

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15264

研究課題名（和文）新規Galectin-3阻害剤による肝線維化制御の革新的治療開発に関する基礎研究

研究課題名（英文）Basic research for innovative therapy of liver fibrosis by novel Galectin-3 inhibitor

研究代表者

石井 範洋 (Ishii, Norihiro)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00711508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肝硬変におけるM2BPGiの研究から肝線維化進行には星細胞とKupffer細胞がGalectin-3を介して相互に活性化しあうことが重要であると考えられ、Galectin-3と高い親和性を持つ新規Galectin-3阻害剤の直接効果を検証した。まず、星細胞に対しては濃度依存性に細胞増殖が抑制され、蛋白では活性化マーカーである α -SMAの発現が抑制されており、新規Galectin-3阻害剤は星細胞の活性化を抑制することが示された。一方でこの新規Galectin-3阻害剤は線維化を伴うIn vivo皮下腫瘍モデルにおいても効果が確認されており、今後肝線維化モデルへの応用が期待される結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変は慢性的な肝障害により肝細胞が線維組織で置換され、肝臓の硬化と肝機能の低下をきたした状態であり、日本における患者数は約40万人とされている。また、肝硬変に伴う肝癌の発癌も重要な問題である。肝線維化に対する有効な治療薬は現時点ではまだなく、新規Galectin-3阻害剤は肝星細胞とKupffer細胞の連関を遮断し、肝の線維化を抑制する新たな治療戦略になりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：From our study of M2BPGi in liver cirrhosis, co-activation between hepatic stellate cells and Kupffer cells is considered to be important for the progression of liver fibrosis. So we examined the effect of novel galectin-3 inhibitor. In the cell proliferation assay, novel galectin-3 inhibitor for hepatic stellate cells showed the suppressive effect in a dose dependent manner. Moreover, in the western blotting, novel galectin-3 inhibitor suppressed the expression of α -SMA which is a activation marker for stellate cells. Thus, novel galectin-3 inhibitor has a suppressive effect for the activation of hepatic stellate cells. On the other hand, this novel galectin-3 inhibitor has been confirmed to be effective also in the in vivo xenograft model with fibrosis, this new drug are expected to be applied for the liver fibrosis model in the future.

研究分野：肝線維化

キーワード：肝硬変 肝線維化 Galectin-3 星細胞 Kupffer細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝硬変は慢性的な肝障害により肝細胞が線維組織で置換され、肝臓の硬化と肝機能の低下をきたした状態であり、日本における患者数は約 40 万人とされている。従来は B 型/C 型に代表されるウイルス性肝炎やアルコールに起因する肝硬変が大多数を占めていたが、近年は肥満や糖尿病などと深いかわりのある nonalcoholic steatohepatitis (NASH)が増加傾向にある。肝硬変は年間 8%の割合で肝癌を発症し、肝癌による年間の死者数は 3 万人を超える。また、肝癌を併発していない肝硬変でも年間死者数は 1 万 7 千人と予後不良な疾患であり、有効な治療法の開発が望まれる (平成 27 年度肝癌白書)。

肝の線維化には TGF- β や Galectin-3、PDGF、Wnt/ β -catenin signal など様々なサイトカインやシグナル経路の関与が報告されている。なかでも Galectin-3 (Mac-2)は、各種組織の線維化に関連し、肝臓ではマクロファージである Kupffer 細胞に発現しており、コラーゲン産生細胞である肝星細胞を活性化させ肝の線維化を促進することが報告されている

また、Galectin-3 は近年新たな肝線維化マーカーとして同定された分泌型糖蛋白である M2BPGi のリガンドとしても知られ、我々はこの M2BPGi が肝の星細胞から産生され、Kupffer 細胞の Galectin-3 を介して相互に活性化しあっていることを明らかにした (Bekki Y, Shirabe K, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2017; 32: 1387-93.)。これらのことから Galectin-3 は肝の線維化において重要であり、Galectin-3 を抑制・阻害することにより革新的な肝硬変の治療に結び付く可能性が考えられる。実際、肺線維症においては吸入薬の Galectin-3 阻害薬の臨床応用が進行中であり、Galectin-3 阻害薬は肝硬変の線維化においても有望な治療法となる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

共同研究者である創薬科学研究教育センター 有機合成医薬学部門の市川聡教授らは十分な活性があり、代謝的に安定で膜透過性を有する新たな Galectin-3 阻害剤を開発した。肝星細胞-Kupffer 細胞連関を新規 Galectin-3 阻害剤で遮断し、肝の線維化を抑制するという肝硬変に対する新たな治療戦略を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

新規 Galectin-3 阻害剤の肝星細胞-Kupffer 細胞連関に対する作用を検証し、その分子機序を明らかにするため以下の研究を行う。さらに肝線維化に対する新規 Galectin-3 阻害剤の臨床応用を目指すための動物を用いた前臨床研究を行う。

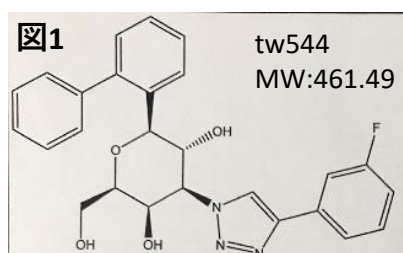
○In vitro における肝星細胞と Kupffer 細胞の連関に対する Galectin-3 阻害剤の効果検証

肝星細胞の細胞株 Lx-2 および Kupffer 細胞を用いる。Lx-2 と Kupffer 細胞の共培養系において、肝星細胞の上清に含まれる M2BPGi が Kupffer 細胞の Galectin-3 の誘導を介して、Galectin-3 依存性に星細胞の活性化を促進していることは明らかとなっているため、Galectin-3 阻害剤を用いて同条件で星細胞の活性化が抑制されるかを検証する。星細胞の活性化マーカーには α -SMA を用い、線維化に関連する Collagen type I や TGF- β の発現も Western blotting 法を用いて検証する。また、サイトカインアレイ、質量分析計、RNA-sequence を用いて Galectin-3 阻害剤投与の有無により、培養上清内・細胞内蛋白、RNA 発現の変化を詳細に検証し分子機序の解明を目指す。研究に用いる Galectin-3 阻害剤に関しても新規に合成された 5 種類の類似化合物の提供を受けており、肝星細胞-Kupffer 細胞連関の抑制・阻害に対して最大の効果を発揮する化合物の探索も行い、同時に細胞毒性の有無に関しても検証を行う。

4. 研究成果

①新規 Galectin-3 阻害剤のスクリーニングおよび有効性の検討

共同研究者である創薬科学研究教育センター 有機合成医薬学部門の市川聡教授らとともに、新規 Galectin-3 阻害剤の候補として 7 種類の化合物を開発した。これらの薬剤は細胞膜の透過性を考慮した構造で、これまでの薬剤と異なり、細胞内の Gal-3 も阻害できる可能性がある。これらの新規 Galectin-3 阻害剤を有効性のスクリーニング目的に Galectin-3 を発現する肝癌細胞、発現を認めない正常肝細胞に投与を行い、正常肝細胞への毒性がなく、肝癌細胞の増殖や浸潤抑制効果をもつ有望な新規 Galectin-3 阻害剤を同定した (図 1: tw544)。これらの結果より、tw544 を用いて以降の検討を行うこととした。



②肝星細胞に対する新規 Galectin-3 阻害薬 (tw544) の効果

Kupffer 細胞は入手経路が希少なため、まず肝星細胞株である Lx-2 において tw544 の効果を検証した。Lx-2 に対して tw544 の投与を行うと、増殖抑制効果が確認された (図 2)。また、tw544 投与時の Lx-2 蛋白発現の変化では、濃度依存性に活性化マーカーである α -SMA の発現低下を認めた (図 3)。以上のことからこの新規 Galectin-3 阻害剤の星細胞に対する活性化抑制効果が認められた。

