

平成 29 年 5 月 29 日

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 肝炎等克服緊急対策研究事業
(英語) Program for Basic and Clinical Research on Hepatitis

研究開発課題名：(日本語) 星細胞の活性化制御を基軸とする肝硬変治療薬の開発
(英語) Development of therapy for liver cirrhosis based on the regulation of hepatic stellate cell activation

研究開発担当者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 教授 河田則文
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Graduate School of Medicine,
Professor of Medicine, Norifumi Kawada

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 肝星細胞に関するエピジェネティクス制御解析
開発課題名：(英語) Epigenetic regulation of hepatic stellate cell activation
研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 教授 池田一雄
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Graduate School of Medicine,
Professor of Anatomy, Kazuo Ikeda

分担研究 (日本語) miRNA による肝線維化制御
開発課題名：(英語) Regulation of hepatic fibrosis by miRNA
研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授 村上善基
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Graduate School of Medicine,
Associate Professor of Medicine, Yoshiki Murakami

分担研究 (日本語) 肝硬変治療薬の前臨床開発と老化星細胞の機能解析
開発課題名：(英語) Preclinical evaluation of compounds directed to liver cirrhosis
therapy
and functional analyses of senescent hepatic stellate cells
研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 准教授 松原 勤
所属 役職 氏名：(英語) Osaka City University Graduate School of Medicine,

分 担 研 究 (日本語) Cygb 過剰発現の肝炎症や線維化に及ぼす影響の検討

開 発 課 題 名 : (英 語) Study on the effect of Cygb overexpression on hepatic inflammation and fibrosis

研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 特任助教 Thuy le TT

所属 役職 氏名 : (英 語) Osaka City University Graduate School of Medicine,
Project Research Associate, Thuy le TT

分 担 研 究 (日本語) FGF2 の in vivo 脱線維化作用の確認と作用機序の分子解析

開 発 課 題 名 : (英 語) Study on the molecular mechanism of FGF2-induced stellate cell deactivation and in vivo anti-fibrotic effect

研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 特任助教 松原三佐子

所属 役職 氏名 : (英 語) Osaka City University Graduate School of Medicine,
Project Research Associate, Misako Matsubara

分 担 研 究 (日本語) サイトグロビンを利用した肝星細胞活性化制御法の開発

開 発 課 題 名 : (英 語) Development of strategies for hepatic stellate cells activation by the use of Cygb

研究開発分担者 (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科 特任教授 吉里勝利

所属 役職 氏名 : (英 語) Osaka City University Graduate School of Medicine,
Research Professor, Katsutoshi Yoshizato

II. 成果の概要 (総括研究報告)

平成 28 年度は肝局所炎症や線維化の病態形成におけるサイトグロビン (Cytoglobin, Cygb) の分子意義を解析すると同時に、fibroblast growth factor 2 (FGF2) の in vitro での星細胞脱活性化効果に関わる細胞内シグナル解明を行い、in vitro POC を確立し、in vivo マウス肝線維化モデルで FGF2 の脱線維化効果を評価した。FGF2 様の生物活性を示す化合物 X に関してその薬理効果の解析を進めた。

[1]Cygb誘導剤FGF2のin vitro星細胞脱活性化作用の分子解析

(1) FGF2 はヒト HSC 細胞株 (HHStcC 細胞) の脱活性化を誘導し、Cygb を誘導する一方で、collagen 1A1 産生を抑制した (論文投稿中)。UCL Institute for Liver and Digestive Disease の Massimo Pinzani 教授との共同研究でヒト初代培養 HSC を供与され、HHStcC 細胞で得られた結果についてヒト HSC で追試した。

(2) HHStcC 細胞には FGF 受容体が発現し、FGFR2-JNK-cJUN シグナルで Cygb を誘導し HSC を脱活性化させた。一方、TGF β シグナルは Smad2-SP1 依存性に Cygb 発現を減少させ collagen 1A1 産生を誘導した (論文執筆中)。即ち FGF2 と TGF β は拮抗して Cygb 発現と HSC の活性化を制御するため本現象を脱活性化剤開発に利用する。

(3) 次いで in vivo 胆管結紮 (BDL) による肝線維化モデルで肝線維化を惹起したのち FGF2 を 2 回投与すると、肝線維化は軽減し、 α 平滑筋アクチン染色、collagen 1A1 や TGF β mRNA などの遺伝子発

