

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09438

研究課題名（和文）Drug repositioning による肝疾患進展抑制治療法の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic method to suppress liver disease progression by drug repositioning

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） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：今回の基盤研究において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を本研究にて確立することができた。腸内細菌と肝線維化に関する検討課題においても大きな成果を得た。肝硬変症例においては、透過性関連マーカーの変動は内因性エンドトキシンの変動とほぼ並行して推移しており腸管透過性亢進による内因性エンドトキシンの関与について明らかにすることができた。さらに新たなバイオマーカーの探索に関しても新規視点からの大きな成果を得た。本課題において慢性肝疾患患者のVWFやADAMTS13などが様々な診断に有用なバイオマーカーとなる可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は未だ治療法が確率されていない慢性肝疾患の終末像である肝硬変にたいして多面的アプローチによる病態の解明、新規治療法への基礎的知見、特に腸肝相関に注目した内因性エンドトキシンの役割について明らかにすると共に各種血清マーカーが肝疾患における様々な病態に有用であることを明らかにしており、慢性肝疾患患者の予後改善に大きく寄与し得る成果を獲得できた。

研究成果の概要（英文）：In this research, we were able to obtain results close to the original goals for each application item. A drug delivery system using hyaluronan micelles is established in this study. Significant results have also been obtained in the subject of studies on intestinal bacteria and liver fibrosis. In patients with liver cirrhosis, changes in permeability-related markers were parallel to changes in endogenous endotoxin, and it was possible to clarify the involvement of endogenous endotoxin due to increased intestinal permeability. Furthermore, we have obtained great results from a new perspective regarding the search for new biomarkers. In this study, we found that VWF and ADAMTS13 in patients with chronic liver disease could be useful biomarkers for various diagnosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝硬変 肝線維化 エンドトキシン 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、肝疾患に対するマネージメントは大きく変貌している。例えば、C型肝炎に対する抗ウイルス療法は経口抗ウイルス薬(DAA)の登場により大きく変貌したが、HCVが消失したからと言ってC型肝炎が治癒した訳ではなく、高齢患者が多い我が国においては肝硬変をはじめとした背景肝に対するマネージメントは临床上重要な問題である。生活習慣病の増加に伴い非アルコール性脂肪肝炎(NASH)も重要な問題となっている。NASHの予後規定因子は線維化の制御であることが近年明らかにされていることから、慢性肝障害の成因に関わらず肝線維化進展および発癌予防法の確立は慢性肝疾患患者の生命予後改善のために喫緊の課題である。作用の機序の異なる薬剤を組み合わせることで単剤投与よりもより強い効果を示す「カクテル療法」について基礎的・臨床的知見を重ねてきた。一方、肝線維化の改善には肝再生の促進が重要であることが報告されている。また、高血圧薬として広く使用されているアンジオテンシン受容体阻害薬(ARB)が肝前駆細胞(HPC)の分化を胆管細胞への分化に重要な役割を果たしているNotch-1の作用を阻害することで、肝細胞への分化を促進し実験的肝線維化モデルにおいて肝再生が促進されることを明らかにしてきたことから、これらの知見を基盤として、本研究では臨床応用へ向けさらなる発展を目指した。

2. 研究の目的

ARBは本研究までの基盤研究で肝前駆細胞(HPC)の分化誘導による肝再生促進作用、線維化伸展に伴い毛細血管化(capillarization)している内皮細胞に対する血管新生因子VEGF抑制などを介する血管新生抑制作用、および活性化肝星細胞に対する増殖抑制作用など線維化進展部位で重要な役割を果たしている多くの細胞に作用することが明らかであることから、これらの作用がより強力に発揮できるように細胞レベル、生体レベルにおいて詳細に検討し治療戦略の最適化を行うこととした。また、平行して腸内細菌制御との相乗効果についても検討を行うこととした。

3. 研究の方法

本研究では、ARBによるNotch-Jagシグナル抑制によるHPC分化誘導との関連を含め解析を加えた。EXとして細胞実験ではLPSを用いて、星細胞やKupffer細胞におけるTLR4受容体の関連を含めて抗生剤、Probiotics、ARBなどの各薬剤において様々な組み合わせによる処理を行って検討した。効果発現機序の検討としてシグナル伝達に加えて自然免疫との関連が示唆されている各種サイトカイン発現なども含め多面的に解析を行った。また、*in vitro*で得られた成果に基づいて*in vivo*での検討を中心に解析を行った。

4. 研究成果

基礎的検討において、CDAA投与ラットでは肝線維化進展により腸管のタイトジャンクション蛋白であるZO-1の発現量が低下し、肝内のLPSを反映するLPS結合蛋白(LBP)の発現量が上昇していた。RFX投与により腸管のZO-1発現が改善するとともに肝内LBPの発現が低下し、肝線維化が改善傾向を示していた。ヒト肝硬変症例においては、腸管透過性と関連する血清中のsoluble CD163、soluble mannose受容体の値はRFX投与により有意な低下を認めた。これら透過性関連マーカーの変動はEAAの変動とほぼ並行して推移しており腸管透過性亢進による内因性エンドトキシンの関与について明らかにすることができた。

腸内細菌と肝線維化に関する検討課題においても大きな成果を得た。肝硬変症例における腸内細菌の変化に加えて最終年度では原発性胆汁性胆管炎症例(PBC)での変化についても詳細な検討を加え新たな知見を得た。PBC群では、健常人と比べて腸内細菌叢の多様性は有意に低下しており、PBC群の便採取時点における搔痒感などの臨床症状、胆道系酵素や肝予備能と腸内細菌叢の間に関連は認められなかった。予後予測式に関しては、当科が提唱したNara criteriaのUDCA反応不良群(服用開始1年後のGTP低下率が69%未満)とUDCA反応良好群(同69%以上)の2群において、性別、BMI、血清学的所見に有意差は認めなかったが、Faecalibacterium属が反応不良群で有意に

減少していた ($p < 0.05$)。PPI 投与群では、非投与群と比べて有意に *Streptococcus* 属、*Enterococcus* 属が増加しており、*dysbiosis* を呈していたが、*Faecalibacterium* 属に関して有意な変化は認めなかった。これらの結果より UDCA 反応性と腸内細菌叢の関連が示唆され、PBC の長期予後とも関連する可能性について報告した。

さらに、肝硬変患者においても食事成分との関連についても検討して新たな治験を得た。難吸収性抗菌薬のリファキシミン(Rfx)を用いて、Rfx による肝硬変 (LC) の病態改善効果について腸内細菌制御を中心に臨床的に解析した。ミニマル脳症を含む肝性脳症合併 LC 患者 20 例(全例 Child B)に 4 週間 RFX を投与し前後での血中アンモニア(NH₃)、Et および炎症性サイトカインの変化について検討した。血中 Et 測定は EAA(Endotoxin Activity Assay)を用いて測定した。さらに糞便中の腸内細菌叢の変化を 16S rRNA シーケンスを用いて解析した。その結果以下の成果を得た。RFX 投与により血清 NH₃ 値の低下と共に、ナンバーコネクションテスト(NC)も改善した。また EAA も RFX 投与により有意に低下し、投与前後の EA と NH₃ 変化量は正の相関を示した($r = 0.524$, $P < 0.05$)。一方、血清中の TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、IL-10 は治療前後で有意な変化を認めなかった。腸内細菌叢解析では、多様性、および門、綱、目レベルでの組成においては RFX 投与による変化を認めなかったが、*Veillonella*、*Streptococcus* 属において RFX 投与後で減少を認めていた。さらに腸管透過性との関連についても検討を加えて新たな知見を得た。基礎的検討において、CDAA 投与ラットでは肝線維化進展により腸管のタイトジャンクション蛋白である ZO-1 の発現量が低下し、肝内の LPS を反映する LPS 結合蛋白(LBP)の発現量が上昇していた。RFX 投与により腸管の ZO-1 発現が改善するとともに肝内 LBP の発現が低下し、肝線維化が改善傾向を示していた。ヒト肝硬変症例においては、腸管透過性と関連する血清中の soluble CD163、soluble mannose 受容体の値は RFX 投与により有意な低下を認めた。これら透過性関連マーカーの変動は EAA の変動とほぼ並行して推移しており腸管透過性亢進による内因性エンドトキシンの関与について明らかにすることができた。

さらに新たなバイオマーカーの探索に関しても昨年までの成果に加えて新規視点からの大きな成果を得た。本課題において慢性肝疾患患者の VWF や ADAMTS13 の発現変化を解析し、それらが肝発癌予測および肝癌早期診断のバイオマーカーに成り得るかを検討し、血中 VWF 抗原量および VWF/ADAMTS13 比は、既存の AFP などの肝癌マーカーに比して各々肝発癌予測および肝癌早期診断に有用なバイオマーカーとなる可能性を示した。最終年度は肝硬変の病態において重要な役割を果たしているとされているカルニチンに関して検討を加えた。近年非アルコール性脂肪肝炎(NASH)において、アシルカルニチン(AC)が HCC で上昇することが報告されている。我々はウイルス性 HCC を中心とした非 NASH 症例における、AC の動態について検討した。その結果、非 NASH と NASH では異なる動態を示すことが示され、非 NASH 症例においては、VEGF と関連し、HCC 早期診断に有用なバイオマーカーとなる可能性を見いだした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Seki K, Kitade M, Nishimura N, Kaji K, Asada K, Namisaki T, Moriya K, Kawaratani H, Okura Y, Takaya H, Sawada Y, Sato S, Nakanishi K, Yoshiji H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Oral administration of fructose exacerbates liver fibrosis and hepatocarcinogenesis via increased intestinal permeability in a rat steatohepatitis model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 28638-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25587. eCollection 2018 Jun 19.	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 Saikawa S, Kaji K, Nishimura N, Seki K, Sato S, Nakanishi K, Kitagawa K, Kawaratani H, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Yoshiji H.	4. 巻 434
2. 論文標題 Angiotensin receptor blockade attenuates cholangiocarcinoma cell growth by inhibiting the oncogenic activity of Yes-associated protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 120/129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.07.021. Epub 2018 Jul 19.	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 Sawada Y, Kawaratani H, Kubo T, Fujinaga Y, Furukawa M, Saikawa S, Sato S, Seki K, Takaya H, Okura Y, Kaji K, Shimozato N, Mashitani T, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Mitoro A, Yamao J, Yoshiji H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Combining probiotics and an angiotensin-II type 1 receptor blocker has beneficial effects on hepatic fibrogenesis in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 285-289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13281	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 Nishimura N, Kaji K, Kitade M, Aihara Y, Sato S, Seki K, Sawada Y, Takaya H, Okura Y, Kawaratani H, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Yoshiji H	4. 巻 18
2. 論文標題 Acyclic retinoid and angiotensin-II receptor blocker exert a combined protective effect against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in diabetic OLETF rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer.	6. 最初と最後の頁 164-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12885-018-5099-6.	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 Takaya H, Kawaratani H, Tsuji Y, Nakanishi K, Saikawa S, Sato S, Sawada Y, Kaji K, Okura Y, Shimozato N, Kitade M, Akahane T, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Matsumoto M, Fukui H, Yoshiji H	4. 巻 6
2. 論文標題 von Willebrand factor is a useful biomarker for liver fibrosis and prediction of hepatocellular carcinoma development in patients with hepatitis B and C.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 United European Gastroenterol J.	6. 最初と最後の頁 1401-1409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2050640618779660.	査読の有無 無
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 Kaji K, Takaya H, Saikawa S, Furukawa M, Sato S, Kawaratani H, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Mitoro A, Yoshiji H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Rifaximin ameliorates hepatic encephalopathy and endotoxemia without affecting the gut microbiome diversity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 8335 8366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v23.i47.8355	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 Kaji K, Nishimura N, Seki K, Sato S, Saikawa S, Nakanishi K, Furukawa M, Kawaratani H, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Yoshiji H.	4. 巻 142
2. 論文標題 Sodium glucose cotransporter 2 inhibitor canagliflozin attenuates liver cancer cell growth and angiogenic activity by inhibiting glucose uptake.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1712 1722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31193	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, Moriya K, Kitade M, Takeda K, Kaji K, Okura Y, Shimozato N, Sato S, Nishimura N, Seki K, Kawaratani H, Takaya H, Sawada Y, Akahane T, Saikawa S, Nakanishi K, Kubo T, Furukawa M, Noguchi R, Asada K, Kitagawa K, Ozutsumi T, Tsuji Y, Kaya H, Yoshiji	4. 巻 1
2. 論文標題 Effect of combined farnesoid X receptor agonist and angiotensin tipe 1 receptor blocker on hepatic fibrosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hepatol commun.	6. 最初と最後の頁 928 945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1104	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 8件）

1. 発表者名 Takaya H, Kaji K, Saikawa S, Furukawa M, Sato S, Sawada Y, Kawaratani H, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Mitoro A, Yoshiji H
2. 発表標題 Rifaximin ameliorates hepatic encephalopathy and endotoxemia without affecting the gut microbiome diversity
3. 学会等名 EASL (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akahane T, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Takaya H, Shimozato N, Sato S, Yoshiji H
2. 発表標題 Moderate alcohol consumption protects against fatty liver in males
3. 学会等名 EASL (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takaya H, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Shimozato N, Akahane T, Moriya K, Kawaratani H, Sawada Y, Seki K, Sato S, Nakanishi K, Yoshiji H
2. 発表標題 Ratio of Von Willebrand Factor to ADAMTS13 is a Novel Potential Biomarker for Early Diagnosis of HCC
3. 学会等名 APASL (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaji K, Saikawa S, Takaya H, Sato S, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Yoshiji H
2. 発表標題 Rifaximin alleviates endotoxemia with improvement of intestinal hyperpermeability and minor changes in fecal microbiota in cirrhotic patients with hepatic encephalopathy
3. 学会等名 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Takaya H, Namisaki T, Kaji K, Kitade M, Tsuji Y, Fujinaga Y, Furukawa M, Nakanishi K, Seki K, Sato S, Sawada Y, Saikawa S, Shimozato N, Kawaratani H, Asada K, Moriya K, Akahane T, Yoshiji H
2 . 発表標題 Identification of von willebrand factor-to-ADAMTS13 ratio as a potential biomarker for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with liver cirrhosis
3 . 学会等名 AASLD (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Takaya H, Kaji K, Saikawa S, Furukawa M, Sato S, Sawada Y, Kawaratani H, Kitade M, Moriya K, Namisaki T, Akahane T, Mitoro A, Yoshiji H
2 . 発表標題 Rifaximin ameliorates hepatic encephalopathy and endotoxemia without affecting the gut microbiome diversity
3 . 学会等名 EASL (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Shimozato N, Namisaki T, Moriya K, Kitade M, Takeda K, Kawaratani H, Kaji K, Okura Y, Takaya H, Sawada Y, Nishimura N, Sato S, Saikawa S, Seki K, Furukawa M, Nakanishi K, Kubo T, Yoshiji H
2 . 発表標題 Beneficial effects of combined farnesoid X receptor agonist(INT747) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitor(sitagliptin) on hepatic fibrogenesis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis
3 . 学会等名 AASLD (国際学会)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Takaya H, Kaji K, Kitade M, Seki K, Saikawa S, Nishimura N, Sato S, Sawada Y, Okura Y, Kawaratani H, Akahane T, Moriya K, Namisaki T, Mitoro A, Yoshiji H
2 . 発表標題 ADAMTS13 deficiency exacerbates acute liver failure with enhanced VWF accumulation and hepatic inflammation in mice.
3 . 学会等名 AASLD (国際学会)
4 . 発表年 2017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	鍛治 孝祐 (Kaji Kosuke) (20623490)	奈良県立医科大学・医学部・学内講師 (24601)	
研究 分担者	北出 光輝 (Kitade Mitsuteru) (40526795)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	