

より効果的な肝臓再生療法の提供のための基礎研究
—骨髄間葉系幹細胞の培養法の検討と補助療法の開発—

学位申請者

山口大学大学院医学系研究科博士後期課程
保健学専攻 生体情報検査学領域

原 和牙

目次

要旨.....	1
第1章 緒論.....	3
1.1 肝硬変症の疾患概念と疫学.....	3
1.2 肝線維化における細胞外マトリックス構成蛋白.....	3
1.3 再生医療における骨髄間葉系幹細胞.....	5
1.4 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法.....	6
1.5 本研究の目的.....	6
第2章 アスコルビン酸添加培地を使用した骨髄間葉系幹細胞の培養法の検討.....	7
2.1 研究の背景および目的.....	7
2.2 方法.....	8
2.3 結果.....	10
2.4 考察.....	18
第3章 hsa-miR-5682 を用いた抗線維化核酸医薬品の開発.....	20
3.1 研究の背景および目的.....	20
3.2 方法.....	21
3.3 結果.....	24
3.4 考察.....	32
総括.....	34
結語.....	36
謝辞.....	37
参考文献.....	38

要旨

【背景および目的】

非代償性肝硬変症に対する有効な治療法は肝移植のみであるが、手術のリスクや長期にわたる免疫抑制剤の内服など患者への負担は多く、ドナー不足により実施は限られているため、現代医療において内科的新規治療法の開発が望まれている。山口大学大学院医学系研究科消化器内科学では自己骨髄間葉系幹細胞 (autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells: autologous BMSC) を用いた肝臓再生療法を開発し、臨床研究にて安全性と一定の有効性を報告してきた。BMSC の分離増殖培養には基本培地としてウシ胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) が使用されているが、DMEM はマウス由来細胞の培養を目的に作製されたものであり、ヒト由来細胞の培養ではアスコルビン酸の不足が予想され、BMSC の分離増殖培養への影響が考えられる。そこでアスコルビン酸添加培地 (AsA-medium) を作製し、BMSC に対するアスコルビン酸の影響を検討した。また、肝臓再生療法では肝線維化の改善に伴う肝臓再生の促進が重要であり、BMSC の細胞間相互作用に、肝星細胞の線維産生を抑制する補助療法を追加することで治療効果が高まると考え、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の構成成分である線維性コラーゲンや弾性線維を標的遺伝子とする *Homo sapiens* microRNA-5682 (hsa-miR-5682) を用いた抗線維化補助療法の開発を試みた。

【方法】

① アスコルビン酸添加培地を使用した BMSC の培養法の検討

水溶液で安定性を示す L-アスコルビン酸パルミチン酸エステルを使用し AsA-medium を作製した。AsA-medium を用いて骨髄単核球分画より BMSC を分離培養するとともに、すでに分離された BMSC を AsA-medium で培養し、細胞増殖能や分化能、細胞代謝への影響を検討した。

② hsa-miR-5682 を用いた抗線維化核酸医薬品の開発

hsa-miR-5682 をヒト肝星細胞 (human hepatic stellate cell: HHStcC) およびマウス肝星細胞株 (murine hepatic stellate cell line; mHSC) に導入し、細胞増殖能と collagen I, collagen III, collagen V, elastin の発現について MTS assay, real-time PCR, Western blotting で評価した。また、培養上清を用いて III 型プロコラーゲン N 末端ペプチド (P-III-P) 濃度を測定し、HHStcC に対する BMSC と hsa-miR-5682 の collagen III 産生抑制効果を評価した。BMSC と HHStcC の共培養系において hsa-miR-5682 発現を評価し、BMSC による線維産生抑制の作用機序に hsa-miR-5682 が関与するか検討した。さらに、hsa-miR-5682 導入した HHStcC と mHSC の遺伝子発現について SAGE 解析を行い、オルソログとして作用するか検証した。

【結果】

① アスコルビン酸添加培地を使用した BMSC の培養法の検討

AsA-medium では、BMSC の分離・増殖が促進し、脂肪細胞への分化能を亢進した。また、コラーゲン線維の産生を増加させることが確認され、AsA-medium による増殖能は通常培養でコラーゲンコート培養皿を用いた時と同等の細胞増殖を示した。さらに、AsA-medium で培養された BMSC に対してメタボローム解析や網羅的遺伝子解析を行うと、クエン酸回路やヌクレオチド代謝の促進を認め、HIF1 α の下流遺伝子の発現が低下を認めた。低酸素状態を模倣した環境で培養すると、AsA-medium を使用した BMSC では酸素消費量の上昇を認め、AsA の HIF1 α の分解促進によるミトコンドリア活性化が引き起こされていることが示唆された。

② hsa-miR-5682 を用いた抗線維化核酸医薬品の開発

hsa-miR-5682 は negative control microRNA に比べ、HHSteC の細胞増殖を有意に抑制し、COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, ELN 発現を有意に低下させ、collagen I, collagen III, collagen V, elastin 発現を有意に減少させた。一方、mHSC では細胞増殖の低下と Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col5a1, Col5a2 発現の有意な低下、collagen I, collagen III 発現の有意な減少を認めた。hsa-miR-5682 は BMSC と同等の collagen III 産生抑制効果を示したが、BMSC との共培養で HHSteC の hsa-miR-5682 発現に変化は認めず、BMSC の作用機序への関与は否定的であった。hsa-miR-5682 は HHSteC と mHSC で共通して線維化関連遺伝子 COL1A1, COL3A1, COL4A1, COL5A2, SPARC, SERPINH1, FATL1, KCNN4 の発現を抑制し、"amoebiasis", "ECM-receptor interaction", "focal adhesion" など 6 pathways を抑制した。hsa-miR-5682 により発現が増加する遺伝子群に共通性を認めなかった。

【結論】

現行の BMSC 培養ではアスコルビン酸不足による細胞増殖・分化が抑制されており、BMSC を効率よく分離培養するためにはアスコルビン酸の補充が必要であると考えられる。また、hsa-miR-5682 は細胞増殖の抑制と ECM 蛋白および分子シャペロン発現の網羅的抑制により、HHSteC と mHSC の線維産生を抑制した。hsa-miR5682 は BMSC とは異なる機序で線維産生を抑制し、BMSC を用いた肝臓再生療法の補助療法を目的とする新規抗線維化核酸医薬品となり得る可能性が示された。

第1章

緒論

1.1 肝硬変症の疾患概念と疫学

肝硬変症は慢性的な肝障害の終末像であり、肝全体に線維性隔壁に囲まれた再生結節が形成された状態と病理学的に定義されている¹⁾。肝硬変症の原因は、B型 (hepatitis B virus; HBV) またはC型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV) などによるウイルス性肝硬変や長期にわたるアルコール継続摂取によるアルコール性肝硬変症、脂肪肝から炎症状態へと進展した非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis ; NASH) 由来肝硬変症、肝臓の慢性的なうっ血によるうっ血性肝硬変症、慢性的な胆汁うっ滞による胆汁性肝硬変症など様々である。2019年に報告された疫学調査では、本邦の患者の多くはウイルス性肝硬変 (total 49.7%, HCV; 48.2%, HBV; 11.5%) であるが²⁾。近年では抗ウイルス剤の普及により、ウイルス性肝炎による肝硬変症は減少傾向にある。しかし、すでに進行した肝硬変症では肝炎ウイルスが制御できたとしても、線維化や発癌等により十分には生命予後が改善しないことが報告されている³⁾。さらに、アルコール多飲者が世界に7,500万人、肥満者が2億人、糖尿病患者が4億人存在し、今後もこれらを背景とする肝硬変症の増加が予測される⁴⁾。

臨床における肝機能の評価は Child-Pugh スコア [① 肝性脳症の有無, ② 腹水の有無, ③ 血清ビリルビン値 (mg/dL), ④ 血清アルブミン値 (g/dL), ⑤ プロトロンビン活性値 (%) の計5項目, 計15点] を用いて3段階 [Grade A (軽度): 5~6点, Grade B (中等度): 7~9点, Grade C (高度): 10~15点] で評価される (Table 1)。肝機能の著しい低下や門脈圧亢進症による腹水や黄疸, 肝性脳症などの合併症を伴った Child-Pugh Grade C は, 非代償性肝硬変症と表現され, 非代償性まで進行した状態では代償期と比較して格段に年間死亡率が上昇する¹⁾。2018年に報告された統計によると, 肝硬変症による死者は世界で年間100万人に及び, 死因の第11位と根治可能な内科的治療は未だない⁴⁾。

1.2 肝線維化における細胞外マトリックス構成蛋白

肝線維化とは, 様々な原因により生じた慢性肝障害の創傷治癒過程において, 活性化肝星細胞が産生した線維が肝実質に過剰に沈着することである⁵⁻⁶⁾。短期間の肝障害であれば, 原因を取り除くことでコラーゲンの分解や肝星細胞のアポトーシス, 肝細胞の再生増殖により肝実質は復元する。しかし, 持続する肝障害においては, 肝細胞の破壊と再生が幾度となく繰り返され, 線維化が進展する。肝臓の線維化において中心的な働きをする肝星細胞は Disse 腔に存在し, 肝構成細胞全体の約15%を占める。生理的状态

では静止期と呼ばれるように非増殖性で、レチノール結合蛋白を介し肝細胞からレチノールを受け取り貯蔵する。肝障害を受け、活性化肝星細胞へと移行すると筋線維芽細胞様に形質転換し増殖性となり、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) 蛋白を産生する⁶⁾。

持続する肝障害により肝線維化が進行し、肝硬変症を来す頃には肝に沈着した線維量の著明な増加がみられ、線維束を形成するコラーゲンの構成も collagen III 優位から collagen I 優位に変化していく⁷⁾。そのため線維化改善を目指した多くの研究で collagen I を線維化改善の指標にしているが、肝線維化では collagen I だけでなく、 $\alpha 1$ 単体で線維を形成する collagen III や線維径調節因子として存在する collagen V、生成された collagen 線維を束ねる役割をもつ elastin など多くの ECM 構成蛋白が複雑に絡み合っ線維化状態を形成している⁸⁾。このことから肝線維化を評価する上では、肝星細胞の産生する ECM 蛋白を網羅的に評価することが必要である。

Table 1. Child-Pugh スコア

	1点	2点	3点
脳症	なし	軽度 (I・II)	昏睡 (III以上)
腹水	なし	軽度	中等度以上
血清ビリルビン値 (mg/dL)	< 2.0	2.0~3.0	> 3.0
血清アルブミン値 (g/dL)	> 3.5	2.8~3.5	> 2.8
プロトロンビン活性値 (%) (PT-INR)	> 70 (< 1.7)	40~70 (1.7~2.3)	< 40 (> 2.3)

※ 各項目の点数をを加算し、合計点で分類する。

Grade A (軽度) : 5~6点

Grade B (中等度) : 7~9点

Grade C (高度) : 10~15点

1.3 再生医療における骨髄間葉系幹細胞

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell; MSC) は中胚葉性組織に由来する体性幹細胞であり, 1999 年に骨髄中の存在を確認されて以降, 現在までに多くの結合組織に存在していることが明らかとなっている⁹⁻¹⁰⁾. この発見から世界中各地で注目され研究対象となったが, 各々独自の分離培養法によって採取した MSC から得られた知見であり, 単純に結果を比較することは困難であった. そこで国際細胞治療学会 (ISCT) によって臨床応用される MSC を定義するための基準が示され¹¹⁾, 基礎および臨床研究における品質管理項目として採用されている (Table 2).

近年では本邦においても, 培養による増殖が可能であると同時に免疫原性が低いことから様々な用途での臨床応用が検討されている. 2015 年には造血幹細胞移植後の急性移植片対宿主病の治療を目的にヒト同種骨髄間葉系幹細胞が再生医療等製品として独立行政法人医薬品医療機器総合機構に承認されており, 希少疾病用再生医療等製品として製造販売されている. さらに 2018 年には脊髄損傷に伴う神経症候および機能障害の改善の治療を目的にヒト自己骨髄間葉系幹細胞が先駆け審査指定再生医療等製品として条件および期限付き承認を得た. このように本邦でも積極的な骨髄間葉系幹細胞の臨床応用が検討されており, 今後も多くの分野で使用されることが想定される. 我々の研究室でも非代償性肝硬変症患者を対象として, ヒト自己骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法を開発し, 臨床研究を進めている.

