

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01858

研究課題名(和文) 肝線維化治療におけるマクロファージ活性化制御と骨髄細胞移植による増強効果の検証

研究課題名(英文) Enhancement effect by bone marrow cell transplantation and macrophage regulation by S-allyl glutathione in rat liver fibrosis

研究代表者

南山 幸子 (Minamiyama, Yukiko)

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：00362989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの四塩化炭素肝線維化を骨髄細胞移入(BMC)もSAG投与も有意に抑制するが、その機序の違いは不明であった。SAGはマクロファージ(M ϕ)の分極制御に関与することが判明したため、異なるM ϕ 分極のDNA arrayの結果から本モデルにおいてもタンパクレベルで確認したところ、SAGはTGF- β によるROS産生系を抑制している可能性が示唆されたが、BMCではその効果はなかった。以上の知見より、BMC移入もSAGの投与も肝線維化を抑制できるが、その機序は異なり、SAGとBMC移入を併用投与することで患者負担を軽減するとともに、異なる機序による肝線維化制御が可能となり、臨床応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)や脂肪性肝炎(NASH)患者は1000万人以上であり、90%以上が生活習慣病を合併している。この患者は数十年で3~5割が肝硬変に、その数%が肝がんに進行する。この肝硬変の治療は困難であり、安全な治療法の開発が急務である。本研究において、骨髄細胞移入と酸化ストレスを抑制しM ϕ を制御できるS-アリルグルタチオンの投与という異なる機序の治療を組み合わせることで患者負担が少なく有効な治療法となる可能性を提案することができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although carbon tetrachloride liver fibrosis in rats was significantly suppressed by both bone marrow cell transfer (BMC) and SAG administration, the difference in the mechanism was not clear. SAG was found to be involved in polarization of macrophages (M ϕ). From the results of DNA array with different types of M ϕ polarization, changes in some same proteins were also confirmed in this model. SAG suppressed the ROS production system by TGF- β . However, BMC had no effect. From the above findings, co-administration of SAG and BMC transfer can effectively suppress hepatic fibrosis via the different mechanism. This clinical application is expected to reduce the burden on the patient and treat against hepatic fibrosis by different mechanisms.

研究分野：病態生化学 活性酸素病態

キーワード：肝硬変治療 活性酸素 マクロファージ 骨髄細胞移入

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NAFLD およびNASH は数十年で3-5 割が肝硬変に進行し、肝硬変から肝がんへの進行は2%/年である。(2014 年日本消化器病学会ガイドライン)。現在、臓器線維化の治療薬は肺線維症治療薬のピルフェニドンとニンテダニブだけであり、肝障害の副作用がある。よって、臓器線維症に対する安全な治療薬の開発が急務である。肝硬変治療は、BMC 移植による間葉系細胞への分化による肝再生促進効果の他、1)コラーゲン産生細胞である星細胞の不活化、2)コラーゲン特異的シャペロンタンパクHSP47 の発現抑制、3)M 活性化制御、4)リンパ球系の制御などが臓器線維症に対する治療戦略の標的として考えられている。申請者らは病態治療にM 活性化制御に注目している。M は急性炎症等に見られるM1型、組織修復、癌等に見られるM2 型、さらに肝、脾、脂肪組織等に常在する組織常在型に分けられ、線維化病態では分極バランスがM2>M1 に傾いていることが知られている。一方、BMC 移植は間葉系細胞への分化以外にG-CSF、IL-1 の上昇やIL-6 の低下が報告され、血中および肝組織内のM やリンパ球系細胞の関与も推測できる(Cell Transplant 21:2363, 2012)。申請者らの創出したSAG は、M のM2>M1状態をM1 へ助長するM 活性化制御剤として機能し、CC14 誘発肝線維化を抑制する。従って、BMC 移植による間葉系・骨髄系細胞とSAG の併用投与は治療効果を相乗的に増強し、線維化抑制亢進につながることを期待される。M はM 1 / M 2 の分極バランスを制御することが大切である。癌病態でも、分極バランスがM 2 > M 1 に傾いており、治療によりがん周辺M のM1/M2 比率が高くなった患者の生存率が上昇することが報告されている(J Ovar Res 7:19, 2014)。このように、各種病態のM1/M2 バランスを制御する治療戦略は広範囲の病態軽減に応用可能である。

