

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08013

研究課題名（和文）Drug RepositioningとLeaky Gut制御による新規肝硬変治療

研究課題名（英文）Novel Liver Cirrhosis Treatment by Drug Repositioning and Leaky Gut Control

研究代表者

吉治 仁志 (Yoshiji, Hitoshi)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40336855

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）：今回の研究期間において当初の目的であった2つのテーマについてそれぞれ目標をほぼ達成できた。Enhanced Drug-Repositioning デリバリーシステムの開発においては、HAコーティングミセルは、肝線維症におけるドラッグデリバリーベークルとして有望な候補であることが明らかとなり臨床応用の可能性が示された。さらに、Leaky gut の Dual cascade blockとして既に臨床で使用されている薬剤を用いてLeaky gutの制御が肝線維化を含めた肝病態改善に寄与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からHAコーティングミセルは、肝線維症におけるドラッグデリバリーベークルとして有望な候補であることが明らかとなり臨床応用の可能性が示された。さらに、Leaky gut の Dual cascade blockとして肝に流入した内因性エンドトキシン活性化シグナルを阻害することにより肝硬変の病態進行を抑制するために既に臨床で使用されている薬剤質有効であることを見いだした。これらの成果により臨床応用を見据えたDrug Repositioningによる新規治療法基礎的データが得られた。

研究成果の概要（英文）：In the development of the Enhanced Drug-Repositioning Delivery System, HA-coated micelles were found to be a promising candidate as a drug delivery vehicle in liver fibrosis, indicating the potential for clinical application. In the development of the Enhanced Drug-Repositioning Delivery System, HA-coated micelles were found to be a promising candidate as a drug delivery vehicle in liver fibrosis, indicating their potential for clinical application. Furthermore, we demonstrated that the control of leaky gut contributes to the improvement of liver pathology, including liver fibrosis, by using a drug that is already in clinical use as a dual cascade blocker of leaky gut.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝線維化 ヒアルロン酸ミセル Leaky Gut エンドトキシン

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患の終末像である肝硬変患者では抗ウイルス薬の開発などにより予後は改善されつつあるものの、各種合併症を有する非代償性肝硬変患者の予後は依然として不良である。肝硬変が可逆性であることが明らかとなり、国内外で肝線維化抑制を目的とした治療開発が精力的に行われているが実用化には多くの課題が残されている。非代償性肝硬変の本質となる肝性脳症や門脈圧亢進症、サルコペニアといった主な症状の顕在化を予防し、肝硬変の予後向上を目指すための病態制御を見据えた標的を確立することが今後の臨床において重要である。肝硬変患者では腸内細菌叢のインバランス(Dysbiosis)に伴い、炎症性サイトカイン産生や胆汁酸代謝異常を介して腸管上皮細胞間の tight junction (TJ)の機能が破綻するいわゆる Leaky gut の状態になっていることが知られており、腸内細菌由来のエンドトキシン(EX)の門脈への流入が亢進した結果、炎症や線維化が進展する機構が報告されている。Leaky gut、即ち Gut-Liver axis の制御はあらゆる背景の肝硬変においてその病態進展に加え、各合併症の増悪予防にもつながり、予後改善が強く期待できるものの未だ臨床応用はされていない。肝線維化抑制薬は世界中で精力的に研究、開発が行われているが残念ながら臨床で認可された薬物はないのが現状である。申請者は降圧薬として広く用いられているアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の肝線維化抑制作用を示し、世界中で基礎、臨床両面で追試が行われ有効性が確認されていた。しかし一方で、ARB 単独投与では線維化の進展した患者では線維化抑制効果は限定されることが臨床的に報告され、抗線維化効果を増強させるアプローチによる新規治療法の開発が必要である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の点を中心に研究を遂行した。

- ・ Enhanced Drug-Repositioning として ARB のヒアルロン酸ミセルを用いた選択的デリバリーシステムを開発し、治療効果を高めて早期に臨床に還元し得る新規治療法の開発を目指す。
- ・ Leaky gut の Dual cascade block として EX の門脈への流入を抑制すると共に、肝に流入した EX 活性化シグナルを阻害することにより肝硬変の病態進行を抑制する。

3. 研究の方法

本研究では大きく 2 つのアプローチをそれぞれ並行して研究を進めつつ、最終年度において両アプローチを合体させて、最も有効で効率的な肝線維化進展抑制を含めた肝硬変病態改善のための治療開発を目指した。初年度は通常の ARB 処理に比してミセル化により細胞増殖、肝線維化関連遺伝子発現、シグナル伝達などを比較して HSC 活性化、遺伝子発現抑制作用などを詳細に検討した。さらに、申請者らがこれまで抗線維化作用を報告してきた DPP-IV 阻害薬など ARB 以外の他の薬剤についてもミセル化して同様の検討を行った。2022 年度以降では、ミセル化により HSC 抑制効果が増強される事が確認された薬剤を用いて生体における検討を行うなどした。さらに、ミセル化によって最も強い肝線維化進展および肝硬変合併症抑制作用が認められた薬剤と TJ 改善などを介して Dual cascade block に最も有効であった薬剤の 2 剤あるいは 3 剤以上の併用投与による効果を確認して臨床展開へのデータを得た。

4. 研究成果

申請項目においてそれぞれ当初の目標に近い成果を獲得できた。

ヒアルロン酸ミセルを用いたドラッグデリバリーシステムの構築に関しては、ARB を内包した粒子径が 60nm で正の表面荷電を有したミセルを作成した。また ARB を内包して検討した結

果、粒子径の変化は見られず、薬物の内包効率は約80%に達していることを確認した。ヒアルロン酸ミセルを蛍光ラベルして臓器集積性を確認したところ、被覆ミセルは単体のミセルに比べて肝臓への集積が高いことが確認できた。さらに、フローサイトメトリーでヒト活性化肝星細胞を用いて選択的な取り込みを確認したところ、ヒアルロン酸ミセル化したものは選択的に活性化肝星細胞に取り込まれており、機序として取り込まれる際にヒアルロン酸ミセルが外れてARBがより効率的に細胞内に集積していることを蛍光顕微鏡で確認した。オルメサルタンメドキシミル(OLM)を内包したHAコーティングミセルを調製しOLMを内包したHAコートミセルを投与したところ、肝硬変モデルマウスに対して顕著な抗線維化効果を示した。HAコーティングミセルは、肝線維症におけるドラッグデリバリーベークルとして有望な候補であることが明らかとなり臨床応用の可能性が示された。

Leaky gutのDual cascade blockとして肝に流入したEX活性化シグナルを阻害することにより肝硬変の病態進行を抑制する目的として既に臨床で使用されている薬剤の中で腸管バリア機能改善効果を示す複数の薬剤(リファキシミン、ルピプロストンなど)を用いて、Leaky gutの制御が肝線維化を含めた肝病態改善に寄与するかどうかを検証したところ、各単剤投与でMφ活性化や肝線維化の改善を認め、併用により改善効果はより顕著であった。また腸管透過性の評価では、両薬剤ともにZO-1、Claudin1といったTJPの発現を改善させるとともに、FITC-dextranで示される腸管透過性の亢進が有意に抑制されており、併用群でさらに効果は増強された。LubiprostoneとRifaximinはTJPの修復を介して腸管バリア機能、並びにNASH肝線維化を抑制する可能性が示唆された。この結果より既存薬を用いた新規治療法の可能性が示された。

さらに、Rifaximin(RFX)やL-carnitine(L-CAR)を併用することで、肝線維化進展に加えて肝硬変に伴う骨格筋萎縮への予防効果を強化し得るかについて検討した。その結果、CTで評価したPMI値は、実験終了時においてRFX、L-CARの単剤投与によりその低下が抑制されていた。また、この抑制効果は両剤を併用投与することでより顕著となった。さらに腓腹筋組織を用いて骨格筋の短径および密度について病理学的に評価したところ、PMI同様、両剤投与により骨格筋萎縮の改善効果を認めた。腓腹筋組織におけるミトコンドリア生合成能について、PGC-1 α 、TfamのmRNA発現がL-CAR投与により有意な改善を認めた。即ち、RFXおよびL-CARの併用療法にて、それぞれ単剤投与と比較して、肝硬変モデルにおける骨格筋萎縮の抑制効果が増強される可能性が示唆され、臨床応用を見据えた基礎的データが得られた。ARBであるオルメサルタンを用いて薬剤内包ミセル作成を行い、本ミセルが肝臓に高い効率で集積することを確認した。生体での検討として肝硬変モデルマウスに対するHA-micelle/OLMの治療効果について検討した。その結果、HA-micelle/OLMは肝硬変マウスモデルにおいて、著明な線維化抑制効果を示すことが明らかとなり、HAミセルを用いることによってより有効な肝線維化治療法の開発が可能となることが示された。さらに、各種既存薬剤を用いてgut-liver axis制御と肝線維化抑制効果を確認できた。これらの成果はそれぞれの組み合わせ毎に欧文誌に発表し、日本より世界に向けて発信した。これらの成果より当初の研究目標をほぼ達成していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Enomoto M, Kaji K, Nishimura N, Fujimoto Y, Murata K, Takeda S, Tsuji Y, Fujinaga Y, Takaya H, Kawaratani H, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H.	4. 巻 54
2. 論文標題 Rifaximin and lubiprostone mitigate liver fibrosis development by repairing gut barrier function in diet-induced rat steatohepatitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dig Liver Dis	6. 最初と最後の頁 1392-1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2022.04.012	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 -
1. 著者名 Murata K, Kaji K, Nishimura N, Enomoto M, Fujimoto Y, Takeda S, Tsuji Y, Fujinaga Y, Takaya H, Kawaratani H, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H	4. 巻 50
2. 論文標題 Rifaximin enhances the L carnitine mediated preventive effects on skeletal muscle atrophy in cirrhotic rats by modulating the gut liver muscle axis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Med.	6. 最初と最後の頁 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2022.5157	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 -
1. 著者名 Namisaki T, Kaji K, Shimozato N, Kaya D, Ozutsumi T, Tsuji Y, Fujinaga Y, Kitagawa K, Furukawa M, Sato S, Sawada Y, Nishimura N, Takaya H, Okura Y, Seki K, Kawaratani H, Moriya K, Noguchi R, Asada K, Akahane T, Mitoro A, Yoshiji H	4. 巻 41
2. 論文標題 Effect of combined farnesoid X receptor agonist and angiotensin II type 1 receptor blocker on ongoing hepatic fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Indian J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 169-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12664-021-01220-5.	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 -
1. 著者名 Fujimoto Y, Namisaki T, Takeda S, Murata K, Enomoto M, Takaya H, Tsuji Y, Fujinaga Y, Sawada Y, Nishimura N, Kitagawa K, Kaji K, Inoue T, Kawaratani H, Moriya K, Akahane T, Mitoro A, Yoshiji H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Leaky Gut and Severe Adverse Events in Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated With Lenvatinib.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4895-4905.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15995	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 -