Table 2. MSC 培養における ISCT 基準

標準的な培養手順にて

- ① プラスチック接着性を有する
 - ② フローサイトメトリー法にて,
CD73, CD90, CD105 陽性 (95%以上) かつ
CD14, CD19またはCD79a, CD34, CD45, HLA-DR 陰性 (陽性率2%以下)
 - ③ 骨芽細胞および脂肪細胞, 軟骨細胞への分化能を有する
-

1.4 自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法

非代償性肝硬変症に対する唯一の治療法は肝移植であるが、ドナー不足や手術侵襲、移植後の免疫抑制剤の使用などの問題があり、肝線維化に対する低侵襲な新規治療法の開発が望まれる。山口大学大学院医学系研究科消化器内科学では、自己骨髄細胞投与が肝線維化及び肝機能を改善させることを見出し、2003年に世界に先駆けて「肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(Autologous Bone Marrow Cell infusion, ABMi療法)」を開始した。山形大学、国立国際医療研究センター、韓国延世大学との共同研究で、安全性および有効性を確認し、現在は“先進医療B”として認可されている。ABMi療法の開発により、これまで困難とされていた非代償性肝硬変症の治療および生命予後の改善が期待されたが、非代償性肝硬変症患者では骨髄採取時の全身麻酔が困難なためにABMi療法が実施できない症例が少なからず存在した。そこで、より低侵襲な局所麻酔下に採取した骨髄液から分離培養した自己骨髄間葉系幹細胞 (autologous bone marrow derived mesenchymal stem cell ; autologous BMSC) を用いた低侵襲肝臓再生療法を開発し、安全性と有効性の評価を目的とする臨床研究を実施している¹²⁻¹⁴⁾。

本治療法において、BMSCは産生する液性因子や細胞接着を介して、肝星細胞の活性化抑制やマクロファージによる線維溶解の誘導、肝臓再生の促進など多面的な作用があると想定される。肝臓再生は線維化の改善に伴う微小環境の変化により促進されることから、肝硬変症の治療においては肝線維化の抑制もしくは改善が必要であり、肝線維化を制御する補助療法の開発によって肝臓再生療法の治療効果はさらに高まると期待される。

1.5 本研究の目的

本研究では、骨髄間葉系幹細胞の生体内と培養時の条件の違いに着目した製造面と、肝線維化を抑制する補助療法の開発による臨床面の双方から検討を行うことで、骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法をより効果的な治療法として改良することを目指す。

第2章

アスコルビン酸添加培地を使用した 骨髄間葉系幹細胞の培養法の検討

2.1 研究の背景および目的

間葉系幹細胞は脂肪細胞や骨細胞、軟骨細胞などの間葉系細胞に分化する能力を有し、再生医療への応用が期待されている。特に骨髄由来の間葉系幹細胞は多能性を示し、炎症を抑制することが知られているため、様々な治療での応用が検討されている。我々の研究室では、自己骨髄間葉系幹細胞 (autologous bone marrow derived mesenchymal stem cell ; autologous BMSC) を用いた非代償性肝硬変症に対する再生療法を開発し、臨床研究にて安全性と一定の有効性を確認している。本臨床研究の背景には、*in vivo* および *in vitro* にて、BMSC により肝細胞のチオアセトアミド誘発酸化ストレスの改善を認めており¹⁵⁾、BMSC を用いた治療において酸化ストレスは重要な因子である。BMSC の分離は患者より採取した骨髄液からなされるが、生体骨髄の酸素濃度は 1~5%程度であり¹⁶⁾、生体内の BMSC は低酸素状態で存在すると考えられる。しかし、現行の細胞培養では通常 20%酸素下で行うため、培養された BMSC は酸化ストレスを受け、遺伝的安定性の維持を損なうことが明らかとなっている¹⁷⁾。さらに培養を繰り返すことで異数体細胞の増加や幹細胞性維持の低下、ゲノム不安定性などの問題も発生するため、治療に使用する BMSC はその時々々の培養条件によって異なる性質を持つことが予想される。今後の BMSC を用いた治療法の確立と発展のためにも培養条件の統一が必要であり、加えてより効果的な BMSC の創出も求められる。

今回、BMSC 培養に使用されている基本培地で不足していると考えられ、抗酸化物質としても有名なアスコルビン酸 (Ascorbic acid; AsA) に着目した。AsA はラクトン構造を持つ有機化合物であり、酸化ストレスを引き起こす活性酸素種を除去し、老化の抑制に関与することが明らかになっている¹⁸⁾。さらに AsA は細胞増殖および分化に影響を与えることがわかっているが、抗酸化効果以外にも様々な酸化反応の補因子として用いられることから、その作用機序は未だに不明のままである¹⁹⁻²⁰⁾。ヒトを含めた霊長類や一部の動物は AsA 合成経路の最終段階を触媒する酵素 L-グルノ- γ -ラクトン-オキシダーゼが欠失しており、体内で AsA を合成できず、食事により摂取している。また、BMSC の基本培地である Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) は元来マウス細胞など AsA を合成できる動物種細胞の培養用に開発されたものである。さらにウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) 中の AsA は不活性化されているため、BMSC 培養において AsA が

不足していると考えられる。

そこで本研究では、水溶液中で十分な安定性を示す L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (L-ascorbic acid palmitic acid ester: AAP) を使用した培地を作製し、BMSC を培養・解析することで AsA 不足状態における BMSC への影響の解明を試みた。

2.2 方法

2.2.1 Cell and culture medium

新鮮ヒト骨髓液単核球分画 (Bone marrow mononuclear cell; BMNC) (Lonza Japan, Tokyo, Japan)より分離培養した BMSC は Flow cytometry Gallios™ (Beckman Coulter, Tokyo, Japan)にて CD45⁻, CD11b⁻, CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺であることを確認した後、増殖培養した。分離・増殖培養に使用した培地は 10% ウシ血清(fetal bovine serum : FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)であり、アスコルビン酸添加培地 (AsA-medium) には L-ascorbic acid palmitic acid ester (AAP) (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan)を加え、0.1, 1.0, 3.0mM に調整した。

2.2.2 Proliferation assay

96 well plate (Corning, Corning, NY, USA)または collagen coat 24 well plate (Corning)を用いて BMSC を IncuCyte HD Imaging System (Essen BioScience, Tokyo, Japan)にて経時的に撮影し、細胞密度を計測した。

2.2.3 Differentiation Ability Assay

Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA)を使用し、BMSC を脂肪細胞へ分化した。分化開始より 14 日後に Oli Red O 染色を行い、合計細胞数と脂肪生成細胞数を 20 field 計測した。

2.2.4 Collagen Quantification

BMSC 培養によって生成されたコラーゲンを Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit (Chondrex, Redmond, WA, USA)を用いて染色、顕微鏡下で撮影した後、540nm (Sirius Red)および 605nm (Fast Green)の吸光度を測定し、コラーゲン量を測定した。

2.2.5 Western Blot Analysis

Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を用いて蛋白溶解サンプルを作成し、10% 2-mercaptoethanol (Fujifilm Wako Pure Chemical)を加えた 2× Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)と混和、煮沸した。サンプルは Mini-

PROTEAN TGX precast gels (Bio-Rad)を用いて電気泳動し、Trans-Blot® Turbo™ Transfer packs (Bio-Rad)を用いてメンブレンを作成した。0.1% Tween 20 (Fujifilm Wako Pure Chemical)加 phosphate-buffered saline (PBS)で希釈した Tropix® I-BLOCK (Thermo Fisher Scientific)を用いて室温 30 分振とうすることでブロッキングを行った。使用した一次抗体と二次抗体は 0.1% Tween 20 加 PBS 希釈 Tropix® I-BLOCK を用いて調整した。一次抗体は 4°C over night で反応させ、二次抗体は室温 60 分反応させた。ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)により発色させ、プロテインバンドを ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad)で検出した。

2.2.6 Serial analysis of gene expression (SAGE) and metabolome analysis

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を使用した。Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いてライブラリを作成し、Ion Proton next-generation sequencer を使用してシーケンスを行った。metabolome analysis 用に細胞を 5 % mannitol solution で洗浄し、酵素賦活化のため methanol 溶液中で細胞抽出を行った。細胞抽出物は internal standards (H3304-1002, Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan)を添加した超純水で処理した後、4°C 2,300g で 5 分間遠心分離した。上部水層を回収し、Millipore 5-kDa cutoff filter を用いて 4°C 9,100g で 120 分間遠心することで限外濾過を行い、タンパク成分を除去した。濃縮された濾液を電気泳動飛行時間質量分析 (CE-TOFMS) 用に純粋に再懸濁し、測定を行った。SAGE と metabolome analysis で得られた結果は Ingenuity Pathways Analysis (IPA) を用いて解析した。

2.2.7 Measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR)

BMSC を XF96 microplates (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)に播種し、24 時間インキュベーション後、培養液を 25 mM glucose 加 XF Assay Medium (Agilent Technologies)に交換した。専用カートリッジに 1 µg/mL oligomycin, 300 nM carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP), 2 µM rotenone を加えた後、XF96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies)を用いて酸素消費率 (Oxygen Consumption Rate ; OCR) を算出した。算出された OCR は細胞数によって補正した。

2.2.8 Statistical analysis

得られた結果は Student's t-test または Welch's two-factor t-tests によって分析した。複数グループ間の比較には分散分析および Tukey's multiple comparison test を使用した。

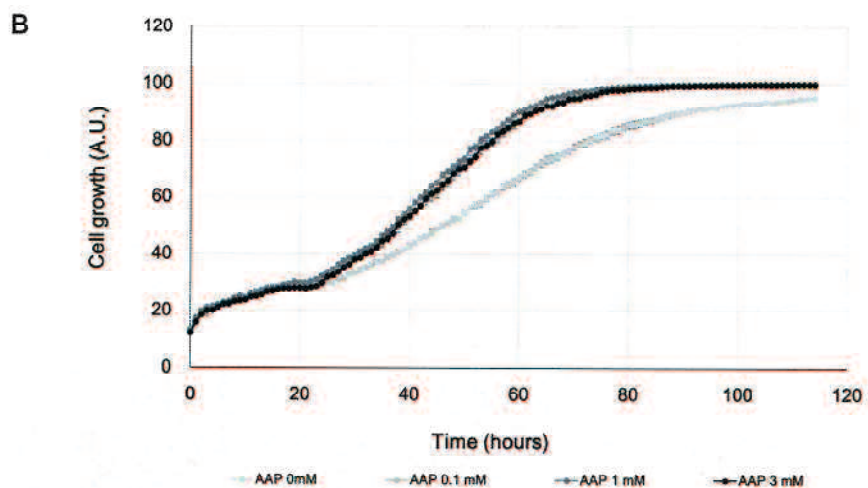
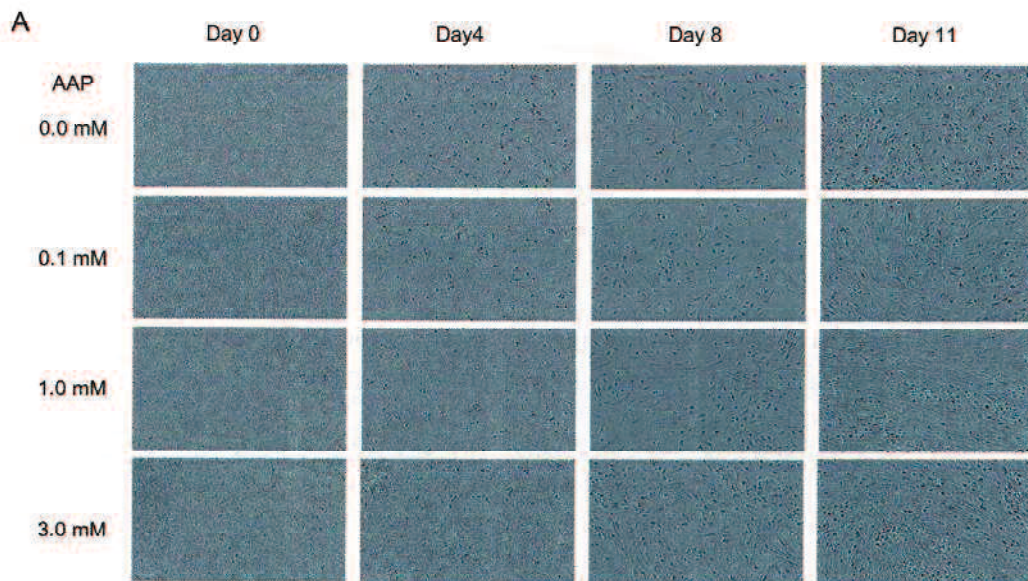
2.3 結果

2.3.1 AsA 添加培地は BMSC 分離と増殖を促進し, 脂肪細胞への分化を向上させる.

AAP 添加濃度を 0.1, 1.0, 3.0mM として AsA-medium を作製した. BMNC から BMSC を分離する際に使用する培地を AsA-medium に変更したところ, 培養 11 日目には AsA-medium で BMSC の増殖が明らかに促進することが明らかとなった(Figure 1A). AsA-medium を用いてすでに分離培養された BMSC を培養すると, BMSC 播種から 24 時間後より AsA-medium では有意に細胞増殖を促進したが, AAP の濃度による変化はみられなかった(Figure 1B). さらに AsA-medium では, 播種後 60 時間で通常培地でのコラーゲンコート培養と同等の細胞数まで増殖することが明らかとなった (Figure 2A).

免疫組織染色にて BMSC が産生したコラーゲン線維を比較すると, AsA-medium では細胞外のコラーゲン線維が増加することが明らかとなった. 一方, AAP の濃度によるコラーゲン線維の違いはなかった (Figure 2B-D).

