

平成30年6月4日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21193

研究課題名(和文) 臨床実用化に直結したマクロファージ制御剤を用いた新規肝線維溶解療法の開発

研究課題名(英文) Development of anti-fibrotic therapies for liver fibrosis by the regulation of Rho family GTPases of macrophages.

研究代表者

松本 俊彦 (MATSUMOTO, Toshihiko)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70634723

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)：本研究では、Rho family GTPaseを介したマクロファージ(M ϕ)の表現型制御による肝線維溶解療法の開発研究を行った。四塩化炭素誘導肝線維化マウスにおいて、Rac1/Cdc42阻害剤R-Ketorolac投与は肝線維化改善効果を認めず。一方、Rac1阻害剤NSC23766投与でMMP9陽性細胞数増加と肝線維化改善を認めた。Rac1を含むRho family GTPaseを標的とするmiR142-3pの導入は、ヒトM ϕ のMMP12発現、ヒト肝星細胞のMMP1、BAMBI発現を増加した。これらの結果は、Rho family GTPaseが肝線維化の治療標的となり得る可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Liver fibrosis is regulated by interaction between macrophage (M ϕ) and hepatic stellate cell (HSC). We hypothesized that alterations in cell shape via actin remodeling may modulate the phenotype of M ϕ and HSC in fibrotic liver. We therefore examined the effects of Rho family GTPase inhibitors, which regulate actin remodeling, on MMPs expression of M ϕ and activation of HSC, with the aim of developing future anti-fibrotic therapies.

Treatment with the Rac1/Cdc42 inhibitor, R-Ketorolac, inhibited actin remodeling, while it had no impact on MMPs expression of murine M ϕ in vitro and in vivo. The Rac1 inhibitor, NSC23766-treated mice showed a higher number of MMP9 positive cells in the liver and reduced liver fibrosis.

Transfection of miR142-3p, which targets Rho family GTPase genes including Rac1, increased MMP12 expression in human M ϕ , while it increased MMP1 and BAMBI expression in human HSC.

These results suggest that Rho family GTPases may be a target for anti-fibrotic therapy.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝線維化 Rho family GTPase マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝線維溶解療法の必要性

肝硬変は肝臓が線維化によって硬化・再生不良を来した状態で、肝不全への進行や食道胃静脈瘤破裂、肝癌の合併により致命的となる。肝線維化の根本的な治療は原因疾患であるウイルス性肝炎等の完治であるが、進行した肝硬変症例では肝機能低下のために治療適応とならないことも多く、原因疾患の治療とは別に肝内の線維を溶解する治療法の開発が急務である。

(2) 肝線維溶解とマクロファージ

肝線維化・線維溶解の双方にマクロファージが関与することが知られている。肝障害に伴い、肝に浸潤した炎症性マクロファージは、線維産生細胞である肝星細胞の活性化と増殖を維持し、肝線維化を促進する。一方、肝障害が収束すると、炎症性マクロファージが線維溶解性マクロファージへと変化し、線維溶解酵素 matrix metalloproteinase (MMP9, MMP12, MMP13)により線維を溶解するとともに、肝星細胞のアポトーシスを誘導する(文献)。

(3) マクロファージの形態制御と表現型

従来、マクロファージの表現型はサイトカインなどの液性因子によって制御されると考えられてきたが、鋳型によってマクロファージの細胞形態を矯正するのみで表現型が変化することが報告された(文献)。細胞形態は、細胞骨格のアクチン重合とアクチンミオシンの収縮運動のバランスで規定されるため、これらを介するシグナルがマクロファージの表現型に関与している可能性がある。

(4) アクチン重合阻害剤によるマクロファージの表現型変化

独自の検討で、コラーゲン上で培養された *in vitro* 骨髄細胞由来マクロファージは小型で類円形の形態を呈し、*in vivo* 肝線維化モデルマウスの肝内線維化領域のマクロファージと酷似すること、コラーゲン上で培養された小型のマクロファージでは活発なアクチン重合を認め、MMP9, 12, 13 発現が低下すること、アクチン重合阻害剤 Cytochalasin D 添加によりマクロファージの MMP9, MMP12, MMP13 発現が増加すること、マクロファージにおけるアクチン重合は Rho family GTPase (Rac1, Cdc42)によって制御され、選択的 Rac1 阻害剤 NSC23766 添加で MMP9 発現が、選択的 Cdc42 阻害剤 ML141 添加で MMP13 発現が増加することを確認した。

2. 研究の目的

肝硬変の主病態は肝臓が線維化により硬化・再生不良をきたすことであり、改善する

ためには肝内線維の溶解が必須であるが、現時点で臨床的に有効な薬物療法はない。近年、肝線維溶解の過程でマクロファージの表現型が炎症性から MMP 高発現の線維溶解性に変化することが報告され、マクロファージの表現型を制御することが肝線維溶解療法の開発につながると着想した。そして、マクロファージの表現型はサイトカインなどの液性因子だけでなく、細胞形態の変化でも制御される。そこで本研究では、細胞形態を規定するアクチン重合に着目し、臨床的に実用可能なアクチン重合制御剤を用いることで、肝内の炎症性マクロファージを MMP 高発現の線維溶解マクロファージに誘導する新規肝線維溶解療法を開発することを目的とした。具体的には、アメリカ食品医薬品局(FDA)で認可されており、近年 Rac1/Cdc42 阻害作用が報告された R-Ketorolac (図1)、核酸医薬品と実用化が期待される microRNA(miR)のうち、Rac1 を含む複数の Rho family GTPase を標的遺伝子とする miR142-3p を用いて、マクロファージを標的とした抗線維化療法を開発することを目的とした。

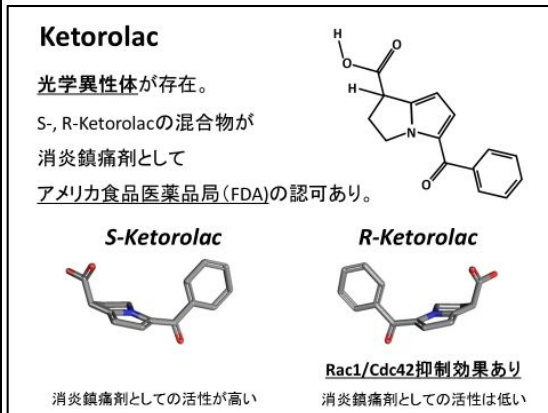


図1 S-ketorolac と R-ketorolac

3. 研究の方法

(1) Rac1/ Cdc42 共阻害のマクロファージ表現型に対する作用の検討

Rho family GTPase Rac1/Cdc42 阻害作用を有する R-Ketorolac のマクロファージに対する作用を検討するにあたり、より選択性が高い Rac1 阻害剤 NSC23766、Cdc42 阻害剤 ML141 を用いた共阻害実験を行った。*in vitro* マウス骨髄由来マクロファージの培地中に、先行研究での条件を参考に Rac1 阻害剤 NSC23766 200uM、Cdc42 阻害剤 ML141 40uM、または両者を添加し、細胞形態の変化および線維溶解酵素(MMP9, 12, 13)発現、炎症性サイトカイン(TNF α , IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α)発現を real-time PCR 法で検討した。

(2) R-Ketorolac のマクロファージのアクチン重合と MMP 発現に対する作用の検討

in vitro マウス骨髄由来マクロファージの培地中に、Rho family GTPase Rac1/Cdc42 阻害作用を有する R-Ketorolac 1uM, 10uM,

100uM を添加し、細胞形態および phalloidin 蛍光染色で評価したアクチン重合の変化と、real-time PCR 法で評価した MMP9, 12, 13 発現との関連を検討した。

(3) 肝線維化モデルマウスにおける Rac1 阻害剤 NSC23766 および Rac1/Cdc42 阻害剤 R-Ketorolac の肝線維化改善効果の検討

in vivo 四塩化炭素誘導肝線維化モデルマウスに対して、Rac1 阻害剤 NSC23766 50ug/body または R-Ketorolac 40ug/body を週 2 回腹腔内投与し、6 週後に肝線維化改善効果について評価した。評価項目は、血液生化学検査による肝酵素 (ALT, AST)、SiriusRed 染色および SMA 免疫組織化学染色による肝線維化面積比率、免疫組織化学染色による MMP9 陽性細胞数とした。

(4) miR142-3p のヒト単球由来マクロファージ及びヒト肝星細胞に対する作用の検討

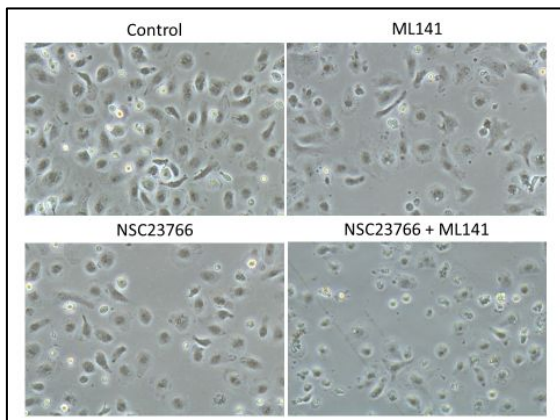
in vitro で、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) を用いてヒト末梢血単球からマクロファージを誘導し、miR142-3p mimic を導入したマクロファージにおける MMP 発現 (MMP1, MMP9, MMP12) を評価した。また、ヒト肝星細胞 (HHStC) に miR142-3p mimic を導入し形態、増殖能、線維化関連遺伝子発現 (SMA, collagens, MMPs, TIMP1, TGF- β 1, TGF receptors 等) について real-time PCR 法で検討した。

4. 研究成果

(1) Rac1/ Cdc42 共阻害のマクロファージ表現型に対する作用の検討

先行研究と同様に Rho family GTPase 阻害剤無添加の control 群と比較し、Rac1 阻害剤 NSC23766 および Cdc42 阻害剤 ML141 添加群でマクロファージは類円形で小型の形態となった。NSC23766+ML141 添加群でその傾向はさらに顕著となり、4 群間で最も小型の類円形を呈した (図 2)。以上より NSC23766+ML141 群におけるアクチン重合阻害作用の増強を確認した。

図 2 Rac1/Cdc42 阻害による細胞形態変化



MMP および炎症性サイトカイン発現については、先行研究で NSC23766 添加により MMP9 発現が、ML141 添加により MMP13 発現が増加することを確認していたが、NSC23766+ML141 群では MMP9, 13 発現に有意な変化を認めなかった (図 3)。一方、炎症性サイトカインについては、TNF α , IL-1 β , MCP-1, MIP-1 α の著明な発現増加を認めた。(図 3)

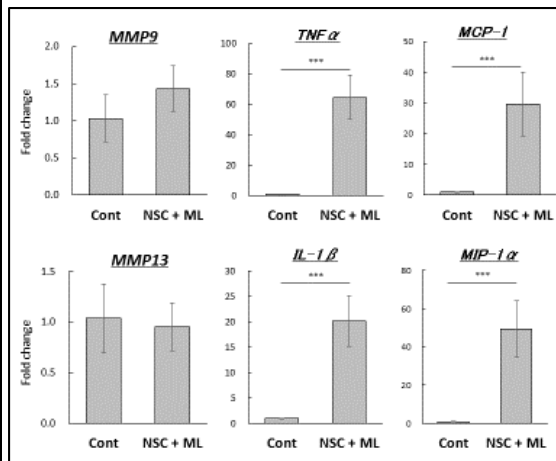


図 3 Rac1/Cdc42 阻害による MMP と炎症性サイトカインの発現変化

(2) R-Ketorolac のマクロファージのアクチン重合と MMP 発現に対する作用の検討

in vitro マウス骨髄由来マクロファージの培地中に Rho family GTPase Rac1/Cdc42 阻害作用を有する R-Ketorolac 1uM, 10uM, 100uM を添加したところ、用量依存性に細胞の小型化を認め、phalloidin 蛍光染色により葉状仮足と糸状仮足の減少に伴う蛍光強度の減少を認めた。これにより、R-ketorolac によるアクチン重合阻害作用を確認した (図 4)。一方、MMP 発現については、MMP9, 12, 13 とともに変化を認めなかった (図 5)。

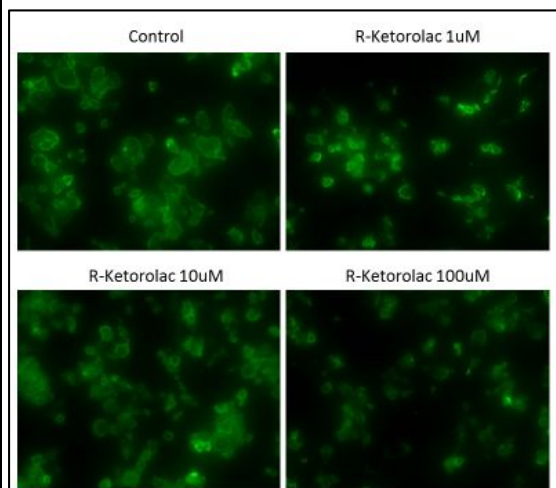


図 4 R-ketorolac によるアクチン重合阻害

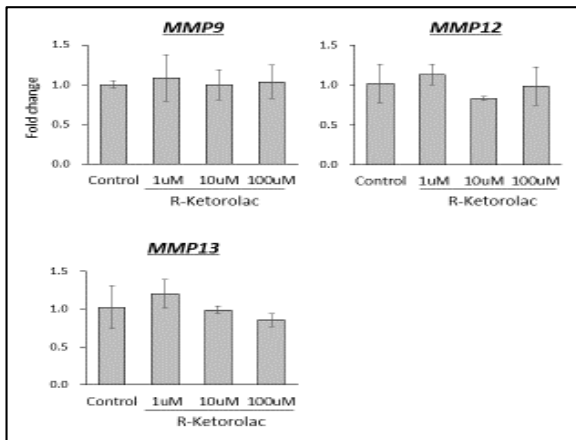


図 5 R-ketorolac の MMP 発現に対する作用

(3) 肝線維化モデルマウスにおける Rac1 阻害剤 NSC23766 および Rac1/Cdc42 阻害剤 R-Ketorolac の肝線維化改善効果の検討

四塩化炭素誘導肝線維化モデルに対する Rac1 阻害剤 NSC23766 腹腔内投与により、control 群と比較して肝 αSMA 陽性面積に変化を認めなかったが、MMP9 陽性細胞数が増加し、Sirius red 染色による肝線維化面積は有意に減少した (図 6)。一方、R-ketorolac 投与群では、肝線維化改善効果を認めなかった。

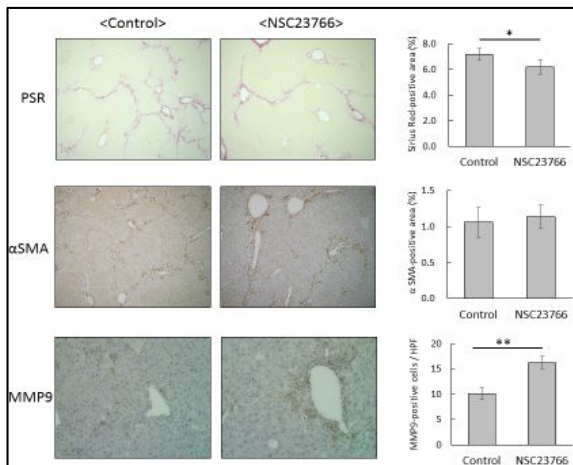


図 6 NSC23766 による肝線維化改善効果

(4) miR142-3p のヒト単球由来マクロファージ及びヒト肝星細胞に対する作用の検討

ヒト末梢血単球由来マクロファージに miR142-3p を導入すると、MMP12 発現が有意に増加した (図 7)。

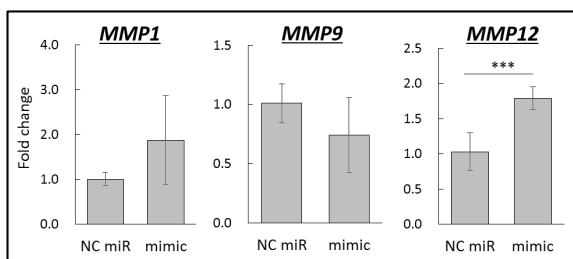


図 7 miR142-3p のヒトマクロファージ MMP 発現に対する作用

また、miR142-3p 導入ヒト肝星細胞では、negative control miR (NC miR) 導入ヒト肝星細胞と比較し、細胞形態が紡錘形から類円形に変化し、増殖が有意に低下した。また、線維化関連遺伝子発現では、TGF receptor (TGFBR)1 の発現低下、BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI)、MMP1 の発現増加を認めた (図 8)。

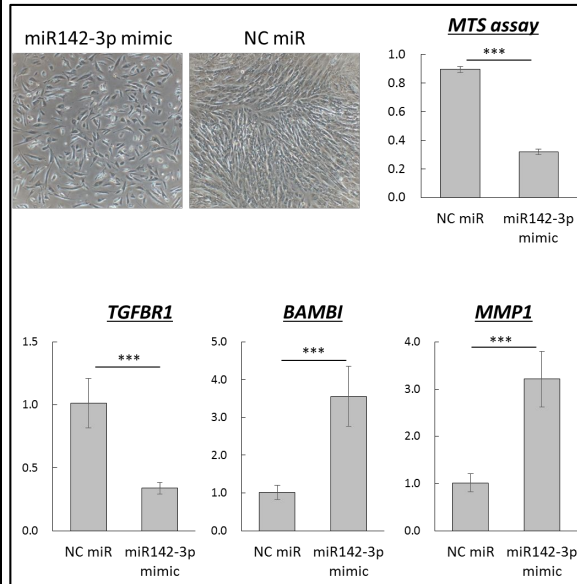


図 8 miR142-3p のヒト肝星細胞に対する作用

(5) 結論

本研究では、Rac1/Cdc42 阻害作用を持つ R-Ketorolac を線維溶解療法に応用すべく検討を開始した。しかし、*in vitro* でマウス骨髄由来マクロファージに R-Ketorolac を添加したが、MMP9, 12, 13 発現の有意な変化を認めなかった。*in vivo* でも、四塩化炭素誘導肝線維化モデルマウスに R-Ketorolac の腹腔内反復投与を行い、肝線維化改善効果を評価したが、肝線維化の改善は得られなかった。R-Ketorolac が Rac1/Cdc42 の両者を阻害することが改善効果不十分の原因であると考えられた。一方、*in vivo* で Rac1 阻害により肝線維化改善効果を認めたため、以後、Rac1 を含む Rho family GTPase を標的とした miR142-3p について検討した。*in vitro* で、ヒト末梢血単球由来マクロファージの MMP12 発現増加、ヒト肝星細胞の増殖抑制と線維化関連遺伝子 TGFBR1 の発現低下と BAMBI、MMP1 の発現増加を認めた。これらの結果は、miR142-3p が肝線維化改善に働く可能性を示唆しており、*in vivo* で四塩化炭素誘導肝線維化マウスモデルに miR142-3p を導入し、引き続き解析を行っていく。

<引用文献>

Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. Ramachandran P et

al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(46):E3186-95.

Modulation of macrophage phenotype by cell shape. McWhorter FY, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(43):17253-8.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Fujisawa K, Takami T, Okada S, Hara K, Matsumoto T, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I. Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared with Hypoxic Conditions. Stem Cells. 査読有, 2018 doi: 10.1002/stem.2826. [Epub ahead of print]

Fujisawa K, Takami T, Fukui Y, Quintanilha LF, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I. Evaluating effects of L-carnitine on human bone marrow derived mesenchymal stem cells. Cell Tissue Res. 査読有, 368(2). 2017. 301-310.

Fujisawa K, Takami T, Matsuzaki A, Matsumoto T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I. Evaluation of the effects of L-carnitine on medaka (*Oryzias latipes*) fatty liver. Sci Rep. 査読有, 7(1). 2017. 2749.

Tanabe N, Takami T, Fujisawa K, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I. Effectiveness of tolvaptan monotherapy and low-dose furosemide/tolvaptan combination therapy for hepatoprotection and diuresis in a rat cirrhotic model. J Clin Biochem Nutr. 査読有, 61(1). 2017. 53-59.

Matsuda T, Takami T, Matsumoto T, Yamamoto N, Sakaida I(他 9 名,8 番目). A canine liver fibrosis model to develop a therapy for liver cirrhosis using cultured bone marrow - derived cells. Hepatology communications. 査読有, 1(7). 2017. 691-703

Saeki I, Yamasaki T, Matsumoto T, Takami T, Sakaida I(他 5 名,6 番目). Evaluation of the "assessment for continuous treatment with hepatic arterial infusion chemotherapy" scoring system in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 査読有, 48(3). 2017. E87-E97

Takami T, Yamasaki T, Saeki I,

Matsumoto T, Suehiro Y, Sakaida I. Supportive therapies for prevention of hepatocellular carcinoma recurrence and preservation of liver function. World J Gastroenterol. 査読有, 22(32). 2016. 7252-7263 doi:10.3748/wjg.v22.i32.7252.

Harima H, Kaino S, Takami T, Shinoda S, Matsumoto T, Fujisawa K, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I. Deferasirox, a novel oral iron chelator, shows antiproliferative activity against pancreatic cancer in vitro and in vivo. BMC Cancer. 査読有, 16. 2016. 702. doi: 10.1186/s12885-016-2744-9.

Iwamoto T, Fujisawa K, Matsumoto T, Takami T, Sakaida I(他 5 名,5 番目). Predictors of the Effect of Tolvaptan on the Prognosis of Cirrhosis. Internal Med., 査読有, 55(20). 2016. 2911-2916.

Saeki I, Yamamoto N, Takami T, Fujisawa K, Matsumoto T, Sakaida I(他 7 名,8 番目). Effects of an oral iron chelator, deferasirox, on advanced hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 査読有, 22(40). 2016. 8967-8977.

〔学会発表〕(計 12 件)

松本 俊彦, 仁志麻衣子, 藤澤浩一, 高見太郎, 山本直樹, 山崎隆弘, 坂井田功
miR142-3p による肝線維化抑制効果の検討
第 54 回日本肝臓学会総会
2018 年

松本 俊彦, 高見太郎, 坂井田 功
マクロファージ制御による肝線維溶解・肝再生療法の開発
第 16 回日本再生医療学会総会
2017 年

松本 俊彦, 仁志 麻衣子, 藤澤 浩一, 高見 太郎, 山本 直樹, 坂井田 功
マクロファージ Rho family GTPase を標的とした肝線維溶解療法に向けた基盤研究
第 53 回日本肝臓学会総会
2017 年

仁志 麻衣子, 松本 俊彦, 藤澤 浩一, 高見 太郎, 山本 直樹, 坂井田 功
骨髄間葉系幹細胞によるマクロファージ MMP 発現の制御
第 53 回日本肝臓学会総会
2017 年

仁志 麻衣子, 松本 俊彦, 坂井田 功
骨髄間葉系幹細胞による microRNA を介した肝線維化改善機序の検討
第 25 回 JDDW2017

2017年

Tatsuro Nishimura, Taro Takami, Ryo Sasaki, Yuki Aibe, Takashi Matsuda, Toshihiko Matsumoto, Koichi Fujisawa, Naoki Yamamoto, Isao Sakaida
Nonclinical proof-of-concept for "hepatic artery infusion of cultured autologous bone marrow mesenchymal stem cells" in a canine liver fibrosis model
AASLD The Liver Meeting 2017
2017

松本 俊彦、高見 太郎、坂井田 功
マクロファージにおけるアクチン重合制御による線維溶解療法の開発
第52回日本肝臓学会総会
2016年

松本 俊彦、高見 太郎、坂井田 功
自己骨髄細胞による肝臓再生療法の臨床実施とそのメカニズム解析
第102回日本消化器病学会総会
2016年

松本 俊彦、高見 太郎、坂井田 功
マクロファージのアクチン重合制御による肝線維溶解療法の開発
第23回肝細胞研究会
2016年

松本 俊彦、高見 太郎、坂井田 功
肝線維化治療に向けたマクロファージの表現型制御
第16回肝疾患フォーラム学術集会
2016年

Toshihiko Matsumoto, Maiko Nishi, Koichi Fujisawa, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Isao Sakaida.
Rho family GTPase regulate MMPs expression and pro-inflammatory phenotype of macrophages in fibrotic liver.
AASLD The Liver Meeting 2016
2016

Toshihiko Matsumoto, Stephen Jenkins, Koichi Fujisawa, Taro Takami, Naoki Yamamoto, John Iredale, Isao Sakaida.
Interaction with collagen matrix modulates macrophage expression of MMPs in part by controlling cell shape.
APASL 2016
2016

〔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
松本 俊彦 (MATSUMOTO, Toshihiko)
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70634723
- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし
- (4)研究協力者
仁志 麻衣子 (NISHI, Maiko)
松浦 桂司 (MATSUURA, Keiji)
藤澤 浩一 (FUJISAWA Koich)
高見 太郎 (TAKAMI, Taro)
山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)
末廣 寛 (SUEHIRO, Yutaka)
山崎 隆弘 (YAMASAKI, Takahiro)
坂井田 功 (SAKAIDA, Isao)