

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591748

研究課題名（和文）肝虚血再灌流障害に対する分子細胞標的治療法の開発

研究課題名（英文）Cellular and molecular target therapy for hepatic ischemia-reperfusion injury

研究代表者

田代 裕尊（Tashiro Hirotaka）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90359894

研究成果の概要（和文）：

Rhoキナーゼ阻害剤を肝星細胞に効率よく運搬する新たなDrug Delivery Systemを作製し、肝虚血再灌流障害の分子・細胞標的治療法を開発する研究を行った。まず、GFPを内包化したビタミンAリポソーム体の全身投与では、肝類洞壁にGFPの集積を認めた。Rho阻害剤を内包化したビタミンAリポソーム体は、Rho阻害剤単身の投与に比較し、約100分の1の投与量でラット虚血再灌流障害を改善させることが判明し、低血圧などの副作用も軽減することができた。

研究成果の概要（英文）：

We have developed the vitamin A-coupled liposomes containing Rho kinase inhibitor to attenuate the hepatic ischemia-reperfusion injury in rat. First, GFP was specifically detected in the sinusoidal linings when the vitamin A-coupled liposome containing GFP was administered systemically. We have also confirmed that the liposomes have ameliorated the ischemia-reperfusion injuries at the dose of one-hundreds compared with alone Rho kinase inhibitor, with attenuating the side effects such as a hypotension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝虚血再灌流障害・肝星細胞・Rhoキナーゼ阻害剤・リポソーム・ビタミンA

1. 研究開始当初の背景

肝臓に対する肝切除や肝不全や肝細胞癌などに対する生体肝移植は、今日日常の治療手段として行われているが、今尚いくつかの解決すべき課題が残されている。

大量肝切除や過小グラフトや脂肪肝を用いた生体部分肝移植では、術後肝不全に陥ることがしばしば見られ、その主要な肝障害のメカニズムの一つに肝虚血再灌流障害が挙げられる。

われわれは、肝移植モデルを用いて肝虚血再灌流障害の治療のメカニズムの解明と治療法の開発に関する研究を行ってきた。その中で、smallGTP 蛋白である Rho シグナル下流にある Rho キナーゼの阻害剤の投与により、移植肝の虚血再灌流障害が軽減されることを報告した、すなわち肝類洞内皮細胞とそれを裏打ちする星細胞が虚血再灌流により活性化・収縮することにより類洞を狭小化し、肝血流障害が引き起こされる事を明らかにし、さらに ROCK 阻害剤により星細胞の活性化が抑制され肝組織中の末梢循環の改善が得られ肝虚血再灌流障害が軽減されることを明らかにした (Mizunuma, Tashiro et, Transplantation 2003)。

一方、Rho シグナルは、体細胞においては、そのシグナルは生理学的に細胞の運動、接着、分裂などを司る重要なシグナル伝達系である。そのため、全身投与では低血圧などの副作用が報告され、より選択的な Drug delivery system が求められる。一般的に、星細胞は、類洞循環を調節作用としての機能以外にも Retinol-binding タンパクのレセプターを発現しビタミン A 貯蔵細胞としても作用する。この特性を利用し、肝硬変治療にコラーゲン特異的シャペロンであるヒートショックプロテイン 47 に対する small interfering RNA (SiRNA) をリポソーム化 (ビタミン A を含む) し、肝硬変ラットに投与し、肝硬変の進行を軽減化できる事が報告された (Nature biotechnology, 2008)。そこで、Rho キナーゼ阻害剤をリポソーム (ビタミン A を含む) 化しその複合体を作成することで、より選択的に星細胞に取り込まれ、効率的に Rho キナーゼ阻害剤を投与することが可能となることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、肝星細胞を標的に、肝虚血再灌

流障害の新たな治療法を開発する。星細胞はエンドセリンや NO に反応し、その収縮活動と緊張状態により類洞血流を調節している。そこで、肝虚血再灌流障害の治療に星細胞を標的に、星細胞に特異性が高いビタミン A をリポソームと併用し新たな Drug Delivery System として利用し、その星細胞の収縮活動の制御シグナルである Rho キナーゼを阻害するキナーゼ阻害剤を星細胞に効率よく運搬することによる肝虚血再灌流障害の新たな治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

Rho 阻害剤 (Fasdil) をビタミン A と伴にリポソームで複合体を作製し、まず単利したラット星細胞への取り込み効率を確認し、さらにラット虚血再灌流障害モデルおよび肝移植モデルに投与し、肝虚血再灌流障害の軽減が可能か否かを研究する。

4. 研究成果

1. 肝星細胞に親和性の高いビタミン A をリガンドとして Rho キナーゼ阻害剤を内包化したリポソーム体を作製し、その内包化率を液体クロマトグラフィーにより測定し、至適配合比率を決定した。
2. 同リポソーム体の肝星細胞への取り込みを確認するため、Rho キナーゼ阻害剤の代わりに GFP を内包化させ、ラットに同リポソーム体を静注した。肝への取り込みは心・肺・腎などの他臓器に比較し有意に高かった。また、肝星細胞への特異性を確認するため、デスミンによる二重染色で類洞壁に高い特異性を持って GFP が取り込まれていることを確認した。
3. 分離したラット肝星細胞への同リポソーム体の作用を確認するため、collagen gel-contraction assay を用いて検討した。Rho 阻害剤単身とリポソーム体で比較すると、同リポソーム体は約 100 分の 1 の濃度で非リポソーム体と同様に肝星細胞の収縮を抑制した。
4. ラット虚血再灌流障害モデル (全肝 45 分阻血) を作製し、同リポソーム体と Rho 阻害剤単身の効果を比較すると、上記 collagen gel-contraction assay の結果と同様に、同リポソーム体は Rho 阻害剤

単身の約100分の1の投与量で術後3時間のGOT値を同程度に抑制した。

5. ラット虚血再灌流障害モデル(全肝70分阻血)での実験では、未治療群はラットの1週間生存率では0%であったが、Rho阻害剤単身では10mg/kgで100%生存を得られた。一方、同リポソーム体では0.1mg/kgで100%生存が得られた。つぎに同リポソーム体によるRho阻害剤の副作用(低血圧)抑制効果を確認した。Rho阻害剤単身の投与では1mg/kgで体血圧は平均90mmHgから約40mmHgへ低下するも、同リポソーム体ではラット虚血再灌流障害モデルにおける抑制効果が得られた。0.1mg/kgでは体血圧は平均90mmHgから約70mmHgへの低下にとどまった。

以上の結果から、Rho阻害剤を内包化したビタミンAリポソーム体は、Rho阻害剤単身の投与に比較し、約100分の1の投与量でラット虚血再灌流障害を改善させることが判明し、さらにRho阻害剤の投与量が少ないことで低血圧などの副作用も軽減することができた。

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 11件)

1. Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in the rat steatotic liver. *J Hepatology* 2012; 56: 146-152. 査読有り
2. Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda K, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, Ohdan H. Impact of pegylated-interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol* 2012; 19:418-425. 査読あり
3. Shimomura M, Okajima M, Hinoi T, Egi H, Takakura Y, Kawaguchi Y, Tokunaga M, Adachi T, Tashiro H, Ohdan H. Identification of patients likely to benefit from metastasectomy in stage IV colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2012, in press. 査読有り
4. Oshita A, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ide K, Takaki S, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K, Ohdan H. Safety and Feasibility of Diet-Treated Donors With Steatotic Livers at the Initial Consultation for Living-Donor Liver Transplantation. *Transplantation* 2012, in press. 査読あり
5. Iwako H, Tashiro H, Amano H, Tanimoto Y, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Nambu J, Mikuriya Y, Abe T, Ohdan H. Prognostic Significance of Antithrombin III Levels for Outcomes in Patients with Hepatocellular Carcinoma After Curative Hepatectomy. *Ann Surg Oncol.* 2012, in press. 査読有り
6. Takakura Y, Okajima M, Kanemitsu Y, Kuroda S, Egi H, Hinoi T, Tashiro H, Ohdan H. External Validation of two nomograms for predicting patients survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *World J Surg* 2011, 35: 2275-2282. 査読あり
7. Amano H, Tashiro H, Oshita A, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Itamoto T, Asahara T, Ohdan H. Significance of platelet count in the outcomes of hepatectomized

- patients with hepatocellular carcinoma exceeding the Milan criteria. J Gastrointest Surg. 2011; 15: 1173-1181. 査読有り
8. **Tashiro H**, Aikata H, Waki K, Amano H, Oshita H, Kobayashi T, Tanimoto Y, Kuroda S, Tazawa H, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. Treatment strategy for early hepatocellular carcinomas: Comparison of radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization and surgical resection. J Surg Oncol 2011, 104: 3-9. 査読有り
9. Kobayashi T, Itamoto T, **Tashiro H**, Kuroda S, Tazawa H, Tanimoto Y, Ushitora Y, Oshita A, Amano H, Ohdan H. Factors relating to tumor do not influence the prognosis of solitary hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy, J HBP science, 2011, 18: 689-699. 査読有り
10. Kuroda S, **Tashiro H**, Kobayashi T, Oshita A, Amano H, Ohdan H. Selection Criteria for Hepatectomy in Patients with Hepatocellular Carcinoma Classified as Child-Pugh Class B. World J Surg, 2011; 35: 834-841. 査読有り
11. Ushitora Y, **Tashiro H**, Takahashi S, Amano H, Oshita A, Kobayshi T, Chayama K, Ohdan H. Splenectomy in chronic hepatic disorders: portal vein thrombosis and improvement of liver function. Digestive Surgery 2011;28:9-14. 査読あり

[学会発表] (計 5件)

1. 黒田慎太郎, **田代裕尊**, 五十嵐友香, 谷

- 本新学, 大下彰彦, 小林剛, 天野尋暢, 楠部潤子, 大段秀樹. 脂肪肝における虚血再灌流障害の機序とその治療法. 第47回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2. 東京
2. 黒田慎太郎, **田代裕尊**, 藤國宣明, 楠部潤子, 田澤宏文, 谷本新学, 小林剛, 大下彰彦, 天野尋暢, 番匠谷将孝, 井手健太郎, 尾上隆司, 大段秀樹. Child-Pugh B 原発性肝細胞癌に対する肝切除・肝移植症例の検討. 第66回日本消化器外科学会総会. 2011. 7. 13. 名古屋
3. **田代裕尊**, 相方浩, 谷本新学, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹. C型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後のPEG-IFN療法による予後改善効果. 第47回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2. 東京
4. **田代裕尊**, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 尾上隆司, 井手健太郎 大段秀樹. 再肝切除における術後胆汁漏の予防. 第66回日本消化器外科学会総会. 2011. 7. 13-7. 15. 名古屋
5. **田代裕尊**, 茶山一彰, 大段秀樹. ドナー由来活性化リンパ球細胞療法による生体肝移植後の敗血症予防. 第15回日本肝臓学会大会. 2011. 10. 20-23. 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 裕尊 (Tashiro Hirotaka)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：90359894

(2) 研究分担者

木村 康浩 (Kimura Yasuhiro)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：80314756

(3) 連携研究者

()

研究者番号：