

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19870

研究課題名(和文)肝類洞内皮細胞を標的としたsiRNAを用いた新規肝疾患治療薬の開発

研究課題名(英文)Protecting liver sinusoidal endothelial cells suppresses apoptosis in acute liver damage

研究代表者

田村 孝史(TAMURA, Takafumi)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：20633192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：siRNAを封入してLSECに選択的に取り込ませることが可能なDDSを新たに開発し、LSECのアポトーシスを選択的に抑制し、マウス急性肝障害モデルへの投与効果について検討した。アポトーシスを抑制するために、ミトコンドリアにおけるアポトーシス促進因子であるBaxのsiRNAを使用した。その結果、細胞選択性のないDDSにBax siRNAを封入し投与しても急性肝障害モデルの肝障害は軽減されなかったが、LSECのBaxを選択的に抑制することで、類洞構造が保たれ、肝細胞障害が抑制された。LSEC障害を抑制して類洞構造を維持することが、急性肝障害の新たな治療となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bax siRNA was transfected into a sinusoidal endothelial cell line (M1) to suppress apoptosis. C57BL/6J mice were divided into three groups: (i) a control group, only intravenous saline; (ii) a nonselective group, injections of siRNA sealed in the nonselective DDS; and (iii) an LSEC-transfer efficient group, injections of siRNA sealed in an LSEC-transfer efficient DDS. Bax siRNA had an anti-apoptotic effect on M1 cells. Silver impregnation staining indicated that the sinusoidal space was maintained in the LSEC-transfer efficient group but not in the other groups. Electron microscopy showed that the LSECs were slightly impaired, although the sinusoidal structure was maintained in the LSEC-transfer efficient group. Hepatocyte apoptosis was reduced by the efficient suppression of LSEC apoptosis with a novel DDS. Protecting the sinusoidal structure by suppressing LSEC damage will be an effective treatment for acute liver failure.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Drug Delivery System 肝類洞内皮細胞 肝細胞 アポトーシス SiRNA, Bax

1. 研究開始当初の背景

我々は、血小板の肝臓に対する種々の新たな作用を世界に先駆けて報告してきた。マウスに Fas ligand を投与した劇症肝炎モデルでは、トロンボポエチン投与による血小板増加状態にすると、ALT の著明な低下と肝類洞内皮細胞 (LSEC) および肝細胞のアポトーシスの有意な減少を認めた (Hisakura K, J Gastroenterol Hepatol, 2011.)。また肝虚血再灌流障害において血小板と Kupffer 細胞の相互作用により、肝細胞にアポトーシスが誘導され、肝障害が引き起こされることを明らかにした (Tamura T, J Surg Res 2012)。各種肝障害においてアポトーシスが関連することが示唆されるが、肝臓においてアポトーシスを引き起こす細胞としては、LSEC および肝実質細胞が存在する。肝障害のメカニズムは肝類洞内皮細胞の障害に始まり、類洞血流不全等が生じた結果、肝細胞障害が誘導されると言われている。しかし、これまで in vitro、in vivo でアポトーシスを誘導する転写因子を siRNA で抑制することでそのメカニズム解析を試みている報告は散見されるが、すべて肝細胞におけるものであり、LSEC におけるアポトーシスに着目し、解析をしている報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究は独自に開発した特異的に LSEC に集積する siRNA を用いることで、LSEC におけるアポトーシスの誘導を Bcl-2 ファミリーのメンバーである Bax を knockdown することで抑制し、肝障害における LSEC のアポトーシスのメカニズム解析を行う。具体的には、各種肝障害マウスに LSEC 特異的に Bax を knockdown するように設計された siRNA を投与し、また、対照群として肝細胞におけるアポトーシスを抑制するように設計した siRNA を投与し、両群の比較検討を行う。それを実現可能にするために、北海道大学大学院薬学

研究院薬剤分子設計学研究室との共同実験から、LSEC に集積する性質のあるペプチド配列をもつキャリアを作成した。この LSEC で特異的に発現を knockdown させることが可能になる技術の開発は我々の独創的なアイデアである。予想される結果は、LSEC におけるアポトーシスの誘導が、その後の肝細胞におけるアポトーシスを誘導し、肝障害を来すメカニズムの解析が可能になる。この新しいメカニズムの解析は、肝障害治療に画期的な進歩をもたらす、最終的に siRNA を用いた治療薬の開発を行うことで、本邦において肝疾患を患う 1700 万人の患者に朗報をもたらすことが出来ると思える。

3. 研究の方法

(1) Bax を knockdown するように設計された siRNA の in vitro / in vivo での検討

肝実質細胞：cell line；AML12(マウス)・ヒト凍結肝細胞、に対する siRNA 投与効果の検討

cell line；AML12(マウス)、ヒト凍結肝細胞に肝実質細胞での Bax の knockdown 効果をもつ siRNA を投与し、Bax の発現およびその上流にある Caspase-2、Caspase-8 の発現を Western Blot および RT-PCR で検討した。さらに Bax はミトコンドリアからの Cytochrome c の放出を促進する因子であることから、siRNA 投与群、非投与群での Cytochrome c を ELISA および Cytochrome c 抗体を使った Western Blot で測定した。

肝類洞内皮細胞：cell line；M1(マウス)・不死化ヒト肝類洞内皮細胞株；TMNK-1、に対する siRNA 投与効果の検討

cell line；M1(マウス)・不死化ヒト肝類洞内皮細胞株；TMNK-1 に対し、先の肝実質細胞の knockdown 効果をもつ siRNA に肝類洞内皮細胞に集積する性質のあるペプチド配列を付加させ、肝類洞内皮細胞での Bax の knockdown 効果をもつ siRNA を作成・投与し、

Bax の発現およびその上流にある Caspase-2、Caspase-8 の発現を Western Blot および RT-PCR で検討した(Figure 5)。さらに siRNA 投与群、非投与群での Cytochrome c を ELISA および Cytochrome c 抗体を使った Western Blot で測定した。

(2) Bax を knockdown するように設計された siRNA の in vivo での検討

急性肝炎モデル動物に対する siRNA 投与実験

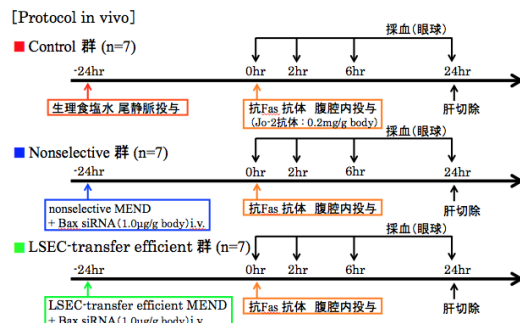
C57BL/6 雄マウスに anti-Fas antibody を用いた急性肝炎モデルを作成し、肝類洞内皮細胞および肝実質細胞に対して Bax を knockdown するように設計された siRNA を投与して、その 2 群間で、) 動物モデルの血清中の ALT・AST の経時的測定、) TUNEL 染色による組織評価、) アポトーシス関連蛋白の発現 (Caspase-3,-8,-9,Bcl-2,Bcl-xL,Bax) の Western Blot および RT-PCR、) 電子顕微鏡による組織形態学的検査を施行した。

4 . 研究成果

【結果】アポトーシスを抑制するために、ミトコンドリアにおけるアポトーシス促進因子である Bax の siRNA を使用した結果を示す (Figure 非表示) . in vitro ; M1 細胞 (マウス肝類洞内皮細胞) に Bax siRNA を導入し, (i) siRNA 非導入群, (ii) siRNA 導入群の 2 群に分別し導入 24 時間後に抗 Fas 抗体を投与してアポトーシスを誘導し, 細胞を採取した結果 RT-PCR では, siRNA 導入群で Bax 遺伝子の発現抑制を認めた . Western Blot では, siRNA 導入群で Bax および cleaved-caspase-3 のタンパク発現低下を認めた .

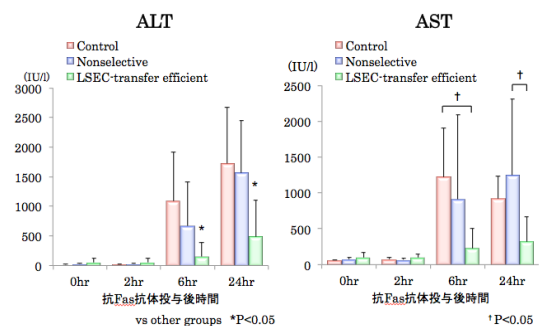
in vivo において DDS に封入した Bax siRNA をマウス (C57BL/6J, 雌性, 8~9 週) に尾静脈投与し, (i) 生食群 (生理食塩水のみを投与した群), (ii) HC 群 (細胞選択性はないが肝臓集積性の高い DDS を用いた群) (iii) LSEC 群 (LSEC 選択性 DDS を用いた群) の 3 群に

分別した(Figure1). siRNA 投与 24 時間後に抗 Fas 抗体を腹腔内投与して急性肝障害を誘導し, サンプルングとして血清, 肝臓を採取した.

