

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21592

研究課題名（和文）肝組織間質蛋白の糖鎖修飾構造を標的とした肝線維化に対する糖鎖創薬の基盤形成

研究課題名（英文）Targeting the glycosylated structure of liver tissue stromal proteins to form the basis for glycosylation drug discovery for liver fibrosis.

研究代表者

坂本 直哉（Sakamoto, Naoya）

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：10334418

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、肝星細胞を標的とした細胞・薬物療法による肝線維化の組織修復を促進する治療法を開発するため、血清・細胞内の包括的糖鎖修飾解析を行い、下記の成果を得た。1.血清糖タンパク質糖鎖の包括的解析をおこない、組織障害のステージに有意に関連する修飾糖鎖構造およびそのキャリアタンパク質として、IgA、Fibronectinをはじめとする複数の蛋白を同定した。2.培養肝星細胞活性化に関連するmicro RNAの包括的解析を施行し、miR-29a、miR-449a、その他特定のmiRNAが関連することを示した。3.培養肝星細胞の活性化に関連する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化に関連する患者血清中の複合糖鎖解析とその機能解析から抗体薬等の開発の可能性を見いだした。また、血清分泌型microRNAの網羅的探索、MSC培養液から肝線維化抑制効果を担う蛋白、小分子の探索など、多くの治療標的を同定し、創薬につながる基盤を形成することができた。今後、同定された候補miRNAの制御遺伝子のpathway解析、さらにanti-miRNAによる発現抑制が星細胞活性化抑制、肝線維化抑制効果をもたらすか否かを検証する。

研究成果の概要（英文）：We performed a comprehensive analysis of serum and cellular glycosylation in order to develop cellular and pharmacological therapies targeting hepatic astrocytes to promote tissue repair of liver fibrosis, and obtained the following results: 1. Comprehensive analysis of micro RNAs associated with the activation of cultured hepatic astrocytes showed that miR-29a, miR-449a, and other specific miRNAs were associated.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は、種々の原因により起こる肝細胞の慢性壊死炎症反応により肝線維化、肝機能低下および門脈圧亢進症を来す慢性肝疾患の終末像である。肝線維化は、種々の原因により活性化した肝星細胞からの細胞間質へのコラーゲン産生、沈着により形成され、従来不可逆性の病態と考えられてきた。しかし、ウイルス駆除など、原因の除去により肝線維化が消退することが知られてきている。現在国内外で、肝線維化を標的とした様々な治療薬の開発が進んでいるが、臨床効果の検証された有効な治療法は未だなく、新規治療薬、治療標的の開発、研究が急務である。

血液中、組織間質に存在する蛋白は、その多くに様々なタイプの糖鎖が付加されているが、近年その糖鎖修飾構造の変化と、様々な疾患の病態や予後への関与が報告され、糖鎖は“第3の生命鎖”として注目されている。我々は、血清、細胞の網羅的な複合糖質糖鎖解析(総合グライコムクス)を行う解析系を独自に構築し、特定のシアル酸を持つ糖タンパクが NASH (非アルコール性脂肪肝炎) による肝線維化の進展と強く関連し上昇することを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究で申請者らは従来の肝庇護、原疾患治療を主体とした肝硬変治療から視点を新たにし、肝線維化の組織病態に関連する肝間質蛋白とそれらへの特定の糖鎖修飾構造を標的とする小分子、レクチン、抗体を大規模探索し、糖鎖修飾構造を標的とした肝線維化を抑制する分子標的治療法の開発、および候補化合物を用いた非臨床 proof of concept の獲得を目的として研究を遂行する。

3. 研究の方法

本研究では、肝線維化、肝発癌やC型ウイルス肝炎患者のDAA治療後症例の血清を対象とし、総合グライコムクス(糖鎖修飾構造の包括解析)を行い、病態の進行、軽快に関連する蛋白、分子を探索する。同定された候補分子については、機能解析を進めると共に、化合物ライブラリーを用いた阻害活性物質の探索、抗体、レクチンライブラリーの探索を進め、治療標的としての解析を進める。