2. 研究の目的

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)や脂肪性肝炎(NASH)患者は1000 万人以上であり、90%以上が生活習慣病を合併している。この患者は数十年で3-5 割が肝硬変に、その数%が肝がんに進行する。肝硬変の治療は困難であり、安全な治療法の実現が急務である。申請者らは大蒜成分S-アリルシステイン(SAC)の抗酸化を高める目的でS-アリルグルタチオン(SAG)を創出した。SAG はマクロファージ(Mφ)のM1/M2 分極バランスを制御し肝線維化を抑制する。また、H25 年より骨髄細胞(BMC)移植による肝再生促進治療が臨床応用されているが、肝への定着性や細胞数確保が困難なため、一般的な治療法に至っていない。そこで、本研究では少量のBMC とSAG の併用が肝線維化治療に相乗効果をもたらすかを検証し、より簡便で安全な臓器線維化治療法の実現を目的とする。

3. 研究の方法

SAG およびBMC 移植の肝線維化抑制をそれぞれ単独投与との比較により相乗効果を確認し、その治療効果がM のM1/M2 バランス制御によるかどうかをM 分極動態から明確にする。

.肝線維化モデル(CC14 反復投与)におけるSAG およびBMC 移植による線維化改善に相乗効果が有るか否かを検討し、相乗効果があれば至適投与量および有効細胞数を明らかにする。

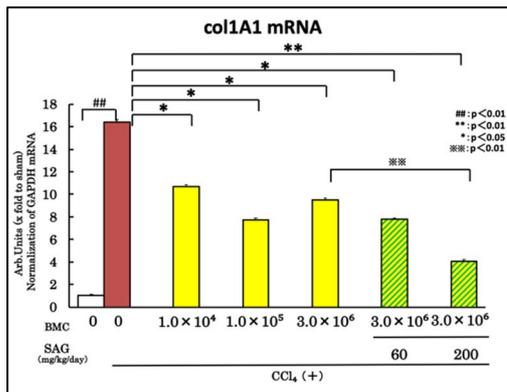
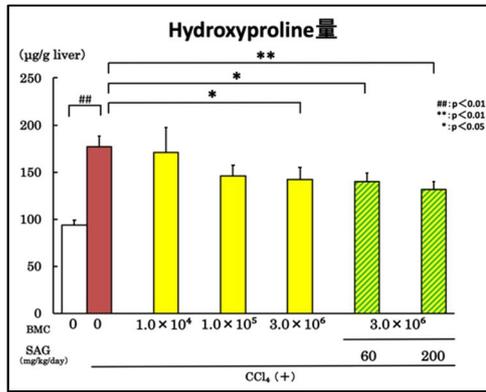
.線維化改善の相乗効果を示す条件でのGFP ラット由来BMC 移植により、肝線維化病態における肝M の由来およびその動態を解析する。

.星細胞の活性化指標やその他の線維化マーカーおよびHSP47 などの解析を行い、併用投与のM 分極制御の効果をもっとも反映する指標を探索し、新規SAG 誘導体の評価系として確立する。

4. 研究成果

.肝線維化モデル(CC14 反復投与)におけるSAG およびBMC 移植による線維化改善効果

SAG (200 mg/kg/day)経口投与または/およびBMC (3 x 10⁶個/rat, i.v.)を既報¹⁾に従って



CCl₄ の反復投与 4 週後 (線維形成後) に投与した結果、それぞれ単独で有意に肝線維化が抑制されたが、相乗効果は無かった。そこで、SAG (60 mg/kg/day)、BMC (1 × 10⁴、1 × 10⁵ 個/rat, i.v.) として投与したところ、肝の線維量を反映するヒドロキシプロリン量は、BMC 投与単独では細胞数依存性に増加を抑制したが、SAG の併用効果は見られなかった。しかしながら、CCl₄ 投与 9 週後の Col1A1 mRNA の増加は BMC の単独投与より有意に SAG との併用の方が減少した。これより、さらに長期の検討では肝線維化抑制における効果が顕著になる可能性が示唆された。

. GFP ラットの BMC 移入による細胞の局在とマクロファージ動態の解析

GFP ラットからの BMC と SAG の併用により、マクロファージ動態が変化するかどうかを検討するため

に、GFP-BMC を採取してラットに細胞数を変えて投与した。1 時間後、2 4 時間後の肝臓において抗 GFP 抗体で western blot 解析および組織学的検討を行ったが、ほとんど変化を捉えることができなかつたため本実験による解析は断念した。