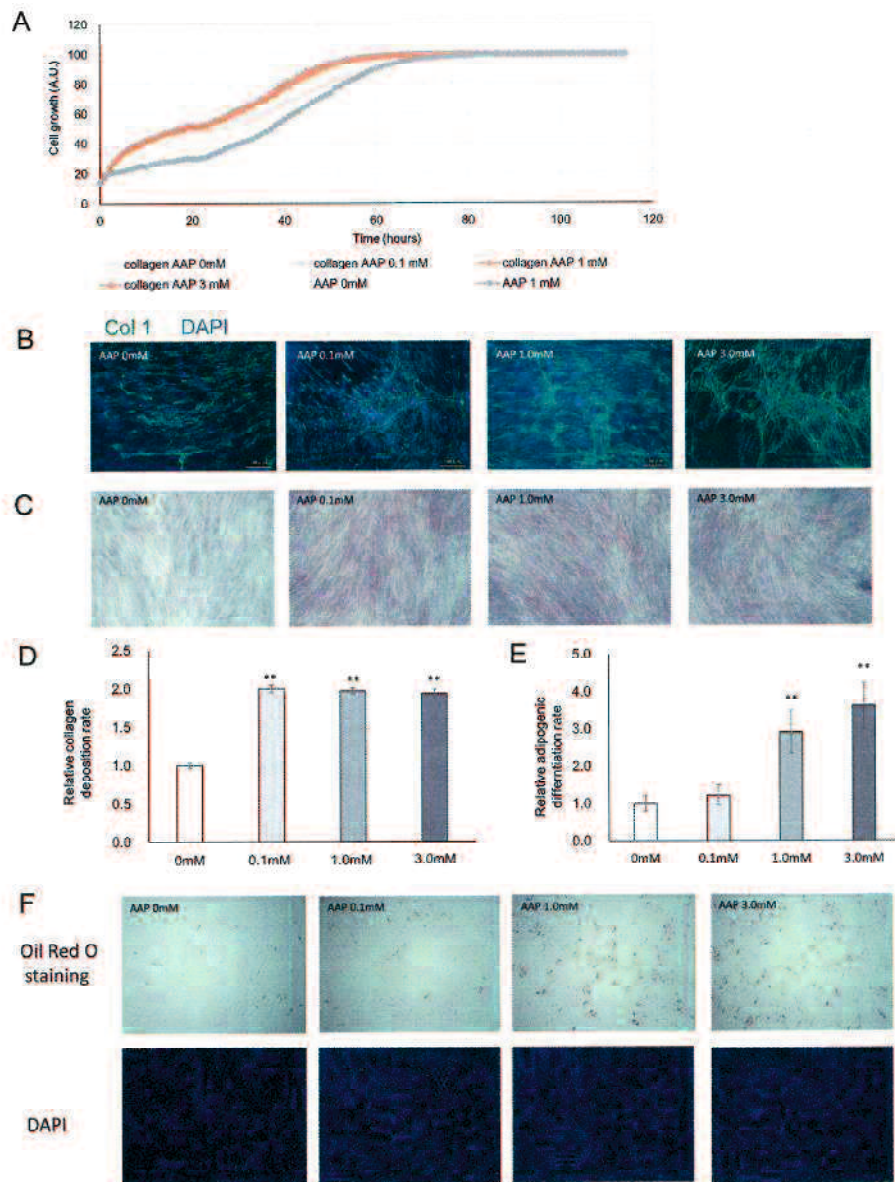
AsA-medium で培養した細胞を脂肪細胞へ分化させると, AAP の濃度依存的に Oil Red O に染色された脂肪滴を伴う細胞が増加し, AAP 添加による脂肪細胞への分化の向上が明らかとなった. (Figure 2E, F)



参考文献 21) Fujisawa K, Hara K, et al. より一部改変。

Figure 1. AsA-medium を用いた BMSC の分離・増殖評価

(A) AsA-medium を用いて骨髓液中の単核球分画より BMSC を分離培養した。濃度依存性に紡錘形の細胞の増殖が増えることが確認された。(B) すでに分離培養された BMSC を AsA-medium で培養し, IncuCyte®にて経時的に細胞面積を計測した。AsA-medium では, 細胞数の増加を示した。



参考文献 21) Fujisawa K, Hara K, et al. より一部改変。

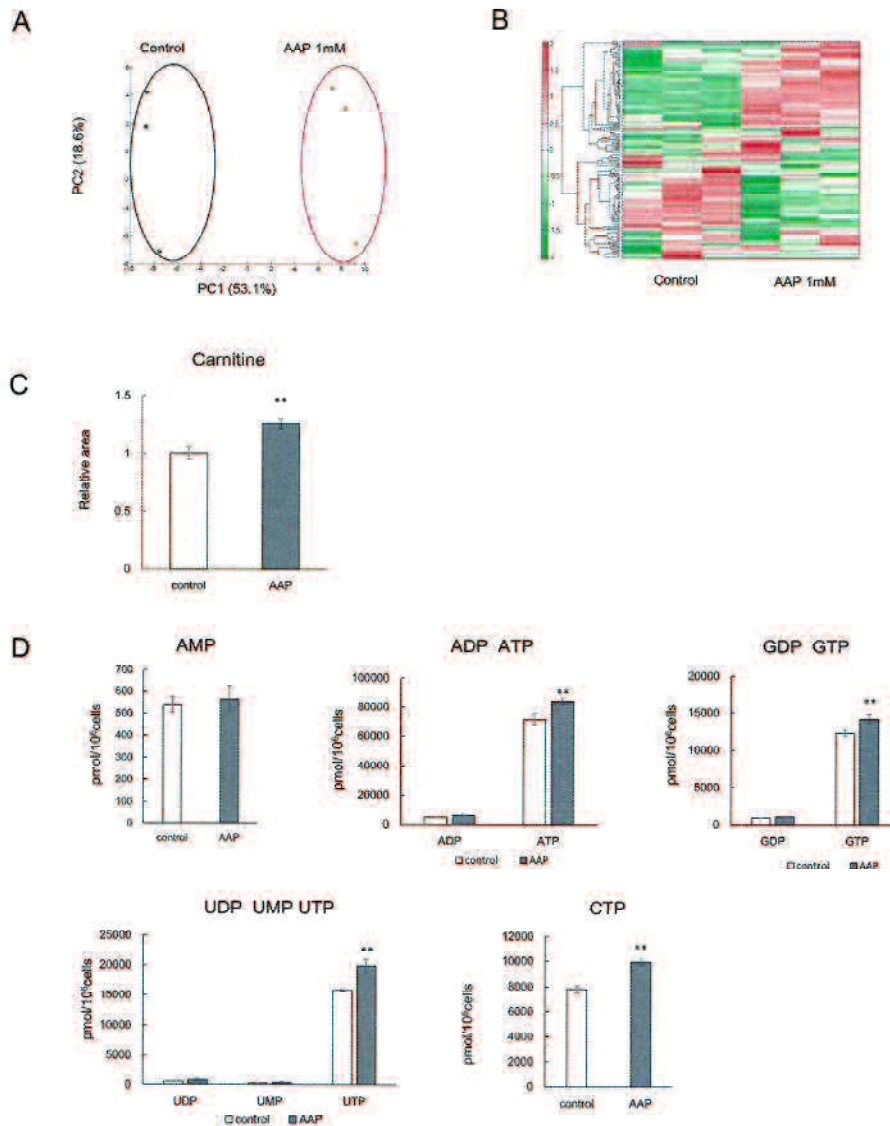
Figure 2. AsA-medium の BMSC に対するコラーゲン産生と脂肪分化作用

(A-D) コラーゲンコート培養皿と非コーティング培養皿を使用し AsA-medium による細胞増殖を比較した。IncuCyte®による経時的な観察 (A) により BMSC の増殖評価を行い、コラーゲンの産生について免疫組織化学染色 (B) と Sirius Red/Fast Green staining (C-D) にて評価した。Coll antibody: 緑色, DAPI: 青色。

(E-F) BMSC の脂肪分化に対する影響を Oil Red O 染色にて評価した。DAPI 染色により細胞数を測定し補正することで脂肪分化した細胞の割合を比較した。n=6. **p < 0.01

2.3.2 AsA-medium ではクエン酸回路を促進する.

AsA-medium (AAP: 1.0mM) を使用して BMSC を培養した時に引き起こされる代謝変化について検証した. AsA-medium 培養 24 時間後に細胞を回収し, 質量分析装置にて評価した. 主成分分析を行うと, AsA-medium と基本培地で明確に区別され (Figure 3A), クラスタリング分析により AAP 添加を行うことで代謝産物が逆転することが明らかとなった (Figure 3B). 詳細に解析すると, ミトコンドリアの脂質代謝に関与するカルニチン (Figure 3C) やヌクレオチド代謝に関連する ATP, GTP, UTP, CTP の増加を認め (Figure 3D), クエン酸回路を構成する成分が一様に増加した (Figure 3E).



E

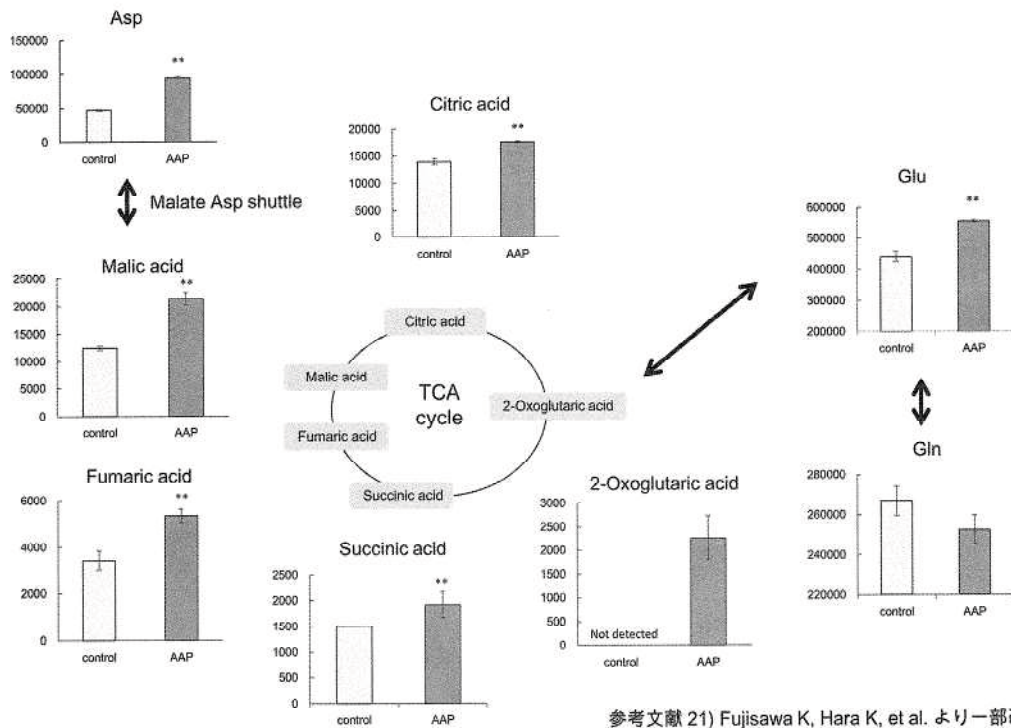


Figure 3. AsA-medium で培養した BMSC の代謝解析

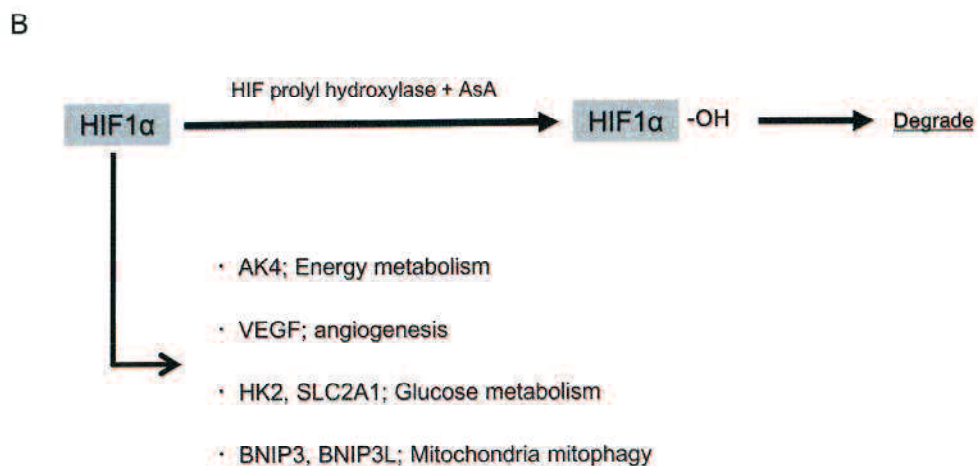
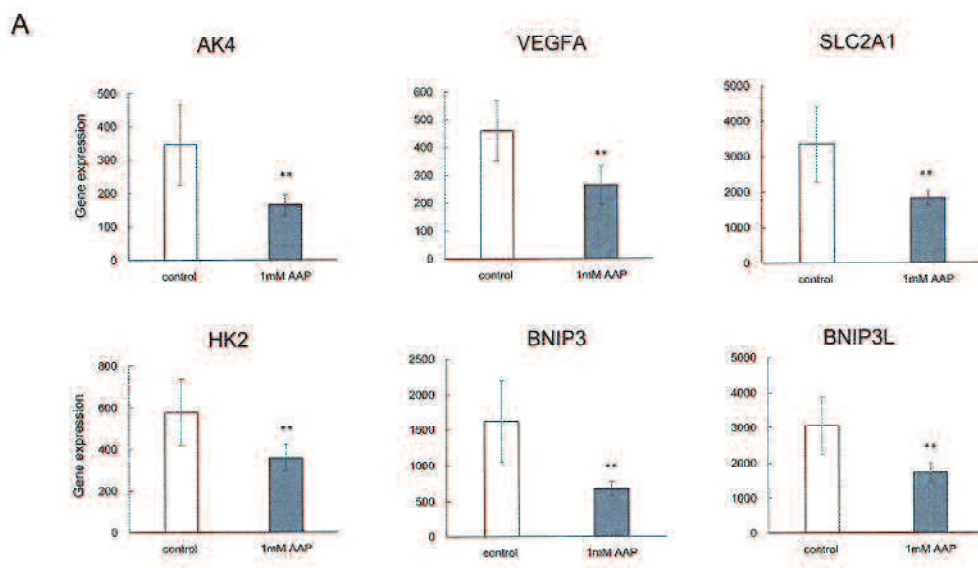
AsA-medium で培養した BMSC の代謝解析を行い、主成分分析 (A) とヒートマップ (B) により AsA-medium で培養した BMSC が通常培養に違いがあると示された。カルニチン発現の変化 (C) やヌクレオチド代謝 (D)、クエン酸回路を構成する成分 (E) の違いを比較した。** $p < 0.01$.

