

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年度 ～ 2012 年度

課題番号：23700560

研究課題名（和文） アポトーシス誘導因子を用いた肝硬変治療薬の開発

研究課題名（英文） Novel liver fibrosis treatment with nano-complexes of apoptosis inducing factor and gelatin derivatives

研究代表者 上杉 佳子（UESUGI YOSHIKO）

京都大学・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：30416416

研究成果の概要（和文）：肝硬変は、ウイルス性肝炎やアルコールおよび薬物による慢性肝障害が進行し、肝臓が線維化していくことによって、肝臓が硬く変化して肝機能が減衰する疾患である。不可逆的な疾患であるため治療薬がなく、肝移植以外に根治を望めないというのが現状である。そのため、安全性が高く、効果的な肝炎および肝硬変の治療薬が望まれている。そこで本研究では、肝臓の線維化のメカニズムに着目し、アポトーシスを利用して肝硬変で中枢的役割を担う活性化した肝星細胞を死滅させることにより、肝硬変の治療薬を創製することを目的とした。具体的には、アポトーシスの誘導因子である TRAIL（tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand）と、ゼラチン誘導体を利用したナノ DDS 技術を組み合わせて、肝硬変の治療を目的としたナノ DDS の開発を行った。

研究成果の概要（英文）： The cirrhosis is a chronic disease that is caused by hepatic damages with virus infection, alcohol, and drug, is leading causes of hepatic fibrosis and deterioration of liver functions. However, there are no available treatments despite the implantation of the liver. This study is undertaken to prepare a novel cirrhosis treatment system with nano-complexes of apoptosis inducing factor (TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) and gelatin derivatives which targeting hepatic stellate cells based on the mechanism of cirrhosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体医工学・生体材料学

キーワード：ナノドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

国内の肝硬変患者は 40 万人とされるが、肝硬変の治療法は肝移植しかなく対処療法のみという現状である。肝硬変は、ウイルス性肝炎やアルコールおよび薬物による慢性肝障害が進行し、肝臓が線維化して

いくことによって、肝臓が硬く変化して肝機能が減衰する疾患である。不可逆的な疾患であるため治療薬がなく、肝移植以外に根治を望めないというのが現状である。これまで、ウイルス性肝炎にはインターフェロンやラミブジン等の抗ウイルス剤が用

いられてきたが、溶血性貧血や抑うつ等の重篤な副作用や、耐性菌の出現に伴う肝炎の増悪という問題がある。また、自己免疫性肝炎にはステロイド等の免疫抑制剤が用いられてきたが、免疫の低下によって感染症を引き起こすという問題がある。そのため、安全性が高く、効果的な肝炎および肝硬変の治療薬が望まれている。

そこで本研究では、肝臓の線維化のメカニズムに着目し、アポトーシスを利用して肝硬変で中枢的役割を担う活性化した肝星細胞を死滅させることにより、肝硬変の治療薬を創製することを目的とした。従来の研究から、肝臓の線維化は肝星細胞が活性化することによって引き起こされることが知られている[1]。アポトーシスは、生体内で細胞自らが積極的に引き起こすプログラム細胞死であり、炎症を伴わない。これまでの研究で、アポトーシスの主要な誘導因子である TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) タンパク質 (図 1) の受容体が、活性化した肝星細胞、肝硬変の細胞ならびに肝癌細胞に特異的に発現していることが報告されている[2]。

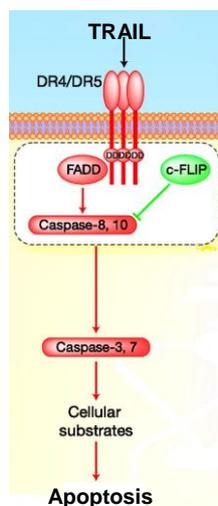


図 1. TRAIL シグナルによるアポトーシス

TRAIL 受容体は正常な肝細胞には発現しておらず、TRAIL は正常な肝細胞の生存に影響を与えない[3] ことから、活性化した肝星細胞および肝硬変の細胞のみを細胞死させることができる。TRAIL タンパク質は、現在 Amgen と Roche により癌治療薬 (Dulanermin®) として臨床評価されており、注目されるタンパクであるが、血中半減期が非常に短いという欠点がある。

われわれはこれまでに、臨床応用可能な

ゼラチンによる薬剤修飾と超音波による物理刺激とを組み合わせ、薬剤の安定性を高めながら、必要時に必要な場所で薬剤活性を発揮できる新規なナノサイズの薬剤送達システム (DDS) を開発している[4, 5]。このような経緯から、本研究では、アポトーシスの誘導因子である TRAIL と、ゼラチン誘導体を利用したナノ DDS 技術を組み合わせ、肝硬変の治療を目的としたナノ DDS の開発を行った。さらに、活性化した肝星細胞に対する本ナノ DDS の標的指向性を高めるために、肝硬変発症時に肝星細胞で高発現しているインテグリンあるいはマンノース 6 リン酸/インスリン様成長因子 II レセプターに対するリガンド分子 cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) [6]またはマンノース 6 リン酸[7]を本ナノ DDS に修飾を試みた。

1. Mann *et al.* *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 497-512 (2009)
2. Herr *et al.* *Hepatology* 46, 266-274 (2007)
3. Askenazi *et al.* *J.Clin. Invest.* 104, 155-162 (1999)
4. Uesugi *et al.* *J. Control. Release* 147, 269-277 (2010)
5. Uesugi *et al.* *J. Drug Target.* 20, 224-234 (2012)
6. Beljaars *et al.* *J. Biol. Chem.* 275, 12743-12751 (2000)
7. Wang *et al.* *World J.Gastroenterol.* 28, 1303-1307 (2006)

2. 研究の目的

本研究では、肝移植以外に根治を望めない肝硬変の治療薬を開発するために、肝臓の線維化メカニズムに着目し、原因となる細胞をアポトーシスで死滅させることで、肝炎および肝硬変の治療効果を狙った。アポトーシス誘導因子と生体材料とを組み合わせたナノドラッグデリバリーシステム (DDS) により、安全で効果的な新規な肝硬変治療薬を開発することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス誘導因子 TRAIL タンパク質を用いたナノ DDS の作製

ゼラチン (等電点 9、分子量 10 万) に、活性化した肝星細胞への標的分子であるマンノース 6 リン酸または cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) の化学導入を行った。化学導入の方法は、過去の論文[Ye *et al.* *Biochemistry* 44, 4466-4476 (2005), Beljaars *et al.* *J. Biol. Chem.* 275, 12743-12751 (2000)] を参考に行った。

次に、標的分子導入ゼラチンとアポト-

シス誘導因子 TRAIL タンパク質ならびに酢酸亜鉛とを様々な濃度で混合し、コンプレックスを作製する条件を検討した。

(2) ナノ DDS の物理化学的性質 (アフィニティクロマトグラフィ、表面電位、粒子径等) の解析

上述で得られたコンプレックスの結合性はアフィニティクロマトグラフィ、表面電位は電気泳動光散乱光度計、粒子径は動的光散乱法で測定した。コンプレックスに含まれる亜鉛の濃度は、原子吸光光度計で測定した。

(3) 活性化した肝星細胞に対するナノ DDS の標的指向性の評価

ヒト肝癌細胞 (HepG2) および活性化した肝星細胞 (LI90) にナノ DDS を添加後の、アポトーシス誘導能を評価する。対照実験として、マウス線維芽細胞 (L929) を用いて同様の評価を行った。アポトーシス誘導能の評価は、蛍光標識化アネキシン V を用いた蛍光観察および FACS 解析と、プロピウムアイオライド染色により行った。また、TRAIL のシグナルによってアポトーシスを誘起した細胞はカスパーゼ 3、8 の活性が高まるので、カスパーゼ 3、8 の活性をそれぞれの蛍光基質を用いて測定した。

(4) 肝硬変モデルマウスを用いた治療効果の評価

- ① 四塩化炭素またはコンカナバリン A を、マウス腹腔内に週 1 回または 2 回ずつ 4 または 6 週間投与して肝硬変モデルマウスを作製した。
- ② ナノ DDS、TRAIL のみ、または PBS のみを静脈投与し、一定期間後に肝臓を取り出して固定、包埋、切片作製を行った。
- ③ 切片を α -SMA (α -smooth muscle actin) に対する抗体、抗 TRAIL 抗体で免疫染色し、組織の形態観察および線維性コラーゲン量の評価を行った。

4. 研究成果

まず、活性化した肝星細胞に対する本ナノ DDS の標的指向性を高めるために、ゼラチンに標的分子である cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) を化学導入した。ヒト肝癌細胞 (HepG2)、肝星細胞 (LI90) およびマウス線維芽細胞 (L929) に様々な濃度の TRAIL を添加後、アポトーシス誘導の評価を行った。アポトーシス誘導の評価は、蛍光標識化アネキシン V およびプロピウムアイオライドを用いた FACS 解析と、カスパーゼ 3、8 の活性をそれぞれの蛍光基質を用いて測定した。また、マウスに四塩

化

炭素/オリーブオイルを腹腔内に週 3 回ずつ 2 または 4 週間投与して、肝硬変モデルマウスを作製した。肝臓を摘出後、ホルマリン固定、パラフィン包埋、切片作製を行い、マッソン・トリクローム染色、 α -SMA での免疫染色および HE 染色を行い、組織の形態観察および線維性コラーゲン量の評価を行った。

本年度は、TRAIL とゼラチン誘導体からなるナノ DDS に活性化した肝星細胞に対する標的指向性を与えるために、ゼラチンに標的分子である cyclic Arg-Gly-Asp (RGD) を様々な割合で化学導入した。これらの cyclic-RGD 導入ゼラチンと TRAIL に様々な濃度の酢酸亜鉛溶液を混合し、コンプレックスの作製条件を検討した。作製したコンプレックスの表面電位は電気泳動光散乱光度計、粒子径は動的光散乱法で測定を行った。次に、ヒト肝癌細胞 (HepG2) と肝星細胞 (LI90) を用いて、アポトーシス誘導に効果のある濃度の評価を、蛍光標識化アネキシン V およびプロピウムアイオライドを用いた FACS 解析で行った。また、カスパーゼ 3、8 の活性はそれぞれの蛍光基質を

用いて測定した。肝硬変モデルマウスの作製は、マウスに四塩化炭素/オリーブオイルを腹腔内に週 3 回ずつ 4 週間投与して行った。薬剤投与後の肝臓の評価は、肝臓摘出後、切片作製を行い、マッソン・トリクローム染色での免疫染色および HE 染色を行い、組織の形態観察および線維性コラーゲン量の評価を行った。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

上杉 佳子 (UESUGI YOSHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・特定研究員
研究者番号：30416416

(2)(3)研究分担者、連携研究者 該当なし