図 2

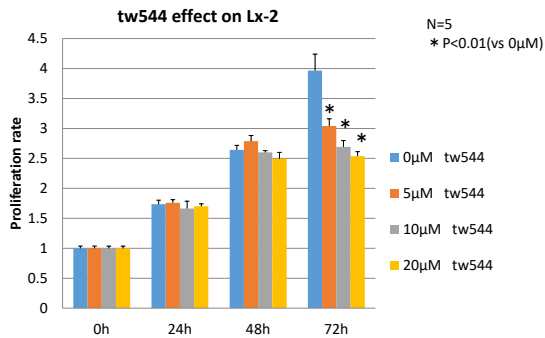
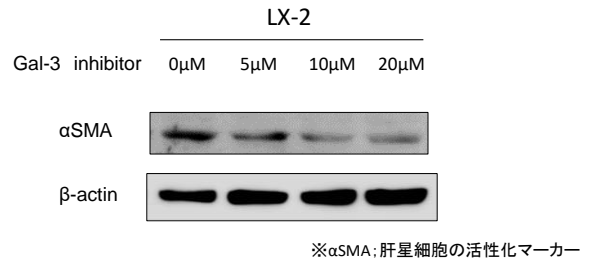


図 3

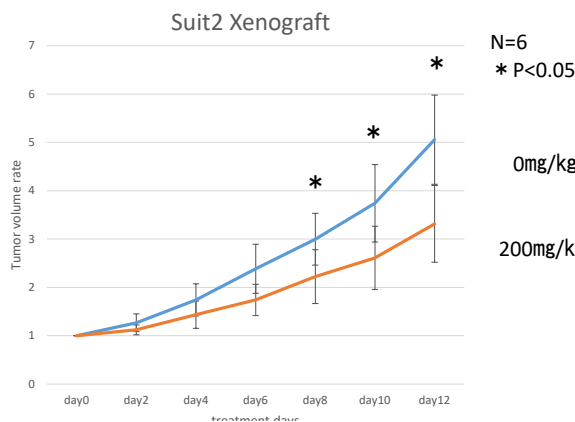


③In vivo における新規 Galectin-3 阻害剤の薬効

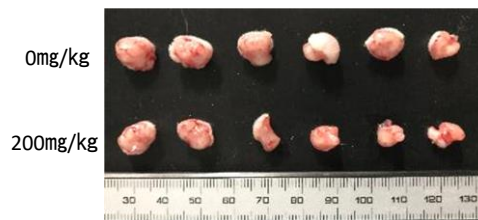
肝線維化モデルの検証前に、線維化を伴うことが多い膵癌皮下腫瘍モデル (マウス) において、新規 Galectin-3 阻害剤の薬効を検証した。新規 Galectin-3 阻害剤投与により膵癌皮下腫瘍の増大が抑制されることを確認した (図 4)。

図 4

※Gal-3 inhibitor : intraperitoneal(I.P.) injection every day

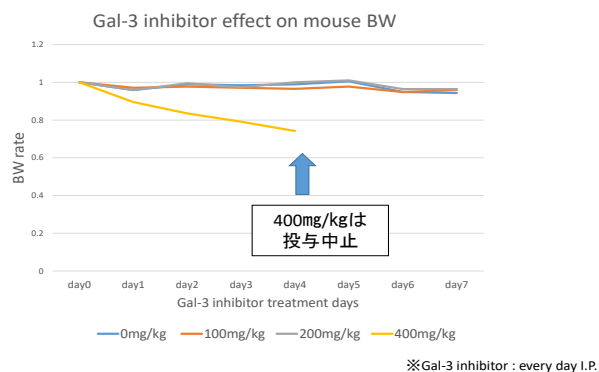


N=6
* P<0.05



一方で現時点では高い薬効濃度が必要であり (200mg/kg)、400mg/kg ではマウスの体重減少を伴うようになり、薬剤自体の細胞毒性と考えられた (図 5)。今後臨床応用を目指していくうえで、より低い濃度で効果が得られる高親和性の化合物が必要と考えられ、共同研究者の市川聡教授とともに、現在の薬剤をベースに、新規薬剤の再合成を行っている。

図 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----