1. 著者名 Fujimoto Y, Kaji K, Nishimura N, Enomoto M, Murata K, Takeda S, Takaya H, Kawaratani H, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Dual therapy with zinc acetate and rifaximin prevents from ethanol-induced liver fibrosis by maintaining intestinal barrier integrity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 8323-8342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v27.i48.8323	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 -

1. 著者名 Ishida K, Kaji K, Sato S, Ogawa H, Takagi H, Takaya H, Kawaratani H, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H	4. 巻 89
2. 論文標題 Sulforaphane ameliorates ethanol plus carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice through the Nrf2-mediated antioxidant response and acetaldehyde metabolism with inhibition of the LPS/TLR4 signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Nutr Biochem	6. 最初と最後の頁 108573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jnutbio.2020.108573.	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 -

1. 著者名 Fujimoto Y, Kaji K, Nishimura N, Enomoto M, Murata K, Takeda S, Takaya H, Kawaratani H, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Dual therapy with zinc acetate and rifaximin prevents from ethanol-induced liver fibrosis by maintaining intestinal barrier integrity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 8323-8342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v27.i48.8323.	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 -

1. 著者名 Takeda S, Kaji K, Nishimura N, Enomoto M, Fujimoto Y, Murata K, Takaya H, Kawaratani H, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H	4. 巻 65
2. 論文標題 Angiotensin Receptor Blockers Potentiate the Protective Effect of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle Atrophy in Cirrhotic Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Nutr Food Res	6. 最初と最後の頁 e2100526
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mnfr.202100526.	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤本優樹、鍛治孝祐、吉治仁志
2. 発表標題 アルコール肝障害モデルマウスを用いた酢酸亜鉛とリファキシミン併用療法による肝繊維化予防効果の検討
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田晃児、鍛治孝祐、吉治仁志
2. 発表標題 肝硬変ラット骨格筋委縮に対するRifaximin/L-carnitine 併用療法の効果
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤本優樹、鍛治孝祐、吉治仁志
2. 発表標題 アルコール性肝障害モデルマウスを用いた、酢酸亜鉛とリファキシミン併用療法による肝繊維化予防効果の検討
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田晃児、鍛治孝祐、吉治仁志
2. 発表標題 Rifaximin および L-carnitine併用による肝硬変ラット骨格筋委縮に対する予防効果の検討
3. 学会等名 日本門脈圧亢進症学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeda S, Kaji K, Yoshiji H
2. 発表標題 ARB potentiate the Protective Effect of BCAA on Skeletal Muscle Atrophy in Cirrhotic Rats
3. 学会等名 日本肝臓学会大会 JDDW2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田晃児、鍛治孝祐、高谷広章、瓦谷英人、守屋圭、浪崎正、赤羽たけみ、美登路昭、吉治仁志
2. 発表標題 Rifaximin/L-carnitine 併用による肝硬変ラット骨格筋委縮に対する予防効果
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保貴裕、鍛治孝祐、吉治仁志
2. 発表標題 LPSにより肝星細胞から産生される epi-regulin の肝癌進展における役割とその作用機序
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 榎本壮秀、鍛治孝祐、吉治仁志
2. 発表標題 Lubiprosone と Rifaximin 併用による gut-liver axis 制御とNASH肝繊維化抑制効果
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022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	浪崎 正 (Namisaki Tadashi) (20526850)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	
研究 分担者	鍛冶 孝祐 (Kaji Kosuke) (20623490)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------