現は低下した。即ち、FGF2はin vivoモデルにおいても線維化を改善した（論文投稿中）。

[2] Cygb過剰発現の肝炎症や線維化に及ぼす影響の検討

我々はCygb KOマウスを用いて種々の検討を行いCygb欠損は肝炎症や線維化を増悪させることを示した（Sci Rep 2017;7:41888, Sci Rep 2016;6:24990, Am J Pathol 2015;185:1045, Am J Pathol 2011;179:1050）。加えてCygbプロモーターを用いたTgマウス（Cygb_mCherryマウス）を作製し、野生型、KOマウスの病態と比較検討した結果、Cygb_mCherryマウスでは、BDLモデルにおいて肝線維化は軽減した。さらに形成された線維化組織からのregressionが加速した。この結果、in vivoにおいても星細胞のCygb発現は肝臓の炎症や線維化反応に重要な蛋白である事が示された（論文執筆中）。

[3] ヒトリコンビナントCygb (rhCygb) の脱線維化治療への応用

我々はヒトリコンビナント Cygb (rhCygb) 自体が直接的に肝炎症や線維化反応を調節するのではないかと考え、下記の検討を行なっている。

- 1) His-rhCYGBのHHStEC細胞の活性化に及ぼす効果；2) His-rhCYGBは細胞内に取り込まれるか？
- 3) His-rhCYGBのin vivo肝線維化モデルに対する効果；4) Hisタグ以外のタグの開発

[4] Cygb誘導剤1,4-naphthoquinone類のin vitro, in vivo脱線維化作用の確認

(1) 大阪大学産学連携化合物ライブラリーから提供を受けた約2万化合物の中からHSCのコラーゲン産生抑制物質としてXを見いだした（特許出願準備中）。本物質はHHStEC細胞に対してCygbを誘導し、collagen 1A1やTGF β 発現を抑制した。現在までのところ本物質のCygb誘導能は数 μ M程度で発揮された。

(2) 化合物Xとその構造類似体に関してin vitro POCを確立する為、より詳細にIC50の決定、Cygbや他の遺伝子発現への影響、毒性評価、肝細胞機能への影響を検討した。特にどのような機序でその薬理効果が発揮されるのかの端緒として、Xの結合蛋白質Yを同定した。

(3) Xとその構造類似体に関して動物POC確立へと実験を進めている。

[5] microRNA-29aの脱線維化効果と核酸創薬への取り組み

(1) 予てより取り組んでいるmicroRNA創薬に関して、マウスのin vivoモデル実験にてmiR-29aの脱線維化効果が確認できたため、microRNAの効率的な肝臓へのデリバリーなど核酸創薬へと進めて報告した（Mol Ther 2016;24:1848）。

In fiscal year 2016, we studied role of cytoglobin (Cygb) on inflammation and fibrosis in the liver. In particular, since fibroblast growth factor 2 (FGF2) has been identified as Cygb inducer and deactivates human hepatic stellate cells (HSCs), we have analyzed intracellular molecular signalings emerged by FGF2 and evaluated in vivo effect of FGF2 against liver fibrosis in mouse models.

[1] Molecular mechanism on in vitro deactivation of human HSCs by FGF2 via Cygb induction

(1) FGF2 induces Cygb, deactivates human HSC cell line (HHStEC) and inhibit their collagen production (in submission). We are able to obtain primary human HSCs from UCL Institute for Liver and Digestive Disease in collaboration with Prof. Massimo Pinzani. Thus, we evaluated the effect of FGF2 also against primary HSCs.

(2) FGF2 stimulated FGF receptor type 2 and induced Cygb gene expression via FGFR2-JNK-cJUN signalings. On the other hand, we showed TGF β reduced Cygb and increased collagen 1A1 via Smad-SP1

signalings. Taken together, it has been elucidated FGF2 and TGF β compete with each other in Cygb and collagen 1A1 expression.

(3) We evaluated in vivo effect of FGF2 by administrating it to liver fibrosis model induced by bile-duct ligation in mice. Two-time injection of FGF2 markedly regressed developed liver fibrosis, which was accompanied with decrease of collagen 1A1 and TGF β mRNA expression.

[2] Effect of Cygb overexpression on hepatic inflammation and fibrosis

We have demonstrated that Cygb deficiency aggravates hepatic inflammation and fibrosis in several mouse models (Sci Rep 2017;7:41888, Sci Rep 2016;6:24990, Am J Pathol 2015;185:1045, Am J Pathol 2011;179:1050). Successively, we generated Cygb transgenic mice (Cygb_mCherry mice) by using Cygb specific promoter. Cygb_mCherry mice showed minimum fibrosis development in BDL mice compared to wild-type and KO mice. Fibrosis regression was also remarkable in Cygb_mCherry mice. Taken together, It has been proved that Cygb plays protective roles in hepatic inflammation and fibrosis in vivo in addition to cultured HSCs.

