現と肝芽細胞の増殖・分化に対する影響 第 17 回肝細胞研究会 平成 22 年 6 月 19 日 秋田アトリエ

② 関谷由美子 小川智弘 飯塚昌司 吉里勝利 池田一雄 河田則文 I 型インターフェロンのマイクロRNA発現調節を介した肝星細胞増殖抑制作用 第46回日本肝臓学会総会 平成22年5月27日山形

③ 陳輝 小川智之 飯塚昌司 関谷由美子 諏訪友紀子 上田優希子 庄秋栄 葛岩 後藤公寿 河田則文 池田一雄 肝星細胞活性化におけるマイクロRNAの関与についての検討 第23回肝類洞壁細胞研究会 大阪, 平成21年12月12日

④ 飯塚昌司 小川智之 関谷由美子 吉里勝利 池田一雄 河田則文 星細胞のコラーゲン発現に關与するマイクロRNAとその機能第23回肝類洞壁細胞研究会 大阪, 平成21年12月12日

⑤ 金井美晴、村田義夫、池田一雄、曾爾彊。肝疾患の治療を目的とするドラッグデリバリーシステムの開発と形態学。解剖学雑誌2009;84 卷S18-2, Page107 第114回日本解剖学会総会 岡山 平成21年3月30日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 一雄 (IKEDA KAZUO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80275247