

## サブテーマ 1 : ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出

小テーマ 1-1: ウイルス肝炎からの肝発がん機構・進展因子の解明とその予防・治療法の開発  
b) HGF 等生理活性物質による肝炎・肝硬変の予防・治療法の開発とその臨床応用

サブテーマリーダー 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科：教授 坪内博仁

研究従事者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科：教授 合田栄一

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科：助教 森内昭博、講師 宇都浩文、准教授 井戸章雄

宮崎県産業支援財団：研究員 高見陽一郎

## 研究の概要、新規性及び目標

## ①研究の概要

本研究では肝細胞増殖因子 (HGF) 及び osteoactivin (OA) に着目して、肝炎・肝硬変の予防・治療法の開発において基盤となる知見を得ることを目的としている。

- 1) HGF は実験的肝障害や肝硬変の予防および治療に有効であることを報告している。HGF 産生を促進し、HGF レベルを上昇させることができればこれらの疾患の予防・治療に応用できると考えられる。そこでこのような作用をもつ物質を、日常摂取する野菜に着目して探索した結果、ヒト培養細胞による HGF 産生を促進する数種類の野菜抽出物を見出すことができた。さらに、そのうちの 1 種類の野菜粉末投与によりラット肝臓中の HGF レベルが上昇することを明らかにした。
- 2) HGF の作用機構を解明するために、HGF 活性化制御機構の解明やアポトーシス制御分子の探索を行い、*bcl-xL* 及び *nfn3* を同定した。
- 3) OA トランスジェニック (OA-TG) ラットを用いて OA がコリン欠乏アミノ酸置換食飼育による脂肪肝、肝線維化及び前がん病変出現を抑制する可能性を見出し、その作用機序解析を行った。

## ②研究の独自性・新規性

- 1) これまでに HGF 産生を促進する農作物は報告されておらず、今回の我々の発見が初めてである。
- 2) HGF による活性化制御機構やアポトーシス制御機構は未だ不明であり、その制御に重要な分子を網羅的解析手法で探索し、そのような分子を用いた肝疾患の治療や機能性食品の開発を目的とした点に独自性と新規性がある。
- 3) OA を用いて肝疾患の病態進展抑制を目指し、OA の肝疾患における分子機構を探索している点で、独自性と新規性がある。

## ③研究の目標

- ・フェーズ I : 1) 宮崎県産の野菜を中心とした抽出物の HGF 産生促進作用をスクリーニングする。活性がみとめられた抽出物の活性成分を単離・同定し、作用機序を解析する。  
2) 培養細胞株やアポトーシス動物モデルを用いて、HGF 刺激で発現変動する分子を網羅的解析から同定する。同定した分子については機能解析を行い、HGF によるアポトーシス制御の責任分子を明らかにする。  
3) OATG ラットを用いて脂肪肝、肝線維化及び肝発がんモデルにおける OA の機能を検証する。
- ・フェーズ II : 1) HGF 産生促進作用が期待できる抽出物を動物に投与し、*in vivo* における HGF 産生誘導作用を評価する。  
2) HGF による活性化制御機構やアポトーシス制御に関連する分子を同定し、その発現に作用する機能性食品を探索する。  
3) 網羅的な解析手法により OA の作用機序を検討する。
- ・フェーズ III : 1) *in vivo* における HGF 産生誘導作用が確認できれば、肝炎・肝硬変の発症予防効果を検討する。  
2) 機能性食品を用いた *in vivo* での発現変動を明らかにする。  
3) OA の肝疾患治療薬としての応用を検討する。

## 研究の進め方及び進捗状況

- 1) 培養ヒト真皮線維芽細胞を用いて HGF 産生促進作用をスクリーニングした結果、いくつかの野菜抽出物にその効果を認めた。各種カラムクロマトグラフィーを行った結果、一部野菜抽出物中の活性成分の分子量を決定し、また作用機序を解析した。さらに、一部の野菜につき *in vivo* における HGF 産生誘導効果を明らかにした。しかし、肝炎・肝硬変の発症予防効果を検討するまでには至らなかった。
- 2) HGF 活性化制御機構は遺伝子改変動物モデルなどを用いて解析した。また、HGF のアポトーシス誘導作用の網羅的解析を行うために、既報に基づいて培養線維肉腫細胞株に HGF を添加したが、安定したアポトーシスの誘導に至らず、再現性が乏しかった。そこで致死性肝不全マウスを用いた HGF の抗アポトーシス作用の解析を中心に研究を進めた。当初、網羅的なタンパク質発現解析を行ったが、最終的に有望な候補分子の同定に至らなかった。しかし、マイクロアレイを用いて網羅的に遺伝子発現を検討したところ、*bcl-xL* と *nfn3* を候補遺伝子として同定した。*bcl-xL* は既に HGF の下流で、抗アポトーシスに関与することが報告されていたが、*nfn3* については酸化ストレスへの関与の報告はあるものの、HGF やアポトーシスとの関連は報告がなく、新規の機能と考えられた。リアルタイム PCR で再現性を確認し、*nfn3* の発現ベクターを構築した。培養細胞へ導入することで、過酸化水素による酸化ストレスへの抵抗性を獲得することを確認した。しかし、同定した *nfn3* の遺伝子発現と機能性食品との関連は十分検討できなかった。
- 3) OATG ラットをコリン欠乏アミノ酸置換食で飼育し、OA の機能を検証したところ、OATG では脂肪肝、肝線維化及び前がん病変がいずれも抑制された。しかし、別に作成した系統の OATG では肝病態抑制効果は明らかではなく、OA の発現レベルにより OA の作用機序は異なる可能性が示唆され、肝疾患治療薬としての応