(1) 複合糖質糖鎖解析(総合グライコムクス): 生体に存在する糖タンパク質糖鎖(N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖)、スフィンゴ糖脂質、グリコサミノグリカン(コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸)、遊離オリゴ糖等の複合糖質糖鎖等の包括的解析法により、大規模グライコムクスデータを取得する。さらに、組織障害のステージに有意に関連する修飾糖鎖構造およびそのキャリアタンパク質の同定を試みる。

(2) 糖鎖構造に結合する抗体、小分子のハイ・スループットスクリーニング: 同定された糖鎖修飾構造に対する特異抗体、レクチンを探索する。臨床薬、生理活性の知られている化合物ライブラリー、および多様志向性合成(Diversity Oriented Synthesis、DOS)によるランダム化合物ライブラリーを用いたHigh-Throughput Screening (HTS)を行い、修飾構造に結合し、培養肝星細胞(LX2細胞)におけるcollagen-I産生を抑制する薬剤・化合物を探索する。

(3) 培養間葉系幹細胞における肝線維化・修復に関連する成分分析: 申請者らは、間葉系幹細胞(AM-MSc)の培養上清から組織修復効果、およびNF-kappa Bを介するサイ

トカイン産生を協力を抑制するエクソソーム分画を同定している (Ohhara et al. Stem Cells International 2018)。本研究では、さらに MSC 培養液から肝線維化抑制効果を担う蛋白、小分子の探索を進め、さらに化合物の正確な構造の特定、脂肪酸誘導体ライブラリーを用いた構造活性相関解析を進める。

4. 研究成果

(1) 血清組織糖鎖修飾構造の網羅的探索：血清糖タンパク質糖鎖 (N-結合型糖鎖、O-結合型糖鎖)、スフィンゴ糖脂質、グリコサミノグリカン (コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸)、遊離オリゴ糖等の複合糖質糖鎖等の包括的解析をおこない、組織障害のステージに有意に関連する修飾糖鎖構造およびそのキャリアタンパク質として、IgA、Fibronectin をはじめとする複数の蛋白を同定した。種々の肝線維化ステージの NASH 症例の血清 IgA の糖鎖修飾構造を解析し、肝線維化進展例で特定の修飾 IgA が増加することを示した。

(2) 肝線維化、星細胞活性化に関連する組織中、血清分泌型 microRNA の網羅的探索：培養肝星細胞活性化に関連する micro RNA の包括的解析を施行し、miR-29a、miR-449a、その他特定の miRNA が活性化星細胞で高発現し、knock down により星細胞 alpha-SMA、type-I collagen 発現が抑制されることを示した。Pathway 解析では、これらの miRNA は細胞骨格、細胞外マトリックス、chemotaxis 関連経路の蛋白の発現を調節していることが明らかとなった。

(3) 培養星細胞、間葉系幹細胞をもちいた肝線維化・修復に関連する成分分析を行い、パルミトイルエタノールアミンが PPAR-alpha を介して、肝線維化抑制、抗炎症作用を呈することが見いだされた。

4. 培養肝星細胞由来 RI-T 細胞株および初代ヒト肝星細胞を用いて、Kupffer 細胞共培養下の LPS 刺激、TGF- 添加培養などにより活性化星細胞構築のための培養条件の設定等をおこなった。

引用文献

1. Ogawa K, Kobayashi T, Furukawa JI, Hanamatsu H, Nakamura A, Suzuki K, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Nakai M, Sho T, Suda G, Morikawa K, Baba M, Furuya K, Terashita K, Kobayashi T, Onodera M, Horimoto T, Shinada K, Tsunematsu S, Tsunematsu I, Meguro T, Mitsuhashi T, Hato M, Higashino K, Shinohara Y, Sakamoto N, Tri-antennary tri-sialylated mono-fucosylated glycan of alpha-1 antitrypsin as a non-invasive biomarker for non-alcoholic steatohepatitis: a novel glyco-biomarker for non-alcoholic steatohepatitis. Sci Rep. 2020, 10, 321. 10.1038/s41598-019-56947-1.
2. Kawagishi N, Suda G, Kimura M, Maehara O, Yamada R, Tokuchi Y, Kubo A, Kitagataya T, Shigesawa T, Suzuki K, Ohara M, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Kudo Y, Nishida M, Sakamoto N, Baseline elevated serum angiopoietin-2 predicts long-term non-regression of liver fibrosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C. Sci Rep. 2021, 11, 9207. 10.1038/s41598-021-88632-7.
3. Maehara O, Suda G, Natsuizaka M, Shigesawa T, Kanbe G, Kimura M, Sugiyama M, Mizokami M, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Naganuma S, Okubo N, Ohnishi S, Takeda H, Sakamoto N, FGFR2

maintains cancer cell differentiation via AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2021, 22, 372-380.
10.1080/15384047.2021.1939638.

4. Yoshida Sonoe, Suda Goki, Sakamoto Naoya et al. Frequency and Characteristics of Overestimated Renal Function in Japanese Patients with Chronic Liver Disease and Its Relation to Sarcopenia. *Nutrients.* 2021, 13, 2415,
10.3390/nu13072415.
5. Nakai M, Yamamoto Y, Baba M, Suda G, Kubo A, Tokuchi Y, Kitagataya T, Yamada R, Shigesawa T, Suzuki K, Nakamura A, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Furuya K, Sakamoto N, Prediction of hepatocellular carcinoma using age and liver stiffness on transient elastography after hepatitis C virus eradication. *Sci Rep.* 2022, 12, 1449,
10.1038/s41598-022-05492-5.
6. Nakamura A, Yamamoto K, Sakamoto N et al. The potential of soluble CD14 in discriminating nonalcoholic steatohepatitis from nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res.* 2022, Epub ahead of print.
10.1111/hepr.13757.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Ogawa K, Kobayashi T, Furukawa JI, Hanamatsu H, Nakamura A, Suzuki K, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Nakai M, Sho T, Suda G, Morikawa K, Baba M, Furuya K, Terashita K, Kobayashi T, Onodera M, Horimoto T, Shinada K, Tsunematsu S, Tsunematsu I, Meguro T, Mitsunashi T, Hato M, Higashino K, Shinohara Y, Sakamoto N	4. 巻 10
2. 論文標題 Tri-antennary tri-sialylated mono-fucosylated glycan of alpha-1 antitrypsin as a non-invasive biomarker for non-alcoholic steatohepatitis: a novel glycomarker for non-alcoholic steatohepatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56947-1	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 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Shimazaki Tomoe, Yamada Ren, Kitagataya Takashi, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Nakamura Akihisa, Ohara Masatsugu, Umemura Machiko, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuizaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 50
2. 論文標題 High serum angiopoietin 2 level predicts non regression of liver stiffness measurement based liver fibrosis stage after direct acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 671 ~ 681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13490	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 Maehara Osamu, Suda Goki, Natsuizaka Mitsuteru, Shigesawa Taku, Kanbe Gouki, Kimura Megumi, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Nakai Masato, Sho Takuya, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohashi Shinya, Kagawa Shingo, Kinugasa Hideaki, Naganuma Seiji, Okubo Naoto, Ohnishi Shunsuke, Takeda Hiroshi, Sakamoto Naoya	4. 巻 22
2. 論文標題 FGFR2 maintains cancer cell differentiation via AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Biology & Therapy	6. 最初と最後の頁 372 ~ 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15384047.2021.1939638	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 Yoshida Sonoe, Suda Goki, Sakamoto Naoya et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Frequency and Characteristics of Overestimated Renal Function in Japanese Patients with Chronic Liver Disease and Its Relation to Sarcopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2415 ~ 2415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13072415	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 Nakai Masato, Yamamoto Yoshiya, Baba Masaru, Suda Goki, Kubo Akinori, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Nakamura Akihisa, Sho Takuya, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Furuya Ken, Sakamoto Naoya	4. 巻 12
2. 論文標題 Prediction of hepatocellular carcinoma using age and liver stiffness on transient elastography after hepatitis C virus eradication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05492-5	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 Nakamura A, Yamamoto K, Sakamoto N et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 The potential of soluble CD14 in discriminating nonalcoholic steatohepatitis from nonalcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13757	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	須田 剛生 (Suda Goki) (20447460)	北海道大学・大学病院・特任助教 (10101)	

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
研究分担者	古川 潤一 (Furukawa Jun-Ichi) (30374193)	北海道大学・医学研究院・特任准教授 (10101)	

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