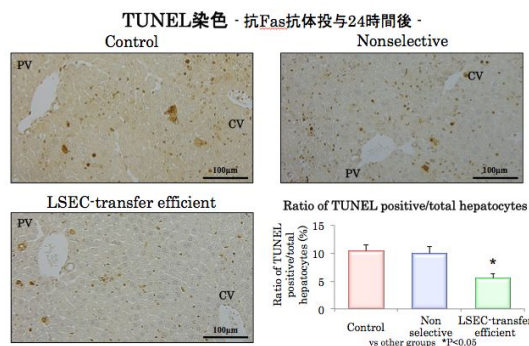


[Figure1] プロトコール詳細

ALT 値は LSEC 群で有意な低下を認めた (Figure2) .さらに LSEC 群および HC 群で Bax 遺伝子およびタンパク発現の抑制を認めた . LSEC 群においては cleaved-caspase-3 のタンパク発現低下も認めた . TUNEL 染色では, LSEC 群で TUNEL 陽性の肝細胞率が有意に低かった(Figure3) . 電子顕微鏡検査では, LSEC 群で LSEC 障害が弱く, 類洞構造が保たれていた(Figure4) . 鍍銀染色では, LSEC 群で類洞面積が有意に広がった(Figure5) .

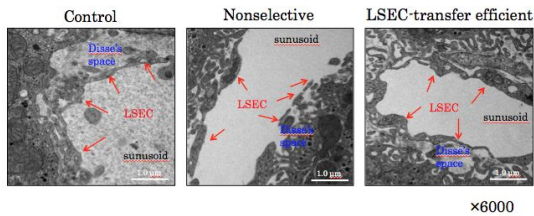


[Figure2] 血清 ALT/AST 値



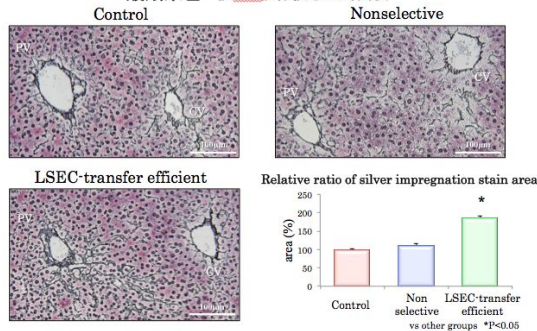
[Figure3] TUNEL 染色

電子顕微鏡写真・抗Fas抗体投与24時間後・



[Figure4] LSEC 電子顕微鏡像

鍍銀染色・抗Fas抗体投与24時間後・



[Figure5] 鍍銀染色

【結論】細胞選択性のない DDS に Bax siRNA を封入し投与しても急性肝障害モデルの肝障害は軽減されなかったが、LSEC の Bax を選択的に抑制することで、類洞構造が保たれ、肝細胞障害が抑制された。以上のことから、これまでの基礎研究で、は肝障害の治療対象は肝細胞のみに着目されていたが、われわれの検討からは、LSEC に着目し、LSEC 特異的な DDS を開発することで、LSEC 障害を選択的に抑制して類洞構造を維持することが、急性肝障害の新たな治療となることが示唆された。今後 LSEC に着目した肝障害治療薬の開発を行い、さらに検討を進めていく予定としている。

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 1 件)

Tanoi T, Tamura T, Sano N, Nakayama K, Fukunaga K, Zheng YW, Akhter A, Sakurai Y, Hayashi Y, Harashima H, Ohkohchi N. Protecting liver sinusoidal endothelial cells

suppresses apoptosis in acute liver damage.

Hepatol Res. 46(7):697-706. 2016 (査読有) doi: 10.1111/hepr.12607.

[学会発表] (計 2 件)

田野井智倫, 田村孝史, 佐野直樹, 中山健, 福永 潔, 村田聡一郎, Akhter A, 櫻井 遊, 林 泰弘, 原島秀吉, 大河内信弘. 新規 Drug delivery System による急性肝障害における肝類洞内皮細胞のアポトーシス抑制の検討. 第 11 回 広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム. 広島, 2015 年 7 月 4 日. ホテルグランヴィア広島 (広島県広島市)

田野井智倫, 田村孝史, 佐野直樹, Afsana Akhter, 櫻井 遊, 林 泰弘, 原島秀吉, 大河内信弘. 肝類洞内皮細胞選択的アポトーシス抑制による急性肝障害治療の検討. 第 70 回 消化器外科学会. 2015 年 7 月 15 日-17 日, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村孝史 (TAMURA, Takafumi)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号: 20633192