[3] Application of recombinant human Cygb (rhCygb) to anti-fibrotic therapy

Based on the results of above-mentioned our experiment, we consider that rhCygb might be a possible candidate molecule to develop the therapy of liver fibrosis regression. Thus, we are performing the following studies.

- 1) Effect of His-rhCygb on the activation of HHStcC; 2) Incorporation of His-rhCygb into HHStcC?
- 3) Effect of His-rhCygb on rodent models of liver fibrosis; 4) Development of new tag except for His

[4] In vitro and in vivo anti-fibrotic effects of Cygb-inducer 1,4-naphthoquinone analogues

(1) Among 20,000 chemicals provided from Osaka University library, we have identified compound X, which inhibits collagen production by LX-2 cells (preparation for patent). Compound X induced Cygb gene expression, but suppress collagen 1A1 and TGF β mRNA expression in HHStcC. Compound X exhibited its pharmaceutical action at a few μ M order.

(2) Compound X and its analogues were tested for their effect on Cygb and the other fibrosis-related gene expressions, cytotoxicity, and the function of the liver in detail in order to obtain in vitro POC. In particular, to analyze the mechanism involved in the pharmaceutical action of compound X, we have identified protein Y, which is a binding partner of compound X, in HHStcC.

(3) Compound X and its analogues were tested to determine their effects of in vivo liver fibrosis to obtain POC.

[5] Approach to the development of nucleic acid therapy by using microRNA-29a; We have been studying the development of microRNA therapy against liver fibrosis. We elucidated that microRNA-29a is able to regress developed liver fibrosis in rodent models of liver fibrosis induced by CCl₄ and TAA (Mol Ther 2016;24:1848).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4 件、国際誌 8 件）

1. Liu X, El-Mahdy MA, Boslett J, Varadharaj S, Hemann C, Abdelghany TM, Ismail RS, Little SC, Zhou D, Thuy LT, Kawada N, Zweier JL. Cytoglobin regulates blood pressure and vascular tone through nitric oxide metabolism in the vascular wall. **Nat Commun.** 2017 Apr 10;8:14807.

2. Van Thuy TT, Thuy LT, Yoshizato K, Kawada N. Possible Involvement of Nitric Oxide in Enhanced Liver Injury and Fibrogenesis during Cholestasis in Cytochrome-deficient Mice. **Sci Rep**. 2017 Feb 3;7:41888.
3. Sato-Matsubara M, Kawada N. New player in tumor-stromal interaction: Granulin as a novel therapeutic target for pancreatic ductal adenocarcinoma liver metastasis. **Hepatology**. 2017 Jan;65(1):374-376.
4. Murakami Y, Kawada N. MicroRNAs in hepatic pathophysiology. **Hepatol Res**. 2017 Jan;47(1):60-69.
5. 榎本 大, 元山 宏行, 河田 則文. Cytochromeと肝星細胞活性化. **肝・胆・膵** 74巻1号 Page 41-46 (2017. 01)
6. 小田桐 直志, 元山 宏行, 河田 則文. 肝線維化研究の進歩. **肝・胆・膵** 74巻1号 Page11-17 (2017. 01)
7. 松原 三佐子, 河田 則文. 肝線維化進展の分子機構. **肝・胆・膵** 73巻6号 Page873-879 (2016. 12)
8. Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, Yoshizato K, Kawada N, Murakami Y. MiR-29a Assists in Preventing the Activation of Human Stellate Cells and Promotes Recovery From Liver Fibrosis in Mice. **Mol Ther**. 2016 Oct;24(10):1848-1859.
9. Thuy le TT, Van Thuy TT, Matsumoto Y, Hai H, Ikura Y, Yoshizato K, Kawada N. Absence of cytochrome promotes multiple organ abnormalities in aged mice. **Sci Rep**. 2016 May 5;6:24990.
10. Yoshizato K, Thuy le TT, Shiota G, Kawada N. Discovery of cytochrome and its roles in physiology and pathology of hepatic stellate cells. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**. 2016;92(3):77-97.
11. 河田 則文. 肝線維化の分子・細胞メカニズム. **Schneller** 98号 Page13-17 (2016. 04)
12. Thuy Le TT, Hai NT, Hai H, Kawada N. Pathophysiological role of cytochrome, the fourth globin in mammals, in liver diseases. **Histol Histopathol**. 2016 Mar;31(3):257-67.
13. Thuy le TT, Van Thuy, Hai H, Kawada N. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Chapter 17. Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Hepatic Fibrosis. Elsevier publishing group. 2016, p213-220.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Contribution of hepatic stellate cells to inflammation, fibrosis and cancer in steatohepatitis. 口頭, Kawada N, Thuy le TT, Matsubara M. APASL Single Topic Conference, 2017/04/11, 長崎、国内
2. Role of Cytochrome in the Development of Liver Fibrosis and Cancer in Human and in a Mouse Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis” 口頭, Thuy le TT, Van Thuy TT, Hai H, Yoshizato K, Kawada N. APASL Single Topic Conference, 2017/04/11, 長崎、国内
3. Development of nucleic acid therapy for liver fibrosis. ポスター、Murakami Y, Itami S, Hayakawa M, Kuroda M, Kawada N. Keystone Symposia Conference□J5: Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics. 2017/02/5-9, Banff, Alberta, USA、国外
4. Involvement of nitric oxide in liver injury and fibrogenesis of bile-duct-ligated cytochrome-deficient mice. ポスター, Van Thuy, TT, Thuy le TT, Kawada N, Yoshizato K. AASLD 2016/11/11-15, Boston, USA、国外

5. Correlation of cytoglobin level in stellate cells with promotion or attenuation of liver fibrosis and cancer in mice. ポスター, Thuy le TT, Van Thuy TT, Hai H, Yoshizato K, Kawada N, AASLD 2016/11/11-15, Boston, USA、国外
6. Identification of exosomal miRNAs in early stage of hepatocarcinogenesis. ポスター、Murakami Y, Tsuneyama K, Itami S, Hayakawa M, Ando M, Tanahashi T, Kawano M, Kawada N, Y-h Taguchi. AASLD The Liver Meeting 2016/11/11-15, Boston MA, USA、国外
7. Handling of activation status of human hepatic stellate cells by low-molecular-weight FGF2 via the induction of cytoglobin. ポスター, Sato-Matsubara M, Matsubara T, Daikoku A, Ikeda K, Rombouts K, Pinzani M, Kawada N, EASL 2016/04/13-17, Barcelona, Spain、国外
8. Regulation of cytoglobin expression in human hepatic stellate cells by low-molecular-weight FGF2、口頭、Sato-Matsubara M, Daikoku A, Kawada N. XIX Conference on Oxygen-Binding and Sensing Proteins 2016/09/11-14, The University of Hamburg, Germany、国外
9. Spontaneously and chemical/diet induced liver fibrosis and cancer development in Cygb-deficient mice via regulating nitric oxide. ポスター, Thuy le TT, Van Thuy TT, Hai H, Yoshizato K, Kawada N, XIX Conference on Oxygen-Binding and Sensing Proteins 2016/09/11-14, The University of Hamburg, Germany、国外
10. 肝星細胞の脱活性化を誘導するサイトグロビン発現促進機構の解析. 口頭、松原三佐子、大黒敦子、松原勤、池田一雄、河田則文、第52回日本肝臓学会総会 2016/5/19-20、千葉、日本、国内
11. 肝星細胞の遺伝子発現における胆汁酸の影響. ポスター、松原勤、寺西優雅、小田桐直志、河田則文、池田一雄、第23回肝細胞研究会、2016/07/7-8、国内
12. 肝星細胞におけるTGF- β 1のCYGB発現抑制機構の解析. ポスター、翁良徳、松原三佐子、松原勤、大黒敦子、池田一雄、吉里勝利、河田則文、第23回肝細胞研究会、2016/07/7-8、国内
13. FGF2はCytoglobinとSMA遺伝子発現を制御し肝細胞の脱活性化を促進する. ポスター、松原三佐子、大黒敦子、松原勤、池田一雄、河田則文、第23回肝細胞研究会、2016/07/7-8、国内
14. ヒト老化肝星細胞の遺伝子発現解析. 口頭、小田桐直志 松原勤、河田則文、池田一雄、第30回肝類洞壁細胞研究会、2016/11/25-26、国内
15. ヒト肝星細胞におけるFGF2のCytoglobin遺伝子発現制御. 口頭、松原三佐子、大黒敦子、松原勤、池田一雄、河田則文、第30回肝類洞壁細胞研究学術集会、2016/11/25-26、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし