

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460992

研究課題名(和文) クッパー細胞を標的としたドラッグデリバリーシステムを用いたNASH治療法の開発

研究課題名(英文) Macrophage specific delivery of TNF- $\alpha$  inhibits NASH liver injury.

研究代表者

高原 照美 (Takahara, Terumi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：60240777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)はメタボリック症候群を背景として近年増加傾向である。NASHの進展機序として肝臓の壊死・炎症を引き起こすマクロファージの活性化が重要である。本研究ではマクロファージを標的としたドラッグデリバリーシステムを用いてNASHの新規治療法を考案した。NASHマウスモデルに、シゾフィラン(SPG)とTNF- $\alpha$  siRNAを結合したSPG-TNF $\alpha$ を投与したところ、肝組織の壊死・炎症、線維化、酸化ストレス、アポトーシスが改善された。また活性化したマクロファージの減少を認め炎症性サイトカインの産生も抑制された。マクロファージを標的としたNASH治療法の有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：Macrophages play important roles in liver injury and fibrosis during the progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). In this study we try to establish effective delivery system into macrophages, and elucidate whether TNF- $\alpha$  siRNA complexed with schizophyllan (TNF- $\alpha$ -SPG) inhibit liver inflammation and fibrosis in murine NASH models. We confirmed siRNA complexed with SPG can be specifically delivered into macrophage. In addition, TNF- $\alpha$ -SPG successfully ameliorate inflammation, fibrosis, apoptosis, and ROS production in murine NASH model. Our result demonstrated a possible new therapeutic approach on macrophages by administration of siRNA-SPG for treatment of NASH.

研究分野：消化器病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 マクロファージ ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎(以下NASH)はメタボリック症候群の肝臓表現型とされているが、肝硬変や肝臓癌へ進展する疾患である。近年NASHの患者数は増加傾向にあり、今後重要な健康問題となると予想されるが、いまだ有効な治療法は少ない。NASH発症メカニズムとしてTwo hits theoryが広く浸透しているが、これによると、まず栄養過多により脂肪肝が生じ、肝細胞での貯蔵限界を超えると酸化ストレスが生み出され、それが肝細胞障害を引き起こし、NASHに進展するという説である。しかし、Two hits theoryのみではNASHの持続炎症や線維化、その後の肝発癌の発症機序まで説明できない。

2. 研究の目的

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発症機序として、肝マクロファージ(クッパー細胞)の活性化が重要であり、Toll様受容体シグナルや炎症反応を誘導する蛋白質複合体シグナル(インフラマソーム)の経路が注目されている。本研究では、クッパー細胞を標的としたドラッグデリバリー技術をsiRNA医薬に応用することで、NASH発症におけるクッパー細胞活性化の分子機構を解析すること、ドラッグデリバリー技術と特異的核酸医薬を用いたNASHの新規治療法を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

研究1年目:

- (1)クッパー細胞特異的なDDS化siRNA作成  
Beta-Dグルカン(schizophyllan (SPG))と一本鎖核酸の複合(核酸-SPG複合体)を作成し、一本鎖核酸の末端にsiRNAをホスホジエステル結合で連結(包摂)して、機能性核酸キャリア(DDS化siRNA)を作成する。  
siRNAとしてNLRP-3, IL-1b, MyD88, TNF-a, MCP-1, IL-6を用い、各種デザインして連結する。
- (2)NASHモデルの作成と組織学的解析・インフラマソーム活性化の検討  
NASHモデルは、コリン欠乏食マウス(CDAA食)(対照は非コリン欠乏食)とメチオニン・コリン欠乏高脂肪食モデル(MCD-HF食)の2種類を用いる。いずれも脂肪肝を背景にNASHを発症するモデルである。  
病理学的検討として、HE染色のほか脂肪化(Oil Red O, TBARS)、マクロファージの浸潤(F4/80, Ly6C, CCR2)、線維化(Sirius-red染色, aSMA)を解析する。さらに遺伝子発現としてサイトカイン・ケモカイン(TNF-a, IL-1b, MCP-1, CCR2)、線維化関連遺伝子(Col1a1(I), TGF-b, TIMP-1)を検討する。  
インフラマソーム活性化は、NLRP3, NLRP1, ASC, AIMS, Caspase-1をWestern

blotで発現を検討する。またこれら因子は遺伝子発現を検討する。

(3)NASHモデル由来クッパー細胞の採取とインフラマソーム活性化の検討

NASHモデル肝からF4/80 MACSを用いてクッパー細胞を採取する。  
クッパー細胞のインフラマソーム活性化をWestern blotで発現を検討する。またこれら因子の他、MCP-1, TNF-a, TLR4, TLR-9, MyD88遺伝子発現を検討する。  
活性化誘導分子を解明する目的で、クッパー細胞培養上清にパルミチン酸、ATP, セラミド、グルコース等を添加し、IL-1b産生をELISAで検討する。

(4)siRNA-SPG複合体を用いたクッパー細胞ノックダウンの検討

NLRP-3, IL-1b, MyD88, TNF-a, MCP-1, siRNAを連結した核酸-SPG複合体を、予備実験として、LPSで活性化したマウスマクロファージ細胞株(Raw 264.7cell)で各種の遺伝子発現、蛋白発現を確認し、ノックダウン効率から、有効な濃度の決定を行いsiRNA配列の適格化を行う。  
NASH肝から得たクッパー細胞にDDS化siRNAを処理し、TNF-a, IL-1b, MCP-1産生能をELISA、遺伝子発現で解析し、薬理効果を比較検討する。

研究2, 3年目

siRNA-SPG複合体を投与したNASHモデルの解析

- (1)上記2つのNASHモデルに、適格化したNLRP-3, IL-1b, MyD88, TNF-a, MCP-1 siRNAを連結した核酸-SPG複合体を投与する。NASHモデル(対照群を含む)は、12週目から1日毎に2 microgram/head/each、計8回(総量16 microgram)尾静脈から全身投与を行う。
  - (2)病理学的検討として、HE染色のほか脂肪化(Oil Red O, TBARS)、マクロファージの浸潤(F4/80, Ly6C, CCR2)、線維化(Sirius-red, aSMA)を解析する。
  - (3)遺伝子発現としてサイトカイン・ケモカイン(TNF-a, IL-1b, MCP-1, CCR-2)、線維化関連遺伝子(Col1a1(I), TGF-b, TIMP-1)を検討する。
  - (4)インフラマソーム活性化の確認は、NLRP3, Caspase-1をWestern blotおよびqRT-PCRで発現を検討する。  
上記を通じて、NASH治療に最も有効なsiRNAを検討しターゲット分子を同定し治療法を確立する。  
治療レジメンを意識しながら医薬粒子の最適化を繰り返し行い、Chemistry, Manufacturing and Control (CMC)研究へ橋渡しする。
4. 研究成果
- (1)コリン欠乏食投与NASHモデルを作成  
NASHモデルを作成して、組織学的解析、およびクッパー細胞活性化に関連する分

子の発現を解析した。TNF-a, IL-1b, IL-6, MCP-1, 線維化関連遺伝子 (Col1(I), TGF-b, TIMP-1) および NLRP3の遺伝子発現の亢進を確認した。

- (2) NASHモデルマウスからクッパー細胞を採取して、TNF-a, IL-1b, MCP-1, TLR3, TLR4, NLRP3の発現亢進を確認した。次に、これらのsiRNAを数種類ずつデザインし、siRNAによるノックダウンを確認した。いずれのsiRNAも特異的に遺伝子発現を抑制する。
- (3) クッパー細胞特異的なDDS化siRNA作成  
Beta-D グルカン (schizophyllan (SPG)) と一本鎖核酸の複合 (核酸-SPG 複合体) を作成し、一本鎖核酸の末端に siRNA をホスホジエステル結合で連結 (包埋) して、機能性核酸キャリア (DDS化 siRNA) を作成した。今回は費用と時間の関係で TNF-a のみ作成した。
- (4) Dectin-1 の発現の解析  
Beta-D グルカンの特異的受容体である dectin-1 の発現を免疫組織学的に解析した。正常マウス肝臓では、dectin-1 はほとんど発現を認めない。しかし、NASHモデル肝臓では、dectin-1 の発現は肝臓内に散在して認めた。蛍光2重染色を行ったところ F4/80 陽性細胞とほぼ局在は一致した。さらに NASH 肝進展に關与する macrophage inducible C-type lectin (Mincle) も dectin-1 との強発現が観察された。Dectin-1 は正常肝で波発現しないが NASH で発現増加し、マクロファージ活性化部位であることが確認された。
- (5) NASHモデルにTNFa-SPGを投与した肝組織像  
CDAA 投与によるNASHモデルを作成して、12週~16週間の間、週2回TNFa-SPGを尾静脈から投与した。対象ではcontrol siRNA-SPGを投与した。16週目、20週目に肝臓を摘出して組織学的、生化学的に検討した。  
AST, ALTは16週、20週も共にTNFa-SPG 投与群で優位に低下した。組織学的検討では、実験群で肝内小壊死巣が減少していた。またsirius red染色で、肝線維化を画像解析すると、対照群に比べ実験群で線維化は改善していた。また活性化肝星細胞のマーカーとしてaSMA の免疫染色をおこなうと、実験群で優位に陽性細胞数の減少が見られた。次に免疫染色で、F4/80, Mincle, M1マクロファージマーカーとしてCD11cを検討したところ、いずれも実験群で陽性細胞の低下を認めた。さらに肝内の活性酸素を検討する目的で4-HNE 陽性細胞を染色すると、実験群で明らかに陽性細胞の低下を認めた。TUNEL 染色でも実験群で陽性細胞は優位に低下した。
- (6) NASHモデルによるTNFa-SPGを投与した

#### 肝臓の遺伝子発現解析

肝臓を採取して、各種の遺伝子発現を解析した。炎症性サイトカインとしてTNFaの抑制とともに、IL1b, TGFb, MCP-1もいずれも実験群で減少した。又線維化関連として、として、ACTA2, Desmin, lysyl oxidaseも低下していた。

- (7) メチオニン・コリン欠乏食によるNASH肝障害モデルでの検討

CDAAモデルと同様にMCD-HF食を投与するモデルを作成した。本モデルでは8週間MCD-HF食を投与するNASHモデルであるが、TNFa-SPGを2-4週目に週2回投与し、4週目、8週目の肝臓を摘出した。CDAA食と同様の検討を行い、同様に実験群で肝障害の軽減を認めた。ただし線維化は進行して織らず線維化には有意差を認めなかった。

#### 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12件)

- Cai S, Hou J, Fujino M, Zhang Q, et al. iPSC-Derived Regulatory Dendritic Cells Inhibit Allograft Rejection by Generating Alloantigen-Specific Regulatory T Cells. *Stem Cell Reports*. 2017;8(5):1174-1189. 査読あり  
doi: 10.1016/j.stemcr.2017.03.020.
- Abe T, Yazawa K, Fujino M, et al. High-pressure carbon monoxide preserves rat kidney grafts from apoptosis and inflammation. *Lab Invest*. 2017;97(4):468-477. 査読あり  
doi: 10.1038/labinvest.2016.157.
- Li S, Takahara T, Li XK, et al. 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron ameliorate ischemia-reperfusion injury in the mouse fatty liver model. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;470(4):900-6. 査読あり  
doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.136.
- Tajiri K, Baba H, Kawai K, Minemura M, Yasumura S, Takahara T, Sugiyama T. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts recurrence after radiofrequency ablation in hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(7):1291-9. 査読あり  
doi: 10.1111/jgh.13287.
- Zhao M, Zhu P, Fujino M, et al. 5-Aminolevulinic acid with sodium ferrous citrate induces autophagy and protects cardiomyocytes from hypoxia-induced cellular injury through MAPK-Nrf-2-HO-1 signaling cascade. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(4):663-669. 査読あり

doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.156.  
Fujino M, Zhu P, Cai S, et al.  
MicroRNAs Involved in Acute Rejection  
and Tolerance in Murine Cardiac  
Allografts. *Exp Clin Transplant.*  
2016;14(4):424-30. 査読あり  
doi: 10.6002/ect.2015.0251.  
Cai S, Ichimaru N, Zhao M, et al.  
Prolonged Mouse Cardiac Graft Cold  
Storage via Attenuating  
Ischemia-Reperfusion Injury Using a  
New Antioxidant-Based Preservation  
Solution. *Transplantation.*  
2016;100(5):1032-40. 査読あり  
doi: 10.1097/TP.0000000000001079.  
Li JN, Li JX, Huang HL, et al.  
Influence of sirolimus-induced TGF-  
secretion on mouse Treg cell  
proliferation. *Genet Mol Res.*  
2015;14(4):18569-79. 査読あり  
doi: 10.4238/2015.December.28.4.  
Hou J, Fujino M, Cai S, Ding Q, Li XK.  
Noninvasive Monitoring and Evaluation  
of the Renal Structure and Function in  
a Mouse Model of Unilateral Ureteral  
Occlusion Using Microcomputed  
Tomography. *Int Surg.*  
2015;100(7-8):1237-43. 査読あり  
doi: 10.9738/INTSURG-D  
Zhao M, Chen J, Zhu P, Fujino M, et al.  
Dihydroquercetin (DHQ) ameliorated  
concanavalin A-induced mouse  
experimental fulminant hepatitis and  
enhanced HO-1 expression through  
MAPK/Nrf2 antioxidant pathway in RAW  
cells. *Int Immunopharmacol.*  
2015;28(2):938-44. 査読あり  
doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.032.  
Zhang Q, Ichimaru N, Higuchi S, et al.  
Permanent acceptance of mouse cardiac  
allografts with CD40 siRNA to induce  
regulatory myeloid cells by use of a  
novel polysaccharide siRNA delivery  
system. *Gene Ther.* 2015;22(3):217-26.  
査読あり  
doi: 10.1038/gt.2014.119.  
Zhao M, Guo H, Chen J, et al.  
5-aminolevulinic acid combined with  
sodium ferrous citrate ameliorates  
H2O2-induced cardiomyocyte  
hypertrophy via activation of the  
MAPK/Nrf2/HO-1 pathway. *Am J Physiol  
Cell Physiol.* 2015;308(8):C665-72. 査  
読あり  
doi: 10.1152/ajpcell.00369.2014.

[学会発表](計10件)

高原照美、李少偉、李小康。マクロファ  
ージ特異的ドラッグデリバリー - システム  
を用いた NASH 治療の試み。第 53 回日本

肝臓学会総会 2017/06/08-09 広島  
Li S, Takahara T, Fujino M, Higuchi S,  
Ando H, Li XL. Macrophage specific  
delivery of TNF- $\alpha$  siRNA complexed with  
schizophyllan inhibits fatty-induced  
inflammation and fibrosis in a murine  
NASH model. 第 30 回肝臓細胞研究会  
2016/11/25-26, 富山  
Li S, Takahara T, Fujino M, Liu C, Li  
XK. Efficacies of astaxanthin  
treatment on ischemia-reperfusion  
injury in fatty liver model of mice. 第  
52 回日本肝臓学会総会 2016/05/19-20,  
千葉  
SW Li, T Takahara, M Fujino, K Tsukada,  
C Liu, XK Li. Effects of astaxanthin  
pretreatment on ischemia-reperfusion  
injury in fatty liver model of mice. 第  
29 回肝臓細胞研究会  
2015/10/31-01, 秋田  
高原照美、李少偉、河合健吾、杉山敏郎、  
塚田一博、李小康。水素水は NASH 肝障害  
を軽減する。第 47 回日本臨床分子携帯学  
会総会 2015/09/18-19, 長崎  
李少偉、高原照美、河合健吾、杉山敏郎、  
塚田一博、田中徹、李小康。5-アミノレ  
ブリン酸は一酸化炭素を誘導して NASH  
モデルの虚血再灌流障害を軽減する。第  
51 回日本肝臓学会総会 2015/05/21-22、  
熊本  
高原照美、李少偉、河合健吾、杉山敏郎、  
塚田一博、李小康。NASH 肝障害における  
水素水投与の有効性とその機序。第 51  
回日本肝臓学会総会 2015/05/21-22、  
熊本  
李少偉、高原照美、杉山敏郎、塚田一博、  
田中徹、李小康。5-アミノレブリン酸は  
一酸化炭素を誘導して NASH モデルの虚  
血再灌流障害を軽減する。第 28 回肝臓  
細胞研究会 2014/12/13-14, 岡山  
高原照美、河合健吾、羅小雨、李少偉、  
他。Metron factor-1 トランスジェニック  
マウスにおける肝組織修復作用の検討。  
第 50 回日本肝臓学会総会  
2014/05/29-30, 東京  
S Li, T Takahara, T Sugiyama, K Tsukada,  
T Tanaka, XK Li. 5-Aminolevulinic acid  
combined with ferrous iron ameliorate  
ischemia-reperfusion injury in the  
mouse fatty liver model by inducing  
carbon monoxide generation. *American  
Association for the Study of Liver  
Disease* 2014. 2014/11/09-11, Boston,  
USA

[図書](計2件)

高原照美、「肝線維化の機序」、南江堂、  
肝臓専門医テキスト、2016, p75 - 77,  
高原照美、「妊娠と肝障害」、朝倉書店、内

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高原 照美 (TAKAHARA, terumi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・

准教授

研究者番号: 60240777

### (2) 研究分担者

梨井 康 (LI, xiao kan)

国立成育医療研究センター・移植免疫研究

室・室長

研究者番号: 60321890