. BMC および SAG 併用投与のマクロファージ動態と線維化におよぼす相乗効果の指標の探索 SAG はマクロファージの分極を制御することが判明している。骨髄細胞由来マクロファージ (BMDM) を用いて、炎症型 (M1) および抗炎症型 (M2) に分極させた際の SAG の影響を検討したところ、いくつかの経路と関連遺伝子の変化が判明した。そこで、タンパク質レベルでの本線維化モデルにおいての変化および BMC と SAG 投与においての違いを検討した。線維化病態では M2 > M1 と報告されている M2 型において遺伝子発現が上昇した遺伝子と低下した遺伝子のそれぞれのタンパク質は線維化病態でも遺伝子変化と同じように変化することがわかり、BMC ではその変化を改善しないが、SAG 投与では改善することがわかった。これらのタンパク質の誘導には、おそらくマクロファージ産生 TGF-β による星細胞への活性酸素シグナルが関連していることが示唆されたため、本機序についての解析を続行している。

本申請課題の結果より、肝線維化治療における BMC 移入という患者負担を SAG 投与の併用で軽減できることは、患者 QOL 向上に寄与することは間違いないと考えている。引き続き論文執筆のため、機序を深く検討していく予定である。さらに、SAG の誘導體についていくつかの新規化合物の評価も始めているので、線維化に有効なさらなる新規化合物を提案していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toda M, Mizuguchi S, Minamiyama Y, Yamamoto-Oka H, Aota T, Kubo S, Nishiyama N, Shibata T, Takemura S.	4. 巻 63
2. 論文標題 Pirfenidone suppresses polarization to M2 phenotype macrophages and the fibrogenic activity of rat lung fibroblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr.	6. 最初と最後の頁 58-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2019.02.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takemura S, Azuma H, Osada-Oka M, Kubo S, Shibata T, Minamiyama Y.	4. 巻 314(2)
2. 論文標題 S-allyl-glutathione improves experimental liver fibrosis by regulating Kupffer cell activation in rats.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.	6. 最初と最後の頁 G150-G163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpgi.00023.2017.	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Yukiko Minamiyama ¹ , Shigekazu Takemura ² , Hideki Azuma ³ , Mayuko Osada-Oka ¹ , Michihito Toda ² , Keiko Kobayashi ¹ , Hikaru Miyamoto ² , Hiroshi Ichikawa ⁴ and Shoji Kubo
2. 発表標題 S-allyl-glutathione suppresses liver fibrosis by inhibition of excess skewing polarization of macrophages in rats
3. 学会等名 SFRR International 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michihito Toda, Shinjiro Mizuguchi, Yukiko Minamiyama, Shigekazu Takemura, Hiroko Oka-Yamamoto, Takanori Aota, Hikaru Miyamoto, Noritoshi Nishiyama
2. 発表標題 The suppressive effect of lung fibrosis and polarization to M2-macrophage by liposome chlordonate combined with pirfenidone
3. 学会等名 SFRR International 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru Miyamoto, Shinjiro Mizuguchi, Yukiko Minamiyama, Shigekazu Takemura, Hiroko Oka-Yamamoto, Michihito Toda, Takanori Aota, Noritoshi Nishiyama
2. 発表標題 Effects of Pirfenidone on rat alveolar macrophage skewing and macrophage-fibroblast interaction.
3. 学会等名 SFRR International 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Minamiyama, Shigekazu Takemura, Hideki Azuma, Mayuko Osada-Oka, Michitaka Toda, Keiko Kobayashi, Hikaru Miyamoto, Hiroshi Ichikawa and Shoji Kubo
2. 発表標題 S-allyl-glutathione suppresses liver fibrosis by inhibition of excess skewing polarization of macrophages in rats
3. 学会等名 19th SFRR Biennial Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Minamiyama, Shigekazu Takemura, Hideki Azuma, Katsura Mizushima, Takeshi Ara, Shoji Kubo.
2. 発表標題 S-allyl-glutathione regulates macrophage polarization in rats
3. 学会等名 SfRBM's 26th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigekazu Takemura, Yukiko Minamiyama, Hideki Azuma, Mayuko Osada-Oka, and Shoji Kubo.
2. 発表標題 S-allyl-glutathione improves liver fibrosis by inhibition of excess M1- or M2- polarized macrophage in rats.
3. 学会等名 AASLD 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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	竹村 茂一 (Takemura Shigekazu) (00322363)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師 (24402)	
研究 分担者	岡 真優子 (Oka Mayuko) (40347498)	京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24302)	