用には至っていない。

**主な成果**

**具体的な成果内容:**

- 1) ニガウリ胎座部と可食部、赤ピーマン可食部および冬虫夏草の抽出物によりヒト真皮線維芽細胞における HGF 産生が促進され、HGF mRNA の発現上昇も認められた。ニガウリ胎座部抽出物の本作用には MAPK 経路の、赤ピーマン可食部および冬虫夏草抽出物の本作用には cAMP-PKA 経路の活性化の関与が示唆された。ニガウリ胎座部の活性成分は分子量約 14000 の熱に比較的弱い非タンパク質性物質であり、本成分はヒト真皮線維芽細胞の増殖促進作用も有することが示された。赤ピーマン可食部の凍結乾燥粉末を添加した飼料の摂取により、ラット肝臓中の HGF レベルが有意に上昇した。
- 2) HGF、HGFA activator (HGFA) および HGFA inhibitor の機能を明らかにした。また、HGF の抗アポトーシス作用の責任分子候補である npn3 遺伝子を同定し、一部機能解析を行い、抗アポトーシス作用に関する可能性を示した。
- 3) OA の作用のうち、抗線維化作用は PDGFR $\alpha$  及び TIMP-1 の発現低下が関与していることを明らかにした。

特許件数:3

論文数:83

口頭発表件数:35

**研究成果に関する評価**

**1 国内外における水準との対比**

- 1) 野菜をはじめ日常摂取する食品による HGF 産生の誘導は報告がなく、今回の我々の発見が最初のものである。先に合田らはアスコルビン酸が種々の HGF 産生誘導薬の作用を増強することを明らかにしている。また、同グループの高見らはビタミン A の活性型であるレチノイン酸がサイクリック AMP による HGF 産生誘導を増強することを報告している。
- 2) HGF の抗アポトーシス機構の制御分子として bcl-xL は既に報告された分子であり、我々の研究の信憑性を示すものであると考えられた。このようなことから、同時に同定された npn3 が HGF の抗アポトーシス作用に関与することが強く示唆された。npn3 は機能未解明の分子であり、HGF やアポトーシス作用との関連を初めて明らかにした我々の研究は、水準の高い研究と考えられる。
- 3) OA が肝疾患の病態と関連する可能性を初めて明らかにした我々の研究レベルは非常に高く、未だ不明な部分が多い OA の肝疾患における役割を継続している点でも研究水準は維持されている。

**2 実用化に向けた波及効果**

- 1) HGF レベルを増加させることは、肝炎・肝硬変以外にも、閉塞性動脈硬化症や創傷などの治療への応用も期待される。
- 2) HGF は多彩な生理作用を持ち、安全な臨床応用にはそれぞれの生理作用の責任分子を同定することが望まれる。HGF の活性化制御機構の解明やアポトーシスの制御分子を同定する意義は、より安全な臨床応用を目指すうえで重要である。
- 3) OA の作用機序を詳細に解析することにより、肝疾患治療薬としての応用が期待できる。

**残された課題と対応方針について**

- 1) 活性成分の同定とそれを用いたより強い *in vivo* 効果の検討が必要である。今後も合田らが中心となり、本研究を継続する予定である。
- 2) 今回は HGF の抗アポトーシス作用の責任分子の候補として npn3 を同定したが、機能解析は不十分であった。今後は遺伝子改変マウスの作成なども準備中である。*in vivo* における npn3 の機能解析を進める必要がある。
- 3) OA の発現レベルによりその作用は異なる可能性があり、発現レベルと作用機序を加味しながら、種々の肝疾患モデルでの解析を行い、肝疾患における OA の役割をより明確にする必要がある。

	JST 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	0	6116	6,658	6,718	4,374	23,866	0	0	0	0	0	0	0	23,866
設備費	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	500	4,256	4,500	6,286	1,687	800	18,029	0	0	0	0	0	0	0	18,029
旅費	0	0	216	222	201	120	759	0	0	0	0	0	0	0	759
その他	27	46	32	456	484	280	1325	0	0	0	0	0	0	0	1325
小計	527	4,302	10,864	13,622	9,090	5,574	1325	0	0	0	0	0	0	0	1325

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST 負担による設備:

地域負担による設備: