

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390319

研究課題名(和文) S1P・ヒアルロン酸修飾リボソームを用いた難治性肝障害に対する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new reagent for liver diseases using S1P and hyaluronic acid

研究代表者

大河内 信弘 (OHKOHCHI, NOBUHIRO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：我々は血小板が肝再生促進効果及び細胞障害抑制効果を持ち、その作用がスフィンゴシン1リン酸(S1P)によることを報告してきた。本研究の目的はS1Pの肝に対する作用機序の解明と、選択的に肝臓に集積させるためにS1Pとヒアルロン酸を修飾したdrug delivery system(DDS)を開発することである。その結果、S1Pは肝類洞活性化作用と保護作用を有することを明らかにした。またS1Pとヒアルロン酸を直接結合させたDDS製剤を作成し肝虚血再灌流後の障害抑制効果をラットモデルで実証した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that platelets have ability of liver regeneration and liver protection. Sphingosine 1 phosphate (S1P) is the main component of this ability. In this study, we revealed that S1P directly activates liver sinusoidal endothelial cells. In addition, we generated new drug delivery system (DDS) using hyaluronic acid (HA) which is selectively incorporated into liver sinusoidal endothelial cells. The new reagent by adapting S1P and HA ameliorated rat ischemia-reperfusion injury of the liver.

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝再生 血小板 線維化抑制 肝硬変 S1P

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の原因疾患として最も多いのがC型肝炎である。現在170万人が慢性肝炎となっているが30~40%は肝硬変から肝細胞癌を発生する。我が国のHCVの特徴は抗ウイルス療法に反応しにくい1b型が大多数を占めることであり、線維化の進行と共に発癌の可能性が高まってくる。重度肝機能障害をもつ肝癌は肝移植以外に治療法はない。また、メタボリックシンドロームの一種である非アルコール性脂肪性肝疾患は全成人の15~30%が有する疾患であり、そのうち約10%は非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に進行する。NASHは肝臓への脂肪沈着に加えて壊死炎症性変化を示し、肝硬変から肝細胞癌を発生する。C型慢性肝炎、NASHともに肝再生、線維化改善ならびに肝発癌を抑制する治療法は皆無であり、その開発が社会的に強く求められている。

2. 研究の目的

我々は血小板が強力な肝再生促進効果、線維化抑制効果、及び細胞障害抑制効果を持つことを世界で初めて報告し、血小板輸血による難治性肝疾患治療の探索的臨床試験を開始した。また、血小板による肝病態制御の生理活性の本体が、血小板に含まれるスフィンゴシン1リン酸(S1P)による肝類洞内皮細胞の活性化であることを発見した。本研究の目的はS1Pの分子生物学的作用機序の解明と、選択的に肝臓に集積させるためにS1Pとヒアルロン酸を修飾したdrug delivery systemを開発することである。加えて、肝切除、虚血再灌流障害などの肝疾患モデルを用い新規薬剤であるS1P・ヒアルロン酸リポソームの病態制御効果を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

i) S1Pの不死化ヒト肝類洞内皮細胞に対する作用の検討

ヒト肝類洞内皮細胞株(TMNK1)に対してS1Pを添加して作用を検討する。主な検討項目は増殖作用とサイトカイン分泌作用である。さらに肝類洞内皮細胞の培養上清が肝細胞増殖に与える影響を検討する。

ii) マウス肝切除後肝再生の評価

ヒアルロン酸は肝類洞内皮細胞に選択的に取り込まれることからS1P封入りポソームにヒアルロン酸(HA)を修飾したDDSを用いて、マウス70%肝切除後のインターロイキン6(IL-6)の産生効果および再生促進効果を検討する。

iii) ラット肝虚血再灌流モデルにおけるS1P

の肝障害軽減作用の検討

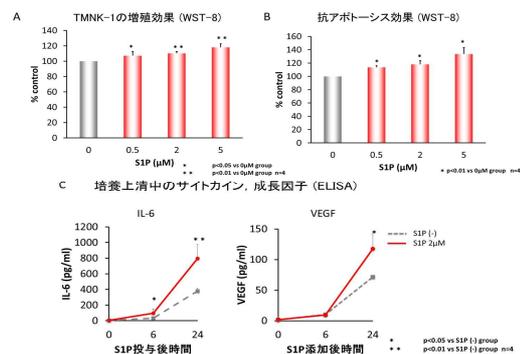
S1PとHAを直接結合したHA-S1Pによるラット虚血再灌流モデルでの障害抑制効果を検討する。

4. 研究成果

i) S1Pの不死化ヒト肝類洞内皮細胞株に対する作用の検討

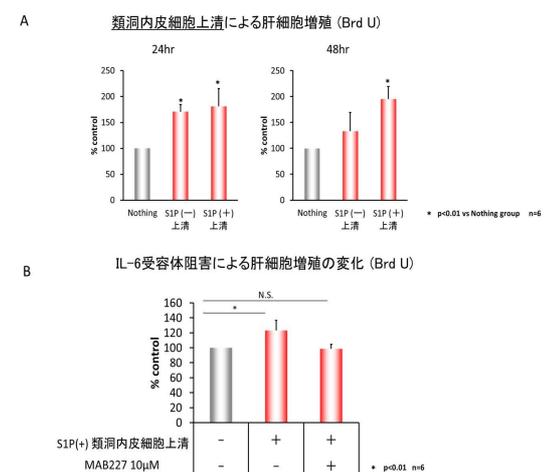
S1PはTMNK-1の増殖作用(図1A)、抗アポトーシス作用(図1B)を有し、S1P刺激によってIL-6やVEGFが産生された(図1C)。

図1 S1Pの類洞内皮細胞に対する作用



S1Pによって刺激された肝類洞内皮細胞は肝細胞のDNA合成を促進させた(図2A)。その効果はIL-6の阻害剤でキャンセルされた(図2B)。この結果からS1Pが肝類洞内皮を刺激してIL-6を分泌させ、肝細胞を増殖させると考えられた。

図2 S1Pによって刺激された肝類洞内皮細胞の肝細胞に対する作用



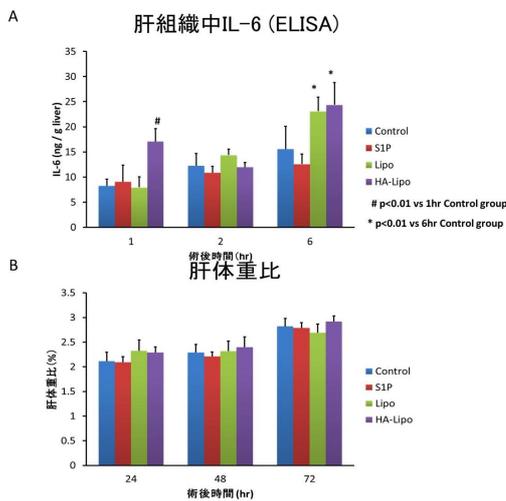
ii) マウス肝切除後肝再生の評価

ヒアルロン酸は肝類洞内皮細胞に選択的に取り込まれることからS1P封入りポソームにヒアルロン酸を修飾したDDSを生体内で検討

した。

マウス70%肝切除を以下の4群に施行し、肝組織中のIL-6の量、肝切除72時間までの肝体重比を以下の4群で比較した。Control群；肝切除のみ施行。S1P群；術前にS1P単独投与。Lipo群；術前にS1P搭載リポソーム投与。HA-Lipo群；術前にヒアルロン酸（HA）で修飾したS1P搭載リポソーム投与。肝切除6時間までの肝組織中IL-6を測定するとcontrol群と比較してLipoあるいはHA-Lipo群の肝組織中IL-6は有意に増加した（図3A）。しかし、肝体重比は術後72時間まで有意な変化はみられなかった（図3B）。

図3 S1Pによるマウス肝切除後の肝再生



Kupffer細胞除去モデルでは肝再生が遅延することが知られており、再生に対する肝類洞内皮細胞の効果がより鮮明になると考えられた。そこでKupffer細胞除去モデルで70%肝切除を施行し、S1Pを投与したが、明らかな投与効果を実証できなかった。

iii) ラット肝虚血再灌流モデルにおけるS1Pの肝障害軽減作用の検討

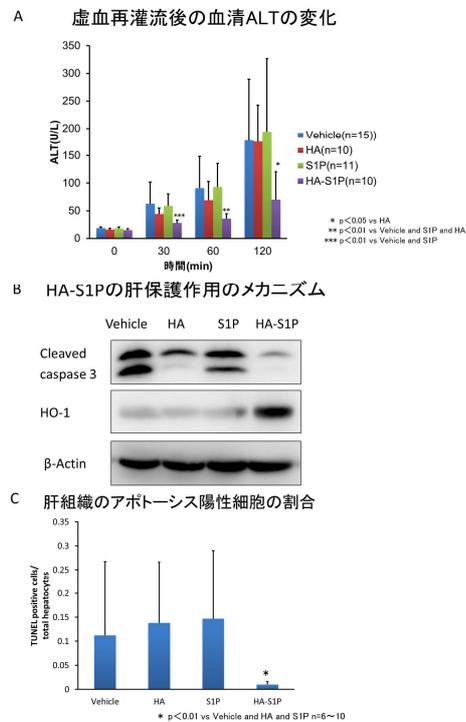
LiposomeにHAとS1Pを修飾させたHA-S1P-Liposome(iiのHA-Lipo群)では、Liposomeの電荷や分子量等の問題でHAのリガンド作用が不十分であった。そこで新たにHAに直接S1Pを修飾させたHA-S1Pを作成した。

図4 HA-S1Pの作成



ラット虚血再灌流モデルにS1Pを投与する実験を行った。ラットに20分間の全肝虚血を行い、その後再灌流を行い2時間までの肝臓の炎症の変化を検討した。Vehicle群；無治療。HA群；ヒアルロン酸のみ事前投与。S1P群；S1Pのみ事前投与。HA-S1P群；HA-S1Pを事前投与。他の3群と比較してHA-S1P群では有意に血清ALTが低下し、肝障害を抑制することに成功した(図5A)。そのメカニズムとして肝組織のcleaved caspase3の抑制とHO-1の活性化が考えられた(図5B)。また肝組織中のアポトーシス細胞をTUNEL染色法にて評価し定量化するとHA-S1P群で有意にアポトーシス陽性細胞の低下を認めた(図5C)。

図5 HA-S1Pの肝障害に対する効果



今後はHA-S1Pの肝線維化、肝細胞癌に対する影響などを検討し、画期的な肝疾患治療薬の開発に結び付けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Nowatari T, Murata S, Fukunaga K, Okhouchi N. Role of platelets in chronic liver disease and acute liver injury. Hepatol Res. 44(2):165-72.2

014 doi: 10.1111/hepr.12205.

Murata S, Maruyama T, Nowatari T, Takahashi K, Ohkohchi N. Signal transduction of platelet-induced liver regeneration and decrease of liver fibrosis. *Int J Mol Sci.* 28;15(4):5412-25.2014 doi: 10.3390/ijms15045412.

Tamura T, Kondo T, Ogawa K, Fukunaga K, Ohkohchi N. Protective effect of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia-reperfusion injury through inhibition of platelet adhesion to the sinusoids. *J Surg Res.* 180(1):62-72. 2013 doi: 10.1016/j.jss.2012.11.030.

Nozaki R, Murata S, Nowatari T, Maruyama T, Ikeda N, Kawasaki T, Fukunaga K, Ohkohchi N. Effects of thrombopoietin on growth of hepatocellular carcinoma: Is thrombopoietin the rapy for liver disease safe or not? *Hepatol Res.* 43(6):610-20.2013 doi: 10.1111/hepr.12006

Maruyama T, Murata S, Takahashi K, Tamura T, Nozaki R, Ikeda N, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Platelet transfusion improves liver function in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Tohoku J Exp Med.* 2013;229(3):213-20.

Takahashi K, Kozuma Y, Suzuki H, Tamura T, Maruyama T, Fukunaga K, Murata S, Ohkohchi N. Human platelets promote liver regeneration with Kupffer cells in SCID mice. *J Surg Res.* 180(1):62-72;2013. doi: 10.1016/j.jss.2012.11.030.

Nowatari T, Fukunaga K, Ohkohchi N. Regulation of signal transduction and role of platelets in liver regeneration. *Int J Hepatol.* 2012:542479. 2012 doi: 10.1155/2012/542479.

Ikeda N, Murata S, Maruyama T, Tamura T, Nozaki R, Kawasaki T, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Homma M, Ohkohchi N. Platelet-derived adenosine 5'-triphosphate suppresses activation of human hepatic stellate cell - in vitro study -. *Hepatol Res.* 42(1);91-102.2012

[学会発表](計5件)

野渡剛之, スフィンゴシン1リン酸はヒト肝星細胞の増殖・活性化を抑制する新しい肝線維化抑制療法の開発, 第114回日本外科学会定期学術集会, 2014

年4月4日, 国立京都国際会館, 京都
野渡剛之, 血小板による肝再生メカニズムの解明と新規肝再生治療の可能性, 第113回日本外科学会定期学術集会, 2013年4月11日, マリンメッセ福岡, 福岡
Murata S, Sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation with S1P, 17th International symposium on cells of the hepatic sinusoid, 2013年9月24日, 大阪国際会議場, 大阪
高橋一広, 血小板はKupffer細胞との相互作用により肝再生を促進する, 第112回日本外科学会定期学術集会, 2012年4月13日, 幕張メッセ, 千葉
池田直哉, 血小板による肝硬変に対する新規治療法の開発(血小板野持つ抗線維化メカニズムの解明), 第48回日本肝臓学会総会, 2012年6月7日, 石川県立音楽堂, 金沢

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計1件)

名称: スフィンゴシン1リン酸により修飾されたヒアルロン酸
発明者: 原島秀吉, 兵藤守, 鳥谷部尚之, 大河内信弘, 田村孝史, 佐野直樹
権利者: 北海道大学, 筑波大学
種類: 特許権
番号: 特願2014-043549
出願年月日: 2014年3月6日
国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 信弘 (OHKOHCHI NOBUHIRO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 40213673

(2) 研究分担者

福永 潔 (FUKUNAGA KIIYOSHI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20361339

田村 孝史 (TAMURA TAKAFUMI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：20633192

小林 昭彦 (KOBAYASHI AKIHIKO)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：10446552

(3)連携研究者

村田 聡一郎 (MURATA SOICHIRO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：40436275