2.3.3 AsA-medium で培養した BMSC では HIF1 α 分解を促進する.

SAGE により網羅的な遺伝子変動を確認すると, AsA 添加培地で培養した BMSC では細胞増殖阻害と細胞死に関連する遺伝子群の発現低下が顕著であり, 低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor; HIF) である HIF1 α の下流にある複数の遺伝子が発現低下していた. 下流遺伝子の変動を詳細にみると, ミトコンドリアのエネルギー代謝に関与する AK4 や血管新生に関与する VEGFA や HK2, ミトコンドリア外膜タンパク質である BNIP3 の発現減少を認めた (Figure 4 A, B).

次に, HIF1 の活性化物質であり低酸素状態を模倣的に引き起こすデフェロキサミン (deferroxamine; DFO) を添加し, AsA の HIF1 に対する影響を検証した. HIF1 α の蛋白発現は添加した DFO の濃度依存的に増加したが, AsA 添加によって HIF1 α は低下した. ミトコンドリア膜タンパク質であるシクロフィリン D, シトクロム C, および E2 は, DFO の添加により発現低下を認めたが, AAP の添加により増加した. HIF1 α によって誘導される蛋白である AK4, HK2, BNIP3 は DFO の濃度依存的に増加していくが, AsA 添加によって発現は低下した (Figure 5A).

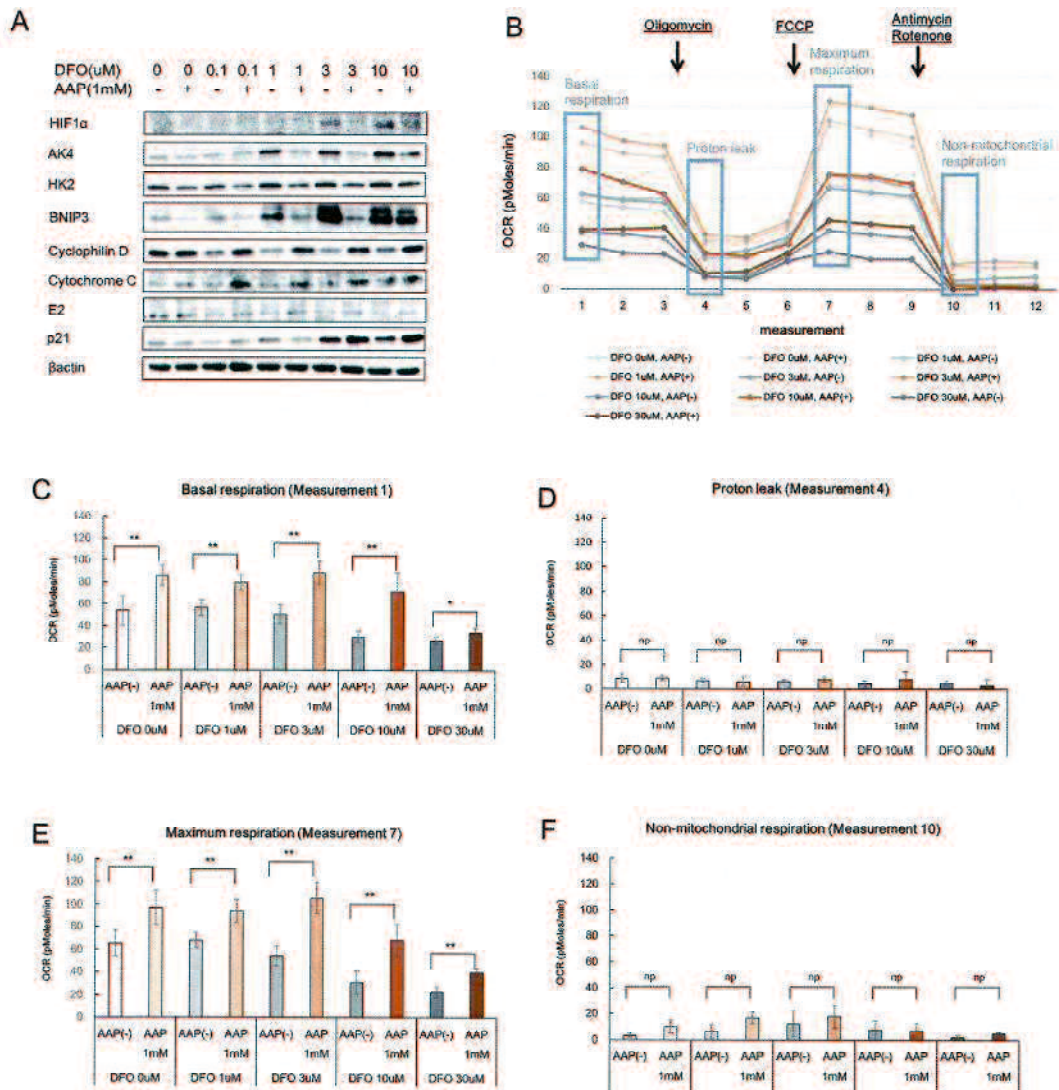
DFO によって細胞の酸素消費量は低下するため, DFO と AsA を添加することで, AsA が BMSC の酸素消費量を亢進するか検証した. すると酸素消費量は DFO 添加により濃度依存的に低下したが, AsA を補充によって Basal respiration (Figure 5B, C) と Maximum respiration (Figure 5B, E) において, DFO によって誘導される酸素消費の低下が抑制された. また, Proton leak (Figure 5B, D) や Non-mitochondrial respiration (Figure 5B, F) に有意な変化はみられなかった. 以上より, AsA は BMSC 中の HIF1 α の分解を促進し, ミトコンドリアを活性化することが示唆された.



参考文献 21) Fujisawa K, Hara K, et al. より一部改変。

Figure 4. AsA-medium による HIF1 α 下流遺伝子の変動

(A-B) SAGE 解析の結果より, AsA-medium 培養では HIF1 α の下流に位置する遺伝子の発現低下を認めた. ** $p < 0.01$.



参考文献 21) Fujisawa K, Hara K, et al. より一部改変.

Figure 5. AsA-medium 培養による低酸素誘導蛋白の評価と酸素消費量

(A) Western blotting における低酸素誘導関連蛋白の評価.

(B-F) Flux analyzer を用いた酸素消費量 (OCR) の比較. Basal respiration (C), Proton leakage (D), Maximum respiration (E), Non-mitochondrial respiration (F) における酸素消費量の比較を行った. ** $p < 0.01$.

2.4 考察

本研究ではより効果的な BMSC の創出を目標に、現在の標準的な培養環境で不足していると考えられるアスコルビン酸 (AsA) に着目した。AsA はこれまでに多くの基礎研究がなされており、様々な細胞の増殖や分化に対する効果が報告されているが、BMSC を対象とした研究は数少ない。接着細胞に広く使用されている DMEM では、37°C インキュベートにより AsA は急速に酸化され、1 日後には半分、3 日後には存在が確認できなくなることが報告されている²²⁾。そこで水溶液中で安定性を示す L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (AAP) を用い、BMSC の細胞増殖分化や遺伝子発現および代謝変化に対する AsA の影響を評価した。AAP 添加濃度に関して、0~0.5mM の添加濃度での検討にて細胞増殖や分化に影響を及ぼす²³⁾とあるが、高濃度の AsA によって酸化と ATP 飢餓を促進する²⁴⁾との報告がされたため、本研究における AAP 添加濃度は 0~3.0mM とし検証した。BMSC は骨髓液から赤血球を取り除いた骨髓単核球分画をプラスチック製の培養皿にて培養することで接着性の細胞を分離するが、AsA-medium の使用により接着性細胞が短期間に多く観察され、さらにその後の BMSC の細胞増殖が増加し、AsA の添加により BMSC の分離増殖時間が短縮される可能性が示された (Figure 1)。AsA はコラーゲン分子の架橋結合に必要なプロリンのヒドロキシ化の補因子であり²⁵⁾、AsA-medium により BMSC のコラーゲン産生が増加していることから (Figure 2 B-D)、細胞増殖の亢進がコラーゲンに起因するものか確認したところ、コラーゲンコート培養皿で播種後 24 時間は細胞増殖が亢進したが、その後の細胞増殖は基本培地と変わらない増殖スピードであった。このことから、コラーゲンは BMSC の培養皿への接着に対して効果があるが、細胞増殖自体には影響しておらず、コラーゲン以外の因子が増殖に影響していると考えられる。添加濃度の違いによる細胞増殖の差はみられなかったが、BMSC の脂肪細胞への分化は濃度依存的に増加していた。AsA は iPS 細胞の心筋への分化を促進する作用があり²⁶⁾、その機序に NOX および eNOS の誘導がある²⁷⁾と考えられている。本検討で行った SAGE 解析では BMSC における NOX および eNOS の発現増加は確認されず、AsA 添加による BMSC 分化の促進は裏付けされなかった。

AsA による細胞への影響メカニズムを明らかにするために、メタボローム解析と SAGE 解析により代謝産物と遺伝子を網羅的に解析したところ、AsA-medium を用いた BMSC ではミトコンドリアの活性化が生じており、低酸素誘導因子である HIF1 α の下流蛋白は発現低下を示していた (Figure 3, 4)。HIF1 α は造血幹細胞において細胞周期と幹細胞性を調節する因子であり²⁸⁻²⁹⁾、細胞内 AsA は HIF-ヒドロキシラーゼ活性を増加させることにより、HIF1 転写反応を抑制する³⁰⁻³¹⁾。低酸素状態を模倣した環境において BMSC を培養したところ、AsA-medium の使用により HIF1 α 発現の低下と酸素消費量の増加がみられたことから (Figure 5)、AsA は低酸素環境に拮抗して作用することが考えられる。また AsA はカルニチン合成の補酵素として働くが、本検討においてもカルニチンの発現上昇を認めており (Figure 3C)、HIF1 α 制御だけでなくカルニチン合

成の促進と合わせてミトコンドリア活性代謝を促進していると考える。

以上の検討より AsA が不足した BMSC 培養は HIF1 α の上昇によるミトコンドリア活性の抑制を認め、意図せず低酸素状態に近い環境を呈していた可能性がある。合わせて collagen 産生抑制などを背景とした細胞増殖や分化の抑制を引き起こしており、BMSC の増殖培養を効率よく行うためには AsA の補充が推奨される。しかし、マウス肝線維化モデルにおいて低酸素環境で培養した BMSC を使用することで Prostaglandin E2 と miR-210 の産生に伴う肝臓再生効果の向上が示唆されており³²⁾、AsA の添加は目的に応じてその効果への影響を検証しなければならない。

第3章

hsa-miR-5682 を用いた抗線維化核酸医薬品の開発

3.1 研究の背景および目的

山口大学大学院医学系研究科消化器内科学では、自己骨髄間葉系幹細胞 (autologous bone marrow derived mesenchymal stem cell ; autologous BMSC) を用いた肝臓再生療法を開発し、安全性と有効性の評価を目的とする臨床研究を実施してきた (臨床試験 ID ; UMIN000035528) ¹²⁻¹⁴⁾. BMSC は液性因子や細胞接着を介して、肝星細胞活性化の抑制やマクロファージによる線維溶解、肝臓再生の促進など多面的に作用する ³³⁻³⁴⁾. 肝臓再生は線維化の改善に伴う微小環境の変化により促進されるため、肝線維化を抑制する補助療法の開発は肝臓再生療法の治療効果を高める手段となり得る。

microRNA(miRNA)は21~25塩基の non-coding RNA であり、多数の標的 mRNA に対して不完全な相同性をもって結合し、標的 mRNA の不安定化や翻訳抑制を行うことで蛋白産生を抑制する。miRNA は創薬への応用が期待されているが、標的となる mRNA が多岐に渡るため作用機序の特定が難しく、これまでに臨床実用化に至ったものはない。そこで、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) の構成成分である線維性コラーゲン (collagen I, III, V) や弾性線維 (elastin) を標的遺伝子に持つ hsa-miR-5682 に着目した。hsa-miR-5682 は、肝線維化の直接的な原因である ECM 蛋白の網羅的な産生阻害により作用するため、作用機序の特定が容易である。一方、Proof of Concept (POC) を得るためには動物モデルでの評価が必要だが、hsa-miR-5682 は他の動物種でオルソログが発見されておらず、ヒトと同様に作用するかは不明である。

本研究では、肝臓再生療法の補助療法として、肝線維化の抑制に有効な miRNA を用いた抗線維化核酸医薬品の開発を目標に、ヒト肝星細胞 (human hepatic stellate cell: HHStC) に hsa-miR-5682 を導入し、細胞増殖に与える影響や線維化関連蛋白発現の変動について検討した。さらに、マウス肝星細胞株 (murine hepatic stellate cell line; mHSC) BMSC に hsa-miR-5682 を導入し、網羅的遺伝子解析によりマウスに対してオルソログとして作用するかを確認した。また、BMSC による線維化抑制機序に hsa-miR-5682 が関与するか検証した。

3.2 方法

3.2.1 Cell culture and miRNA transfection

ヒト肝星細胞(Human Hepatic Stellate Cell : HHSteC) (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA)とマウス肝星細胞株 (TLR4^{-/-} mouse hepatic stellate cells expressing WT TLR4 : mHSC) (Kerafast, Boston, MA, USA), 新鮮ヒト骨髄液単核球分画 (Lonza Japan, Tokyo, Japan)より分離培養した BMSC は 10% FBS 加 DMEM を用いて培養した. 遺伝子導入法は Lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Fisher Scientific)を使用し, 30 picomole の mirVana miRNA mimic hsa-miR-5682 (miR-5682) (Thermo Fisher Scientific)もしくは mirVanaTM miRNA mimic Negative Control #1 (NC-miR) (Thermo Fisher Scientific)を fibronectin-coated 24-well plate (CORNING, Corning, NY, USA)へ添加し 20 分静置した後, HHSteC (2.0×10^4 cells/well)と mHSC (1.5×10^4 cells/well)を播種した. 48 時間のインキュベーション後, 5 picomole の miR-5682 または NC-miR を再導入し, 24 時間静置した後に細胞を回収した.

3.2.2 Proliferation assay

HHSteC と mHSC を fibronectin-coated 24-well plate へ播種し, 遺伝子導入を行った. 導入より 72 時間後に培養上清を除去し, CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, Madison, WI, USA)を添加して, 37°C で 1 時間インキュベートした後, 450nm の吸光度を測定した.

3.2.3 RNA extraction and mRNA and miRNA expression analysis.

Total RNA および mi RNA は RNeasy Mini kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) または RNeasy MinElute Cleanup kit (QIAGEN)を用い, 使用書に従って抽出した. Total RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Tokyo, Japan)を用いて Complementary DNA(cDNA)へ逆転写した. Real-time PCR では Fast SYBR[™] Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を使用した. 本検討で用いた primer 配列は Table 3 に示す. miRNA は miRCURY LNA[™] Universal RT microRNA PCR Universal cDNA Synthesis kit (QIAGEN)を用いて cDNA へ逆転写した. Real-time PCR では miRCURY LNA miRNA PCR Assays (QIAGEN) と miRCURY LNA[™] SYBR Green PCR kit (QIAGEN)を用い, 使用した primer は hsa-miR-5682 (QIAGEN, YP02102240)および内部標準である U6 (QIAGEN, YP00203907)を検出した. mRNA および micro RNA 発現の検出には Step One Plus real-time PCR system (Life Technologies Corp., Grand Island, NY, USA) を使用した.

Table3. Primer リスト

Genes	Sequences	
	5'-Forward-3'	5'-Reverse-3'
Human		
GAPDH	GTCTTCTCCACCATGGAGAAGGCT	CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA
COL1A1	CCCGGGTTTCAGAGACAACCTTC	TCCACATGCTTTATTCCAGCAAT
COL1A2	CTGGAGAGGCTGGTACTGCT	AGCACCAAGAAGACCCTGAG
COL3A1	CTGGACCCAGGGTCTTC	CATCTGATCCAGGGTTTCCA
COL5A1	CAATGGCATCGTGTTTGG	GTCACAGTCAGGGCTGTAGTGCTC
COL5A2	GGCAGAAATGGAAATCCTGGTG	TTAGGGCCTTCAAGACCTTTGTG
ELN	AGCAAGACCTGGCTTCGGATT	CCAACGTTGATGAGGTCGTGA
Mouse		
Gapdh	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
Col1a1	CATGTTTAGCTTTGTGGACCT	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
Col1a2	CTTCTGCAGGGTTCCAACGA	CAGCACCACCAATGTCCAGAG
Col3a1	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
Col5a1	GGAGCAGCCAGGATTGATGA	TCTCCAGGCCAGGCATTTTC
Col5a2	GCTTCTGTCATGTCATCTTCA	CTTTGCAGGCAATGTTACAGATAGG

3.2.4 Indirect co-culture of HHSteC and BMSC, and Procollagen-III-Peptide assays

HHSteC を 2.0×10^4 cells/well で 24-well plate に播種し, HHSteC が接着した後に BMSC 2.0×10^4 cells/well を Cell culture insert Transparent PET Membrane $0.4 \mu\text{m}$ pore size (CORNING) 上に播種した. 72 時間インキュベート後, BMSC と transwell を取り除き培養上清を FBS 不含 DMEM へ置換する. 8 時間静置後, 培養上清を回収し 300g , 5 分の遠心分離を行った. 分離後の培養上清を SRL (Tokyo, Japan) に提出し, Procollagen-III-Peptide 測定を依頼した.

3.2.5 Western Blot Analysis

Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いてタンパク溶解サンプルを作成し, 10% 2-mercaptoethanol を加えた $2 \times$ Laemmli sample buffer と混和, 煮沸した. サンプルは Mini-PROTEAN TGX precast gels を用いて電気泳動し, Trans-Blot® Turbo™ Transfer packs を用いてメンブレンを作成した. 0.1% Tween 20 加 PBS で希釈した Tropix® I-BLOCK を用いて室温 30 分振とうによりブロッキングを行った. 本検討で使用した一次抗体と二次抗体は 0.1% Tween 20 加 PBS 希釈 Tropix® I-BLOCK

を用いて調整した。一次抗体を 4°C over night で反応させ、洗浄後に二次抗体を室温 60 分反応させた。プロテインバンドの検出には ECL Plus Western Blotting Substrate により発色させ、ChemiDoc MP Imaging System で発色量を検出した。全てのプロテインバンドに対し、 β -actin による補正を行った。

3.2.6 Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) analysis

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用した。Ion Ampliseq Transcriptome Human or Mouse Gene Expression Kit (Life Technologies) を用いてライブラリを作成し、Ion S5 next-generation sequencer によってシーケンスを行った。得られた結果は KEGG pathway enrichment analysis (Gene Codis)³⁵ を用いて解析した。

3.2.7 Statistical analysis

得られた結果は Student's t-test または paired t-test により統計解析した。 $p < 0.05$ を有意差ありとして採用した。データは平均値 \pm 標準偏差として示した。

3.3 結果

3.3.1 hsa-miR-5682 は HHSteC の細胞増殖と ECM 蛋白産生を抑制する.

リポフェクション法による HHSteC への遺伝子導入を確認するため, hsa-miR-5682 発現を real-time PCR 法で比較し, hsa-miR-5682 導入 HHSteC (miR5682 HHSteC) で有意な発現増加を確認した (Figure 6A). miR5682 HHSteC は, 通常培養 HHSteC (Non-treat HHSteC) や NC-miR 導入 HHSteC (NC-miR HHSteC) と比較し, 細胞形態に変化はなかった (Figure 7A). 一方, MTS assay において, miR5682 HHSteC では Non-treat HHSteC, NC-miR HHSteC と比較し, 吸光度が有意に低下し, 細胞増殖の抑制を認めた (Figure 7B). miR-5682 HHSteC における *COL1A1*, *COL1A2*, *COL3A1*, *COL5A1*, *COL5A2*, *ELN* 発現は, Non-treat HHSteC, NC-miR HHSteC と比較し, いずれの mRNA においても有意な発現低下を認めた (Figure 7C). さらに蛋白レベルでは, miR-5682 HHSteC において collagen I, collagen III, collagen V, elastin の発現は有意に低下した (Figure 7D). 以上より, hsa-miR-5682 は HHSteC の増殖と線維産生を抑制した.

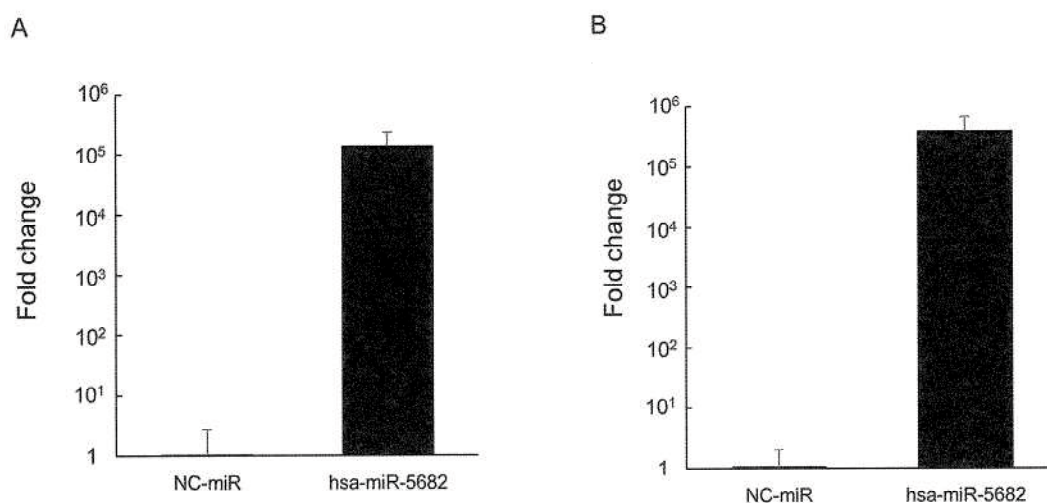


Figure 6. Lipofection 法による hsa-miR-5682 の導入

HHSteC (A) または mHSC (B) に対して lipofection 法により hsa-miR-5682 を導入し, real-time PCR 法で評価した.

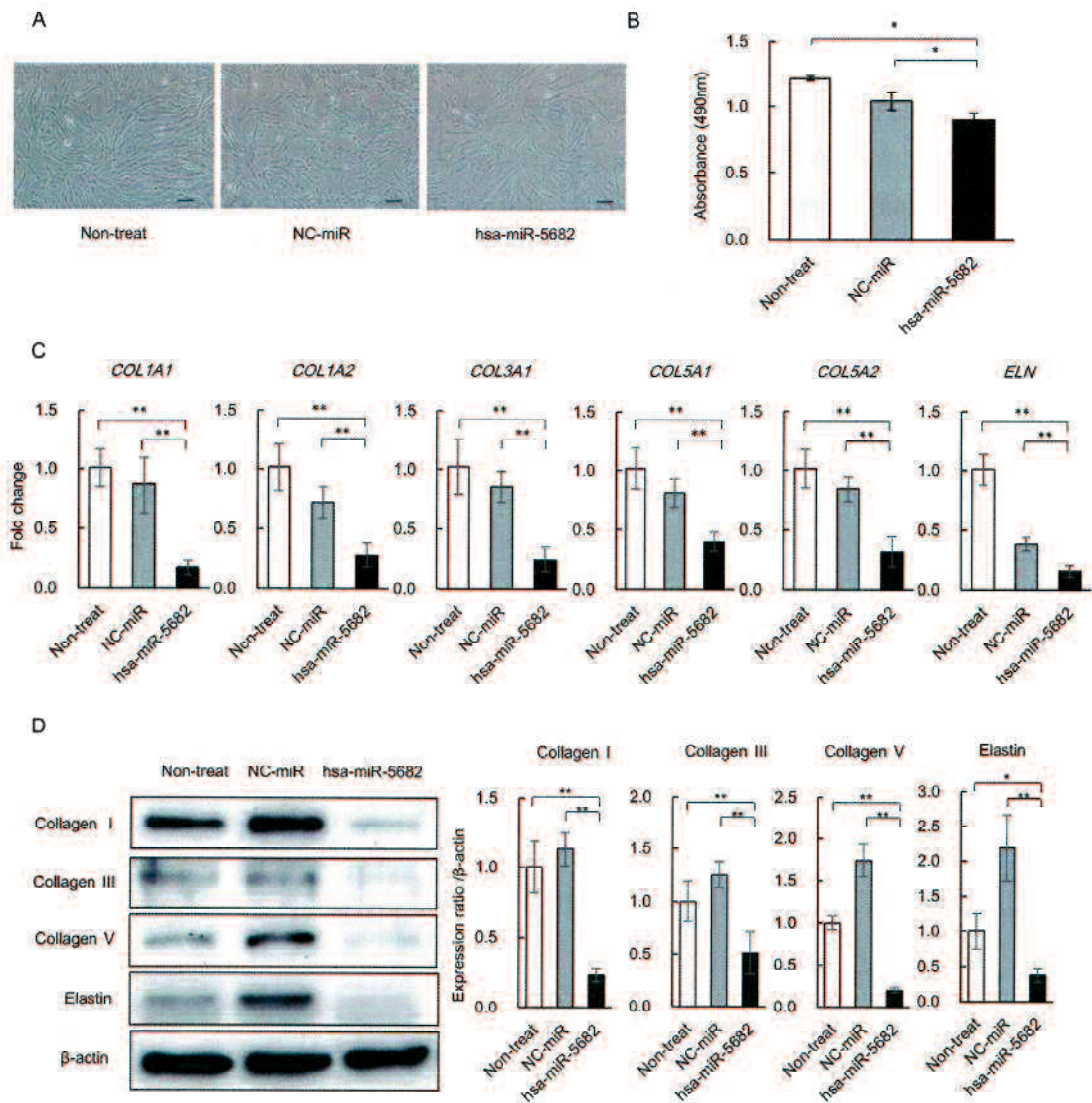


Figure 7. hsa-miR-5682 の HHStEC に対する作用

negative control miRNA もしくは hsa-miR-5682 を HHStEC に導入し、作用を比較した。

(A) miRNA 導入 3 日後に位相差顕微鏡下に HHStEC を撮影した。Scale bars, 100 μ m。
 (B) miRNA 導入 5 日後に MTS assay を行い、細胞増殖を評価した。(C-D) 肝線維化に関連する collagen と elastin の遺伝子発現及び蛋白発現を real-time PCR (C) と Western blotting (D) で比較した。n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01.

3.3.2 hsa-miR-5682 は BMSC とは異なる機序で HHSteC に作用し、同等の collagen III 産生抑制効果を有する.

培養上清中の P-III-P 濃度を評価すると、Non-treat HHSteC, NC-miR HHSteC と比較し、miR-5682 HHSteC では P-III-P 濃度が有意に低下しており、BMSC との非接着共培養後の HHSteC と同等であった (Figure 8A). BMSC との非接着共培養により HHSteC 中の hsa-miR-5682 発現は変化しなかった (Figure 8B). また、HHSteC と BMSC における hsa-miR-5682 発現を比較すると、BMSC で発現が低かった (Figure 8C). 以上より、HHSteC に対する BMSC 由来の細胞外小胞を介した hsa-miR-5682 の受け渡しやサイトカインを介した hsa-miR-5682 の発現促進は否定的であった.

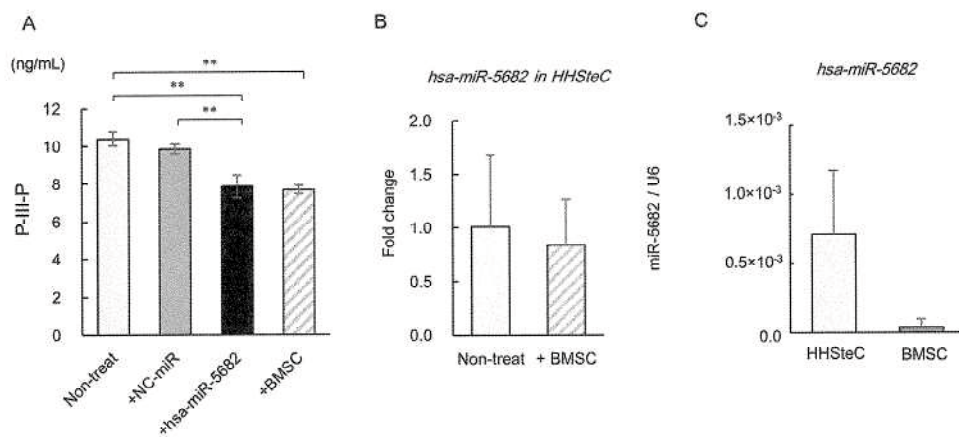


Figure 8. hsa-miR-5682 の HHSteC に対する collagen III 産生抑制効果

(A) HHSteC に対して BMSC との非接着共培養, hsa-miR-5682 または NC-miR の導入を行い、3 日後に上清を FBS 不含 DMEM に置換した。8 時間後に回収した培養上清を用いて procollagen-III-peptide (P-III-P) assay を行った。n=4. **p < 0.01.

(B) BMSC との共培養の有無による HHSteC の hsa-miR-5682 発現の変化について real-time PCR で評価した。n=4. (C) HHSteC と BMSC における hsa-miR-5682 発現を real-time PCR で比較した。n=4.

3.3.3 hsa-miR-5682 は mHSC の細胞増殖と ECM 蛋白産生を抑制する.

hsa-miR-5682 は他の動物種でオルソログが発見されていない. そこで *in vivo* での検討に用いる動物種としてマウスが妥当であるかを検討するため, mHSC に hsa-miR-5682 を導入し, その作用について検討した.

mHSC に hsa-miR-5682 または NC-miR を導入し, hsa-miR-5682 発現について *real-time* PCR 法で比較すると, 前者で hsa-miR-5682 の有意な発現増加を確認した (Figure 6B). hsa-miR-5682 導入 mHSC (miR-5682 mHSC) と NC-miR 導入 mHSC (NC-miR mHSC) の比較では, 細胞形態に変化は認めず, miR-5682 mHSC で増殖抑制を認めた (Figure 9A, B). miR-5682 mHSC では *Coll1a1*, *Coll1a2*, *Col3a1*, *Col5a1*, *Col5a2* 発現の有意な低下を認めたが, *Eln* は検出感度以下であった. また, 蛋白発現は miR-5682 mHSC において collagen I, collagen III の発現は有意に低下し, collagen V は発現低下傾向を認めた. (Figure 3C, 3D). 以上より, hsa-miR-5682 は mHSC の増殖と線維産生を抑制した.

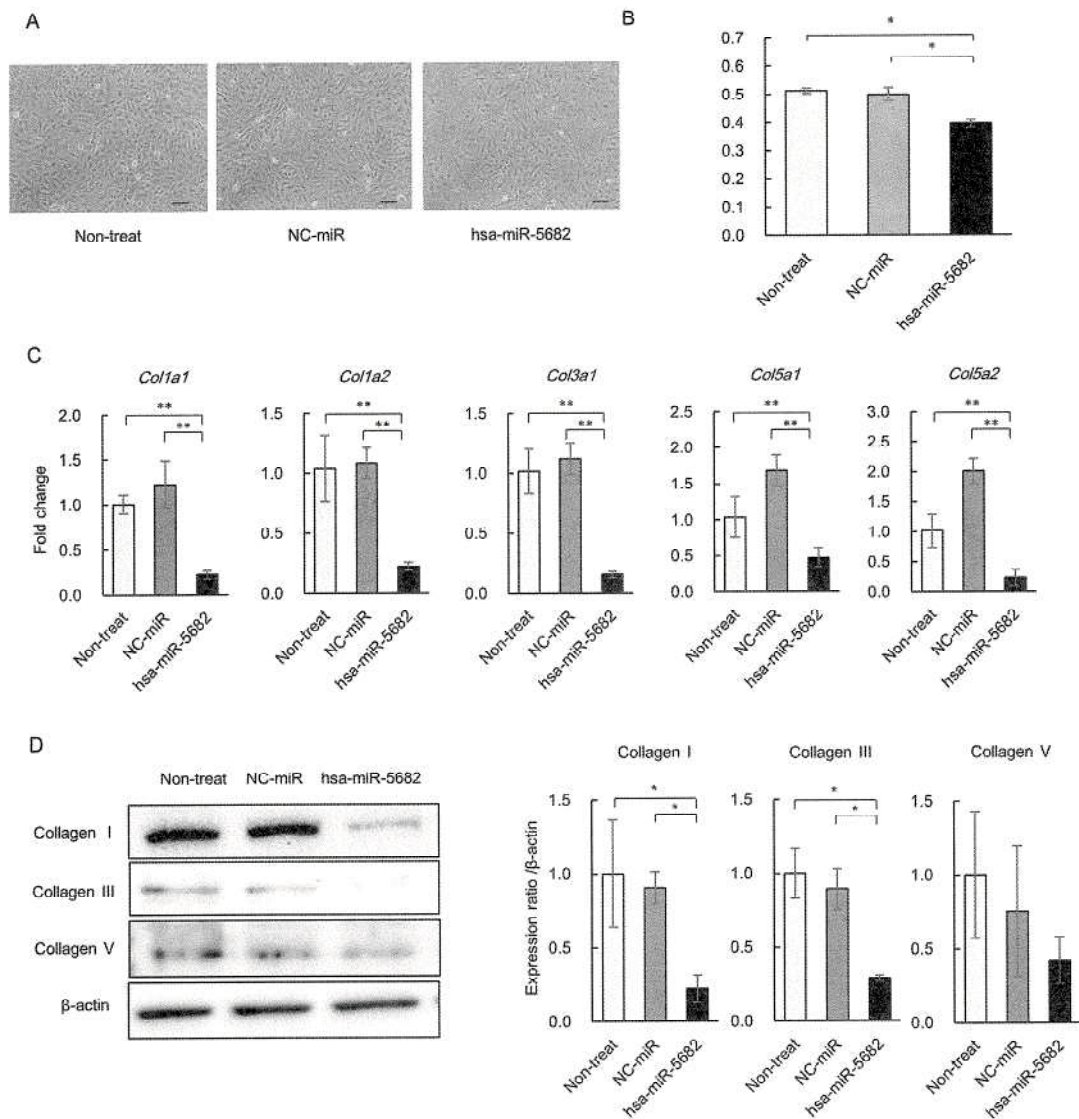


Figure 9. hsa-miR-5682 の mHSC に対する作用

mHSC に negative control miRNA もしくは hsa-miR-5682 を導入し、作用を比較した。

(A) miRNA 導入 3 日後に位相差顕微鏡下に HHStEC を撮影した。Scale bars, 100 μ m.

(B) miRNA 導入 5 日後に MTS assay を行い、細胞増殖を評価した。(C-D) 肝線維化に関連する collagen と elastin の遺伝子発現及び蛋白発現を real-time PCR (C) と Western blotting (D) で比較した。n = 3. *p < 0.05, **p < 0.01.

3.3.4 hsa-miR-5682 は HHSteC と mHSC の ECM proteins と HSP47 を網羅的に抑制する.

miR-5682 HHSteC と miR-5682 mHSC の遺伝子発現について SAGE 解析を行った. NC-miR HHSteC と比較して miR-5682 HHSteC で 2 fold 以上の有意な発現低下を認めた遺伝子は 56 遺伝子であり, 線維化促進に関連するものとして, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A2*, *SPARC*, *FSTL1*, *ADAMTS9*, *KCNN4*, 線維化抑制に関連するものとして *clqtnf6* が含まれた. 一方, 2 fold 以上の有意な発現増加を認めた遺伝子は 36 遺伝子であり, 線維化促進に関連するものとして *PRRX1*, *TNFRSF10C*, *SEMA7A*, *HAS2*, *HDAC9*, 線維化抑制に関連するものとして *TP53INP1*, *RRAD* が含まれた.

miR-5682 HHSteC と miR-5682 mHSC において 1.5 fold 以上の有意な発現低下を認めた遺伝子について KEGG pathway enrichment analysis を行うと "Amoebiasis", "ECM-receptor interaction", "Focal adhesion" など 6 pathways が共通していた (Figure 10A, B). miR-5682 HHSteC と miR-5682 mHSC に共通して 1.5 fold 以上の発現低下を認めた遺伝子は 21 遺伝子であり, 線維化関連遺伝子として *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL5A2*, *SERPINH1*, *SPARC*, *FSTL1*, *KCNN* が含まれた (Table 4). さらに, Heat shock protein 47 (HSP47) としても知られる *SERPINH1* は, 蛋白レベルで有意に発現低下した (Figure 10C). 一方, 1.5 fold 以上の有意な発現増加を認めた遺伝子について KEGG pathway enrichment analysis を行うと, miR-5682 mHSC では有意に変化する pathway は抽出されず, miR-5682 HHSteC との共通性は認められなかった.

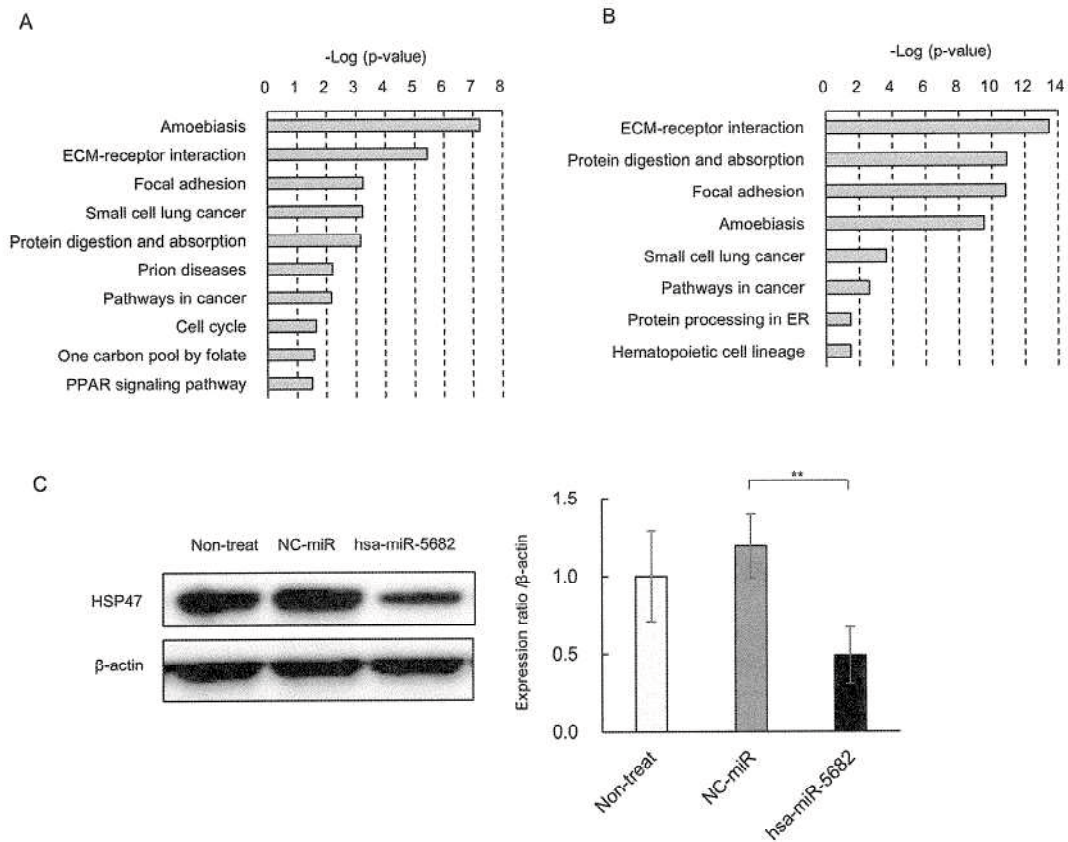


Figure 10. hsa-miR-5682 導入により HHStEC と mHSC で共通して発現低下した Pathway.

(A-B) hsa-miR-5682 を導入した HHStEC (A) 及び mHSC (B) の遺伝子発現について SAGE により網羅的解析を行った. NC-miR 導入細胞と比較して 1.5 fold 以下に有意に低下した遺伝子を用いて KEGG 解析を行い, 有意に変化する pathway を同定した.

(C) hsa-miR-5682 導入 HHStEC における HSP47 蛋白の発現を Western blotting で評価した. n = 3. **p < 0.01.

Table 4. miR-5682 HHStcC と miR-5682 mHSC に共通して発現低下を認めた遺伝子

Gene	Symbol	HHStcC			mHSC		
		miR5682/NC Fc	log2 Fc	p value	miR5682/NC Fc	log2 Fc	p value
Collagen type III alpha 1	COL3A1	0.35	-1.50	0.00	0.24	-2.08	0.00
Potassium intermediate small conductance calcium-activated channel subfamily N member 4	KCNN4	0.37	-1.44	0.01	0.32	-1.66	0.01
Secreted protein acidic cysteine-rich osteonectin	SPARC	0.38	-1.39	0.00	0.19	-2.43	0.00
CD9 molecule	CD9	0.42	-1.25	0.00	0.56	-0.85	0.00
Peptidylprolyl isomerase C cyclophilin C	PPIC	0.42	-1.24	0.00	0.55	-0.86	0.00
Collagen type I alpha 1	COL1A1	0.44	-1.18	0.00	0.41	-1.27	0.00
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	ENTPD7	0.48	-1.07	0.00	0.58	-0.79	0.00
Follistatin-like 1	FSTL1	0.48	-1.05	0.00	0.32	-1.64	0.00
Collagen type V alpha 2	COL5A2	0.49	-1.04	0.00	0.52	-0.95	0.00
Tet methylcytosine dioxygenase 3	TET3	0.51	-0.98	0.00	0.47	-1.09	0.00
Collagen type IV alpha 1	COL4A1	0.53	-0.91	0.01	0.41	-1.29	0.00
Collagen type IV alpha 5	COL4A5	0.54	-0.90	0.00	0.40	-1.32	0.00
Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2	0.56	-0.85	0.00	0.57	-0.80	0.05
HMG-box transcription factor 1	HBP1	0.56	-0.84	0.01	0.52	-0.95	0.00
Thymine DNA glycosylase	TDG	0.57	-0.80	0.01	0.49	-1.02	0.01
PX domain containing 1	PXDC1	0.58	-0.79	0.01	0.65	-0.62	0.00
TATA-box binding protein like 1	TBPL1	0.58	-0.78	0.01	0.65	-0.63	0.00
IFI30 lysosomal thiol reductase	IFI30	0.60	-0.74	0.00	0.37	-1.45	0.00
HOXA transcript antisense RNA, myeloid-specific 1	HOTAIRM1	0.62	-0.69	0.02	0.51	-0.96	0.04
Serpin family H member 1	SERPINH1	0.62	-0.69	0.00	0.56	-0.84	0.00
Tet methylcytosine dioxygenase 2	TET2	0.65	-0.63	0.02	0.63	-0.66	0.01

3.4 考察

本研究では、*hsa-miR-5682* が HHStEC と mHSC の細胞増殖と ECM 蛋白の発現を抑制することを明らかにした (Figure 7, Figure 9). *hsa-miR-5682* に関する報告は、ヒト肺扁平上皮癌において高発現が予後良好因子であることのみであり、その機能について言及した報告はない³⁶⁾. 我々の報告は、線維化治療への応用の可能性に言及した最初の報告である。

肝硬変症では正常肝と比較して線維量が4倍以上に増加することが知られており、特に線維性コラーゲンと弾性線維が増加し、肝内の線維束が形成される³⁷⁻³⁸⁾. 肝線維化を抑制するためには、これらの線維の産生を網羅的に抑制する必要がある。そのために肝星細胞の活性化や増殖を抑制する手法が検討されてきた。肝星細胞の活性化や増殖は Transforming growth factor- β (TGF- β), Platelet-derived growth factor (PDGF), Phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Nuclear factor-kappa B シグナル伝達経路などにより複雑に制御されている。これらは全身に発現しており、多岐に渡る作用を有するため、シグナル上流の mediator の阻害により全身の臓器に悪影響を及ぼす可能性がある。そのため治療ストラテジーとして、シグナル下流の mediator を特異的に阻害することが有効であるとされている³⁹⁻⁴⁰⁾. この点において、*hsa-miR-5682* により線維化関連シグナルの最終産物である線維性コラーゲンや弾性線維の産生を抑制することは理に適っているといえる。本研究の SAGE 解析において、*miR-5682* HHStEC では *PRRX1*, *TNFRSF10C*, *SEMA7A*, *HAS2*, *HDAC9* など複数の線維化関連遺伝子の発現増加を認めたが、ECM 蛋白の発現は抑制された。これは複雑な肝星細胞の活性化制御機構に影響されずに *hsa-miR-5682* が効果を発揮したことを示しており、作用機序における利点である。

これまでに肝線維化に対して抑制効果を持つ miRNA の報告が複数ある⁴¹⁻⁴⁵⁾. miRNA は標的となる mRNA とのペアリングが不完全であることから、多くの異なる mRNA の分解促進や翻訳阻害に働く特徴がある。この miRNA の特徴を考慮すれば、複数の標的遺伝子の抑制による作用機序が想定されるが、これまでの報告では単一遺伝子の発現抑制に言及するまでに留まるものが多い⁴¹⁻⁴⁴⁾. 一方、*hsa-miR-5682* は標的遺伝子である複数の ECM 蛋白の発現抑制により作用することから、miRNA の特徴を有効に活用しているといえる。さらに SAGE 解析の結果から、線維化関連遺伝子である *KCNN4*, *SPARC*, *FSTL1*, *SERPINH1* の発現抑制も明らかとなった。*KCNN4* は $K_{Ca}3.1$ protein を encode する遺伝子であり、肝星細胞の K チャネルの抑制を介して線維化関連遺伝子の発現が低下することが報告されている⁴⁶⁾. *SPARC* は procollagen と collagen receptor との反応を阻害し、procollagen がコラーゲン線維に適切に組み込まれるよう分子シャペロンとして働く。SPARC 欠損状態では、procollagen は細胞表面に凝集して ECM に組み込まれないため、コラーゲン線維が細径化する⁴⁷⁻⁴⁸⁾. *FSTL1* は分泌型の glycoprotein であり、*FSTL1* 欠損により TGF- β 1/Smad3 シグナル伝達経路が抑制され、肝星細胞の活性化が抑制されることが報告されている⁴⁹⁾. *SERPINH1* は HSP47 としても知られ、コラーゲン特異的

分子シャペロンである。HSP47は endoplasmic reticulum (ER)内で procollagen と結合し、procollagen の local unfolding や凝集を防ぐ。HSP47 欠損状態では、コラーゲン断片が ER 内に蓄積し、結果として ER ストレスが誘導され、アポトーシスが起る。さらに procollagen の分泌が遅れ、procollagen の N-propeptides は不適切な折り畳みを形成するため処理されない⁵⁰⁾。SPARC, FSTL1, HSP47 を標的とする siRNA の線維化に対する有効性が報告されており、hsa-miR5682 はこれらの遺伝子の抑制により抗線維化作用を発揮する可能性がある^{49, 51-52)}。

これまでに我々は BMSC によって肝線維化の抑制もしくは改善することを報告してきた¹³⁻¹⁴⁾。本研究でも BMSC と HHStEC を非接着共培養することにより、培養上清中の P-III-P 濃度の低下が確認され、miR-5682 HHStEC では同程度の P-III-P 濃度の低下を認めた (Figure 8A)。また、BMSC による線維化抑制効果は細胞間相互作用によるものとの報告が多くあるが、その機序に hsa-miR-5682 が関与している可能性について検討した。しかし、BMSC の hsa-miR-5682 発現量は少なく、BMSC と非接着共培養した HHStEC の hsa-miR-5682 発現も変化を認めなかった (Figure 8B, C)。これは BMSC による肝線維化抑制機序に hsa-miR-5682 が関与しないことを示し、独立した作用機序を持つ補助療法になり得ることが示唆された。

hsa-miR-5682 は他の動物種でオルソログが発見されていないため、mHSC において hsa-miR-5682 がオルソログとして作用するかを検討した。本研究で用いた mHSC では elastin の発現が低く、hsa-miR-5682 の elastin 発現抑制効果について再現することはできなかった。しかし、SAGE 解析において、HHStEC と mHSC に共通して線維化関連遺伝子である *COL1A1*, *COL3A1*, *COL4A1*, *COL5A2*, *KCNN4*, *SPARC*, *FSTL1*, *SERPINH1* の抑制を確認した。Data base (miRDB, <http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>) による解析では、これらは hsa-miR-5682 の標的遺伝子である可能性が示唆されており、マウスモデルにおける肝線維化抑制効果の評価は可能であると考えられた。一方で、発現増加する遺伝子群について共通性は見出せず、HHStEC におけるオフターゲット効果について更なる検討が必要である。

最後に、hsa-miR-5682 は肝線維化の原因蛋白である ECM 蛋白と HSP47 を抑制することが可能であり、抗線維化核酸医薬品として有用である可能性が示唆された。しかし、本研究では肝星細胞への効果の評価に留まっており、今後、in vivo において肝臓を構成する他の細胞や他臓器への影響について検討し、アデノ随伴ウイルスや修飾リポソームなどの肝星細胞特異的な Drug delivery system の必要性について検討が必要である⁵²⁻⁵³⁾。

総括

慢性肝障害の終末像である肝硬変症は、肝機能の低下と再生不全が生じることで多彩な病態を呈する難治性疾患である。近年では抗ウイルス薬の普及により、ウイルス性肝炎を起因とする肝硬変症は減少傾向にあるが、アルコール多飲や糖尿病、肥満を背景とする患者が世界中には多く、これらを原因とする肝硬変症の増加が予測されている。さらに、黄疸や腹水、肝性脳症などの合併症を伴う非代償性肝硬変症まで進行した症例では、ウイルスなどの原因を排除できたとしても線維化の改善は乏しく、発癌リスクも高いため十分な生命予後の改善に至らない。現状、非代償性肝硬変症の唯一の根治治療は肝移植であるが、ドナー不足や手術侵襲など患者への負担が大きいため、山口大学大学院医学系研究科消化器内科学では自己骨髄間葉系幹細胞 (autologous BMSC) を用いた低侵襲肝臓再生療法を開発し、臨床研究を進めてきた。本療法では BMSC が産生する液性因子や細胞接着により、線維化が抑制あるいは改善すると想定されている。そのため、培養環境の調整により効率よく増殖した BMSC の創出や肝線維化を抑制する補助療法の開発によって、肝臓再生療法の治療効果がさらに高まると期待される。

本研究では現在標準的に行われている BMSC 分離培養において不足しているアスコルビン酸の作用をアスコルビン酸添加培地の使用により検討した。結果、アスコルビン酸により細胞接着の促進や細胞増殖性が高まることが明らかとなり、その背景には HIF1 α の分解促進によるミトコンドリア活性化が引き起こされていることが示唆された。現在行っている臨床研究において、患者骨髄液から BMSC の分離培養では、細胞播種後にいかに BMSC を培養皿に接着させることができるかが課題であり、今後効率よく BMSC 培養を行うためにはアスコルビン酸添加培地を培養初期に使用することが有用であると考えられる。

また、細胞外マトリックス蛋白を標的とする hsa-miR-5682 の線維産生抑制効果について検討した。ヒト肝星細胞 (HHStEC) に hsa-miR-5682 を導入することにより、細胞増殖の抑制と線維性コラーゲンと elastin の発現低下を認めた。hsa-miR-5682 は BMSC と同等の線維産生抑制効果を認めたが、hsa-miR-5682 は独立した作用機序により HHStEC の線維産生を抑制することが示された。hsa-miR-5682 はヒト以外でオルソログが発見されていないため、マウス由来肝星細胞株 (mHSC) に対する hsa-miR-5682 の効果を検討した。結果として、mHSC においても細胞増殖の抑制と線維性コラーゲンの発現低下を認め、hsa-miR-5682 は mHSC に対してオルソログとして作用することを確認した。さらに網羅的遺伝子解析を行うと、hsa-miR-5682 は HHStEC と mHSC に共通して線維化関連蛋白の発現抑制を認め、中でも heat shock protein 47 (HSP47) の有意な蛋白発現低下が再現された。以上より、hsa-miR-5682 は肝線維化の原因蛋白である ECM 蛋

結語

本研究の遂行により、現在標準的な骨髄間葉系幹細胞（BMSC）培養で不足しているアスコルビン酸を添加することで、細胞代謝の亢進により BMSC が効率よく培養されることが明らかとなった。しかしながら、アスコルビン酸添加培地を用いて培養した BMSC の線維産生抑制効果については検証できておらず、BMSC の機能向上に寄与しているかは明らかでない。さらに現在は様々な企業から複数種の BMSC 専用培地が開発されており、添加剤に関しては公表されておらず、中にはアスコルビン酸が使用されている可能性があると考えられる。本研究の最終的な目標である肝線維化の改善に最適な BMSC の創出に関しては、現在検証されている様々な化合物の作用を開示した上で総合的に判断していかなければならないと考えられる。

また、肝臓再生療法の補助療法の開発を目的として今回検討した hsa-miR-5682 は、ヒトおよびマウス肝星細胞における線維化関連蛋白の発現を網羅的に抑制し、線維産生抑制効果が確認された。抗線維化核酸医薬品としての有効性が期待されるが、*in vivo* における肝線維化抑制効果やオフターゲット効果の検討は未だ実施できておらず、肝星細胞に特異的な Drug delivery system の開発とともにマウス肝線維化モデルに対する hsa-miR-5682 の線維化抑制効果について検討する必要がある。

白と HSP47 の発現抑制が可能であり，抗線維化核酸医薬品としての有効性が期待される．今後は *in vivo* において肝臓を構成する他の細胞や他臓器への影響について検討や肝星細胞に特異的な Drug delivery system の必要性について検討していきたい．

謝辞

本研究の遂行および関連論文作成に際し、終始格別なるご指導とご高配を賜り、山口大学大学院医学系研究科消化器内科学講座教授 坂井田功先生に深謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なご指導とご高配を賜り、博士後期課程への進学と消化器内科学講座での経験へ導いていただいた山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域教授 野島順三先生に深甚なる敬意と感謝を表します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始熱心なご指導とご鞭撻を賜り、基礎研究の経験を積みたいという私の意図を汲みご助言いただいた、山口大学大学院医学系研究科肝臓再生基盤学講師 高見太郎先生、助教 藤澤浩一先生、山口大学教育機構保健管理センター准教授 山本直樹先生、山口大学大学院医学系研究科臨床検査・腫瘍学講座助教 松本俊彦先生に深く謝意を表します。

山口大学大学院において、様々なご支援と貴重なご助言を賜りました山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域教授 西川潤先生、山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域教授 山本健先生をはじめ、山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域の諸先生方に厚く感謝いたします。また、博士前期課程より研究だけでなく、今後の人生へのご助言とお気遣いをいただいた山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学助教 本木由香里先生に心から感謝いたします。

博士後期課程の間、臨床検査技師として一からご指導いただいた腹部超音波検査に関わる先生方と技師の皆さまに厚く感謝いたします。

最後に、山口大学大学院博士後期課程への進学を承諾し、長きにわたり支えてくれた家族に感謝いたします。

参考文献

1. Detlef S, Nezam HA. Liver cirrhosis. *The Lancet*. 2008;371:838-851.
2. Enomoto H, Ueno Y, Hiasa Y, et al. Transition in the etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey. *J Gastroenterol*. 2019; doi: 10.1007/s00535-019-01645-y.
3. Jang JW, Choi JY, Kim YS, et al. Long-term effect of antiviral therapy on disease course after decompensation in patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. *Hepatology*. 2015 ;61:1809-1820
4. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol*. 2019;70:151-171.
5. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat. Rev. Immunol*. 2014;14:181-194.
6. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:397-411.
7. Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*. 1979;76:710-719.
8. Rojkind M, Ponce-Noyola P. The extracellular matrix of the liver. *Coll Relat Res*. 1982;2:151-175.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
10. Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-2213.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
12. Matsumoto T, Takami T, Sakaida I. Cell transplantation as a non-invasive strategy for treating liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;10:639-48.
13. Matsuda T, Takami T, Sasaki R, Nishimura T, Aibe Y, Diaz Paredes B, et al. A canine liver fibrosis model to develop therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow-derived cells. *Hepatol. Commun*. 2017;1:691-703.
14. Nishimura T, Takami T, Sasaki RR, Aibe Y, Matsuda T, Fujisawa K, et al. Liver regeneration therapy through the hepatic artery-infusion of cultured bone marrow cells in a canine liver fibrosis model. *PLoS One* 2019;14:e0210588.
15. Quintanilha LF, T Takami, Y Hirose, K Fujisawa, Y Murata, N Yamamoto, RC Goldenberg, S Terai and I Sakaida. Canine mesenchymal stem cells show antioxidant properties against thioacetamide-induced liver injury in vitro and in vivo. *Hepatol Res*. 2014;44:206-217.

16. Grant JL and B Smith. Bone marrow gas tensions, bone marrow blood flow, and erythropoiesis in man. *Ann Intern Med.* 1963;58:801-809.
17. Haque N, Rahman MT, et al. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *Scientific World Journal.* 2013;2013:632972.
18. Esaka M, Fujisawa K, Goto M and Kisu Y. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol.* 1992;100:231-237.
19. Lin HY, Lai RH, Lin ST, Lin RC, et al. Suppressor of cytokine signaling 6 (SOCS6) promotes mitochondrial fission via regulating DRP1 translocation. *Cell Death Differ.* 2013;20:139-153.
20. Sato H, Takahashi M, Ise H, Yamada A, Hirose S, Tagawa Y, et al. Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:107-112.
21. Fujisawa K, Hara K, Takami T, et al. Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9:93.
22. Peterkofsky B. The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1972;152:318-328
23. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng.* 2008;105:586-594.
24. Rosendorff C, Black HR, Cannon CP, et al. Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research and the Councils on Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention. *Circulation.* 2007;115:2761-2788.
25. Chan D, Lamande SR, Cole WG, Bateman JF. Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation in vitro. *Biochem J.* 1990;269:175-181.
26. Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao X, Ma Y, Qin L, et al. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* 2012;22:219-236.
27. Bartsch C, Bekhite MM, Wolheim A, Richter M, et al. NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:432-443.
28. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima II, Ikeda E, Kubota Y, et al. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7:391-402.
29. Miharada K, Karlsson G, Rehn M, Rorby E, Siva K, et al. Hematopoietic stem cells are regulated by Cripto, as an intermediary of HIF-1alpha in the hypoxic bone marrow niche. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1266:55-62.

30. Kuiper C, GU Dachs, MJ Currie and MC Vissers. Intracellular ascorbate enhances hypoxia-inducible factor (HIF)-hydroxylase activity and preferentially suppresses the HIF-1 transcriptional response. *Free Radic Biol Med.* 2014;69:308-317.
31. Kuiper C and MC Vissers. Ascorbate as a co-factor for fe-and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. *Front Oncol.* 2014; 4:359.
32. Kojima Y, Tsuchiya A, et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions had a greater therapeutic effect on mice with liver cirrhosis compared to those cultured under normal oxygen conditions. *Regen Ther.* 2019;11:269-281.
33. Driscoll J, Patel T. The mesenchymal stem cell secretome as an acellular regenerative therapy for liver disease. *J. Gastroenterol.* 2019;54:763-773.
34. Hu C, Zhao L, Duan J, Li L. Strategies to improve the efficiency of mesenchymal stem cell transplantation for reversal of liver fibrosis. *J. Cell. Mol. Med.* 2019;23:1657-1670.
35. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:478-483.
36. Qi L, Gao C, Feng F, Zhang T, Yao Y, Wang X, et al. MicroRNAs associated with lung squamous cell carcinoma: New prognostic biomarkers and therapeutic targets. *J. Cell. Biochem.* 2019;120:18956-18966.
37. Aycock RS, Seyer JM. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Connect. Tissue Res.* 1989;23:19-31.
38. Pellicoro A, Aucott RL, Ramachandran P, Robson AJ, Fallowfield JA, Snowdon VK, et al, Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis. *Hepatology* 2012;55:1965-1975.
39. Weiskirchen R. Hepatoprotective and anti-fibrotic agents: it's time to take the next step, *Front. Pharmacol.* 2016;6:303.
40. Zhao Z, Lin C-Y, Cheng K. siRNA- and miRNA-based therapeutics for liver fibrosis. *Transl. Res* 2019;214:17-29.
41. Chen Y, Ou Y, Dong J, Yang G, Zeng Z, Liu Y, et al. Osteopontin promotes collagen I synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-129-5p inhibition. *Exp. Cell Res.* 2018;362:343–348.
42. Wang YZ, Zhang W, Wang YH, Fu XL, Xue CQ. Repression of liver cirrhosis achieved by inhibitory effect of miR-454 on hepatic stellate cells activation and proliferation via Wnt10a. *J Biochem.* 2019;165:361–367.

43. Hyun J, Wang S, Kim J, Rao KM, Park SY, Chung I, et al. MicroRNA-378 limits activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis by suppressing Gli3 expression. *Nat Commun.* 2016;7:10993.
44. Zeng C, Wang Y-L, Xie C, Sang Y, Li T-J, Zhang M, et al. Identification of a novel TGF-beta-miR-122-fibronectin 1/serum response factor signaling cascade and its implication in hepatic fibrogenesis. *Oncotarget* 2015;6:12224-12233.
45. 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;24:1848-1859.
46. Freise C, Heldwein S, Erben U, Hoyer J, Köhler R, Jöhrens K, et al. K⁺-channel inhibition reduces portal perfusion pressure in fibrotic rats and fibrosis associated characteristics of hepatic stellate cells. *Liver Int.* 2015;35:1244-1252.
47. Martinek N, Shahab J, Sodek J, Ringuelette M. Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone? *J. Dent. Res.* 2007;86:296-305.
48. Trombetta-Esilva J, Bradshaw AD. The function of SPARC as a mediator of fibrosis. *Open Rheumatol. J.* 2012;6:146-1455.
49. Shang H, Liu X, Guo H. Knockdown of Fstl1 attenuates hepatic stellate cell activation through the TGF β 1/Smad3 signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2017;16:7119-7123.
50. Ito S, Nagata K. Roles of the endoplasmic reticulum-resident, collagen-specific molecular chaperone Hsp47 in vertebrate cells and human disease. *J. Biol. Chem.* 2019;294:2133-2141.
51. Zhou X, Tan FK, Guo X, Wallis D, Milewicz DM, Xue S, et al. Small interfering RNA inhibition of SPARC attenuates the profibrotic effect of transforming growth factor beta1 in cultured normal human fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2005;52:257-261.
52. Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat. Biotechnol.* 2008;26:431-442.
53. Rezvani M, Español-Suñer R, Malato Y, Dumont L, Grimm AA, Kienle E, et al. In vivo hepatic reprogramming of myofibroblasts with AAV vectors as a therapeutic strategy for liver fibrosis. *Cell Stem Cell.* 2016;18:809-816.

