

令和元年6月8日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19909

研究課題名(和文) 移植肝の線維化治療に向けた、免疫抑制剤の肝星細胞に対する影響の解明

研究課題名(英文) The role of immunosuppressive drugs on hepatic stellate cells in liver graft and its application to the anti-fibrosis strategy in patients after liver transplantation

研究代表者

脇屋 太一(Wakiya, Taiichi)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：50571246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：移植肝の線維化は、喫緊の対策が必要な肝移植後合併症の一つである。その対策を講じるうえで、肝線維化過程において中心的役割を担う肝星細胞を標的にすることが合理的であると考えた。移植肝の線維化予防および治療戦略を確立するために、本研究では免疫抑制剤の肝星細胞に対する影響を解明することを目的とした。本研究により、1)免疫抑制剤は静止型肝星細胞の活性化を抑制しうる、2)免疫抑制剤が肝星細胞のコラーゲン合成を抑制しうる、3)免疫抑制剤は、活性化型肝星細胞の機能を一様に抑制するものではなく、特定の機能を選択的に抑制しうる、ことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝移植医療の発展はめざましく長期生存症例が増加する一方で、様々な晩期合併症が明らかになってきた。晩期合併症の一つである移植肝の線維化は、移植肝不全に至る重大な病態であり、より良い肝移植後生活のために、その対策は必須である。

本研究は、免疫抑制剤により、肝線維化過程において中心的役割を担う肝星細胞の活性化や機能を制御できる可能性を示唆した。この結果は、移植肝の線維化予防および治療戦略の確立に貢献しうるものであり、肝移植医療において大きな意義があることと思われる。

研究成果の概要(英文)：A critical complication of liver transplantation (LT) is development of liver fibrosis, which can lead to worse long-term graft and patient survival as well as potential need for re-transplantation. To assess liver fibrosis following LT, we thought it was reasonable to focus on hepatic stellate cells (HSC) which have a central role in liver fibrosis. The purpose of this study was to clarify the effect of immunosuppressive drugs (IS) on HSC for the development of the anti-fibrosis strategy in patients after LT. As a result, we have discovered 1) IS can inhibit the activation of quiescent HSC to the activated form, 2) IS can suppress the collagen synthesis in HSC, 3) IS do not suppress the total function of activated HSC, but can selectively suppress specific functions of them. Our results have a significant contribution to establishing the anti-fibrosis strategy in patients after LT.

研究分野：肝胆膵移植

キーワード：肝線維化 肝移植 肝星細胞 免疫抑制剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝移植の発展はめざましく、先天性肝疾患、代謝性疾患、肝硬変、肝細胞癌、急性肝不全等に対する治療法として確立された。我が国での初回生体肝移植から 20 年以上が経過し、長期生存症例が増加する一方で、様々な晩期合併症が明らかになってきた。移植肝のより良い長期生着のためには、晩期合併症への対策は必要不可欠であり、また今後その重要性が増すことが予想される。

晩期合併症の一つに移植肝の線維化がある。移植肝の線維化は、移植肝不全に至る重大な病態であるが、現時点でその機序の解明は不十分であり、それゆえ対策も確立されていない。一般的に、肝線維化過程において肝星細胞が中心的な役割を担っているとされ、移植肝においても同様の機序が働く可能性は無視できない。活性化した肝星細胞が、コラーゲンや TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) 等を産生し肝線維化に関わることを鑑みれば、線維化対策は肝星細胞を標的にすることが合理的である。

肝星細胞は活性化 T 細胞が産生したさまざまなサイトカインに刺激され活性化される (Liu C, et al. J Biol Chem. 2003) という特徴を考慮すれば、T 細胞の活性化抑制により肝星細胞の活性化も制御されると想定される。肝移植後においては、T 細胞を抑制する免疫抑制剤はほぼ一生涯に渡り必要な薬剤であるが、これまで免疫抑制剤が肝星細胞に及ぼす直接的および間接的影響についての検討はほとんどなく不明確な点が多い。

仮に、免疫抑制剤により肝星細胞の活性化が制御でき、移植肝の線維化予防および治療戦略が確立できるなら、その臨床学的意義は極めて大きい。

2. 研究の目的

移植肝の線維化予防及び治療戦略を確立するために、本研究では、免疫抑制剤の肝星細胞に対する影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

肝星細胞株としてラット由来 LX2 細胞、Portal fibroblasts (PF) を使用した。免疫抑制剤として FK506、Cyclosporin A (CyA)、Mycophenolic Acid (MPA) を使用した。

以下の項目について、免疫抑制剤の暴露時間依存的な差、用量依存的な差の有無について検討した。検討項目 ; (1) 細胞形態の評価、(2) コラーゲン合成能の評価、(3) 肝星細胞収縮力の評価、(4) 細胞死 (アポトーシス) の評価

4. 研究成果

(1) 細胞形態の評価

LX2 細胞、Portal fibroblasts 細胞を使用し、免疫抑制剤として FK506、CyA、MPA を培地に加え、培養後の細胞形態を評価した。

FK506、CyA を用いた実験では、暴露時間や用量を変えた何れの条件下においても、細胞形態の変化は認めなかった。

一方、高濃度 MPA (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加群においては星状の細胞体を認めず、全て類円形の形態を示した。核の形態に変化は認めなかった。低濃度 MPA 群 (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下) では、全ての細胞が星状の形態を示し、活性化状態を示唆した。高濃度 MPA 添加に伴う細胞形態の変化は添加後 1 時間で認められ、LX2、PF いずれにおいても同様の結果であった。添加後 24 時間後の観察においては、約 90% の細胞が非接着状態であった。これらの結果から、高濃度 MPA は静止型肝星細胞の活性化を抑制する可能性が示唆された。

(2) コラーゲン合成能の評価

活性化型肝星細胞に特徴的な形質であるコラーゲン合成促進について評価するために、細胞を回収して 1 型コラーゲンの発現を WB 法で評価した。FK506 添加群で、免疫抑制剤の用量依存的に 1 型コラーゲンの発現量が減少する傾向が認められた。加えて、この変化は、長時間暴露群において顕著であった (図 1)。MPA を用いた検討においても、用量依存的に 1 型コラーゲンの発現量が減少する傾向を認めたが、FK506 と比較するとその変化量は小さいものであった。これらの結果は、免疫抑制剤が肝星細胞のコラーゲン合成を抑制しうることを示唆するものであった。

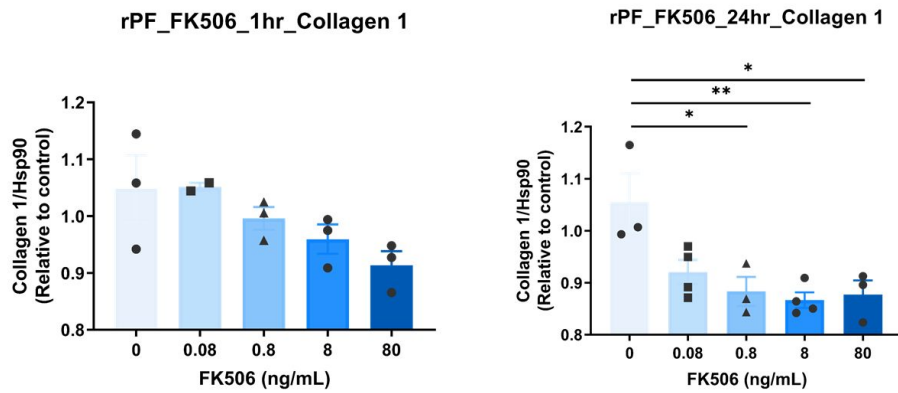


図 1：免疫抑制剤による 1 型コラーゲンの発現変化

(3) 肝星細胞収縮力の評価

活性化型肝星細胞に特徴的な形質である収縮力増強を評価するために、細胞を回収し平滑筋アクチンの発現を WB 法で検討した。興味深いことに、平滑筋アクチンの検討では、1 型コラーゲン同様の傾向は観察されなかった。すなわち、暴露時間依存的、用量依存的な発現量の減少は認めなかった (図 2)。また、FK506 添加、MPA 添加両群において同様であった。この結果から、少なくとも本研究の条件においては、免疫抑制剤は、活性化型肝星細胞の収縮力には影響を及ぼさないことが示唆された。一方で、その結論には異なる暴露時間などの検討が必須とも考えられた。

コラーゲン合成能の検討結果を鑑みると、本研究結果は、免疫抑制剤は活性化型肝星細胞の機能を一様に抑制するものではなく、特定の機能を選択的に抑制する可能性を示唆した。

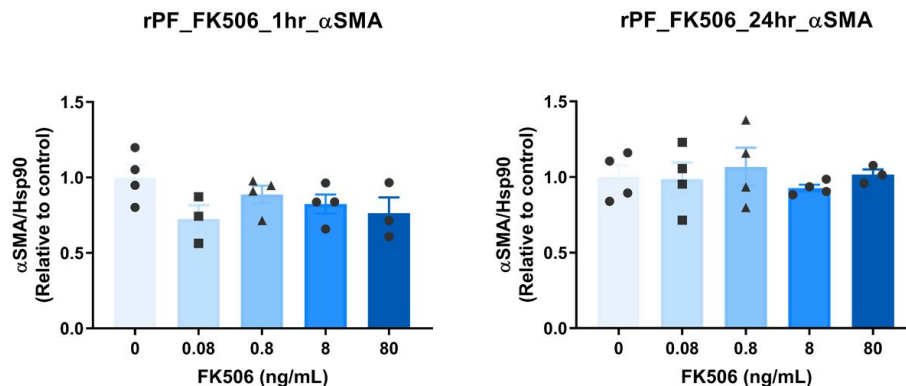


図 2：免疫抑制剤による 平滑筋アクチンの発現変化

(4) 細胞死 (アポトーシス) の評価

肝星細胞の細胞死 (アポトーシス) の促進は肝線維化の改善に寄与する (Tsuchida T, et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017) ことに着目し、免疫抑制剤が活性化型肝星細胞にアポトーシス等の細胞死を誘導する可能性について検討した。細胞形態による評価では、何れの条件においてもアポトーシスを示唆する所見 (アポトーシス小体、核凝縮、核の断片化) を認めなかった。また、WB による Cleaved Caspase-3 の評価では、有意な変化は認めなかった。免疫抑制剤が肝星細胞の細胞死にどのような影響を及ぼすかについて、更に検討中である。

5. 主な発表論文等

[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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

一戸大地 (ICHINOHE Daichi)

木村憲央 (KIMURA Norihisa)

三浦卓也 (MIURA Takuya)

諸橋聡子 (MOROHASHI Satoko)

堤伸二 (TSUTSUMI Shinji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。