

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590392

研究課題名(和文) カロリ病+先天性肝線維症の新規薬物療法の探索 - 動物モデルPCKラットを用いて

研究課題名(英文) Therapeutic approaches for biliary dysgenesis of the PCK rat, an animal model of Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis

研究代表者

佐藤 保則 (Sato, Yasunori)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30324073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：カロリ病+先天性肝線維症の動物モデルとして確立されたPCKラットを用い、肝胆管病変の形成におけるPI3K/Akt/mTORを介した細胞内シグナル伝達の関与、ならびにその阻害剤の治療への応用性を検討した。PCKラット培養胆管細胞を用いた検討で、NVP-BEZ235(PI3K+mTOR阻害剤)は細胞増殖と嚢胞形成を抑制し、これは培養胆管細胞のアポトーシス抑制とオートファジー誘導を伴っていた。In vivoでPCKラットにNVP-BEZ235を投与すると、PCKラットの胆管拡張と肝線維化を有意に軽減させることが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Using the PCK rat, an animal model of Caroli's disease with congenital hepatic fibrosis, the involvement of the PI3K/Akt/mTOR pathway in biliary dysgenesis was examined in terms of therapeutic application. NVP-BEZ235 (an inhibitor of PI3K and mTOR) significantly inhibited cell proliferative activity and cystic growth of the cultured PCK cholangiocytes, which was accompanied by inhibition of apoptosis and induction of autophagy in the cells. In vivo, administration of NVP-BEZ235 significantly improved dilatation of intrahepatic bile ducts and liver fibrosis of the PCK rat.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：人体病理学 肝臓 胆管細胞 肝線維嚢胞性疾患

1. 研究開始当初の背景

カロリ病は肝内胆管の多発性、進行性の嚢状拡張を示す疾患で、高率に先天性肝線維症 (congenital hepatic fibrosis, CHF) を合併する。カロリ病 + CHF は常染色体劣性多発性嚢胞腎 (autosomal recessive polycystic kidney disease, ARPKD) の肝胆管病変としても知られる。

カロリ病 + CHF はまれな疾患で、その病因病態に関する研究はこれまでほとんど行なわれてこなかったが、その動物モデルとして polycystic kidney (PCK) ラットが見出されて以降、その研究は飛躍的に進歩した。現在まで PCK ラットの肝胆管病変と腎嚢胞の形成に関わる細胞内シグナル伝達が検討され、病態の改善に有効ないくつかの薬物療法が報告されている。

カロリ病の肝内胆管の拡張機序は腎嚢胞の形成と共通する点も多い。ARPKD では腎嚢胞での PI3K/Akt/mTOR の活性化があることが報告されているが、PCK ラットの肝胆管病変の形成における PI3K/Akt/mTOR の関与はこれまで十分検討されていない。

2. 研究の目的

カロリ病 + 先天性肝線維症の動物モデルとして確立された PCK ラットを用い、その肝内胆管拡張と肝線維化における PI3K/Akt/mTOR の関与を明らかにし、この細胞内シグナル伝達の阻害剤が新たな薬物療法の候補となりうるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

In vitro での検討として、PCK ラット肝内胆管より単離、樹立した培養胆管細胞を使用した。mTOR 阻害剤が培養胆管細胞の細胞増殖活性やアポトーシス、オートファジーに及ぼす効果を単層培養の条件下で検討した。胆管細胞の嚢胞 (spheroid) 形成はゲルマトリックスを用いた 3 次元培養で評価した。mTOR には mTOR complex 1 (mTORC1) と mTOR complex 2 (mTORC2) の 2 つの複合体が存在し、それ

ぞれを標的とした複数の阻害剤の効果を検討した。使用した mTOR 阻害剤は mTORC1 阻害剤 (sirolimus, everolimus)、mTORC1+C2 阻害剤 (PP242)、mTORC1+C2 + PI3K 阻害剤 (NVP-BE2235) である。

In vivo での検討として、免疫組織化学により PCK ラットの組織切片上での PI3K/Akt/mTOR 細胞内シグナル伝達関連分子の発現を検討した。また、PCK ラットに NVP-BE2235 (20 mg/kg) を 4 週間、腹腔内に連日投与し、肝胆管病変や腎嚢胞に及ぼす効果を検討した。

4. 研究成果

PCK ラットの培養胆管細胞を用いた検討で、sirolimus, everolimus, PP242, NVP-BE2235 は培養胆管細胞の細胞増殖を濃度依存性に抑制した。3 次元培養で PP242 と NVP-BE2235 は胆管細胞の嚢胞形成を抑制したが、sirolimus, everolimus に嚢胞形成の抑制効果はなかった。sirolimus, everolimus, PP242 は胆管細胞にアポトーシスを誘導し、NVP-BE2235 はアポトーシスを抑制した。胆管細胞のオートファジーは PP242, NVP-BE2235 により誘導された。

NVP-BE2235 は PCK ラットの培養胆管細胞の p-Akt, p-S6K, p-4E-BP1, cleaved caspase 3 の発現を抑制し、Bcl-2 の発現を誘導した。LC3 siRNA および 3-methyladenine によるオートファジー阻害は、NVP-BE2235 の培養胆管細胞に対する細胞増殖抑制効果を軽減した。さらに LC3 siRNA は 3 次元培養下で NVP-BE2235 による嚢胞形成抑制効果を軽減した。

培養胆管細胞を用いた検討で、NVP-BE2235 が最も細胞増殖抑制効果が高かったことから、NVP-BE2235 (20 mg/kg/day) を in vivo で PCK ラットに投与した。その結果、PCK ラットの肝内胆管拡張は有意に抑制され、肝線維化の程度も有意に軽減した (図 1)。肝組織からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し PI3K/Akt/mTOR 細胞内シグナリングに

関与する分子の発現を検討すると、NVP-BEZ235 非投与群のPCKラット肝では正常ラット肝と比較して胆管細胞での p-Akt と p-mTOR の発現亢進があったが、これら分子の発現は NVP-BEZ235 投与群で低下した。また、NVP-BEZ235 は胆管細胞にオートファジーの誘導とアポトーシスの抑制効果を示し、これは in vitro での成績と同様であった。腎臓に関しては、NVP-BEZ235 投与は影響を与えなかった。

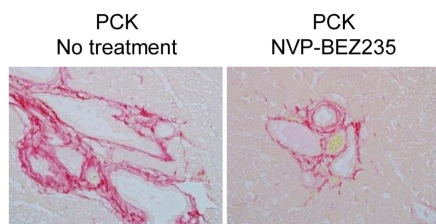


図1 PCKラットにおけるNVP-BEZ235の投与効果 (シリウスレッド染色)

NVP-BEZ235 投与により体重減少が有害事象として生じたことから、阻害剤の投与量 (20 mg/kg/day) についてはさらに検討する必要があるが、今回の結果から NVP-BEZ235 はPCKラットの胆管拡張と肝線維化を軽減させる効果を有することが示された。

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5件)

1. Ren XS, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Furubo S, Song JY, Nakanuma Y. Activation of the PI3K/mTOR pathway is involved in cystic proliferation of cholangiocytes of the PCK rat. PLoS One. 査読有. 2014, 30;9(1):e87660. DOI: 10.1371/journal.pone.0087660.
2. 佐藤保則. Caroli 病と先天性肝線維症の病態解析 - 動物モデル PCK ラットから得られた新たな知見. 金沢大学十全医学会雑誌. 査読無. 2013, 122:24-28.
3. Sato Y, Ren XS, Nakanuma Y. Therapeutic approaches for biliary dysgenesis of the PCK rat, an animal model of Caroli ' s disease with congenital hepatic fibrosis. Pediatrics

& Therapeutics. 査読無 . 2013, :1000166.

DOI: 10.4172/2161-0665.1000166.

4. Sato Y, Ren XS, Nakanuma Y. Caroli's Disease: Current Knowledge of Its Biliary Pathogenesis Obtained from an Orthologous Rat Model. Int J Hepatol. 査読有. 2012, 107945. DOI: 10.1155/2012/107945.
5. Ren XS, Sato Y, Harada K, Sasaki M, Yoneda N, Lin ZH, Nakanuma Y. Biliary infection may exacerbate biliary cystogenesis through the induction of VEGF in cholangiocytes of the polycystic kidney (PCK) rat. Am J Pathol. 査読有 . 2011, 179(6):2845-2854. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.08.028.

[学会発表](計2件)

1. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Nakanuma Y. Effects of mTOR inhibitors on the biliary cystogenesis of the PCK rat, an animal model of Caroli ' s disease. 第 62 回米国肝臓病学会. モスコーンセンター. サンフランシスコ. 2011年11月4日-8日 .
2. 任香善, 佐藤保則, 原田憲一, 佐々木素子, 中沼安二. カロリ病モデル PCK ラットにおける mTOR 阻害薬による胆管上皮細胞の増殖抑制効果. 第 100 回日本病理学会総会. パシフィコ横浜. 横浜. 2011年4月28日-30日 .

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 保則 (SATO YASUNORI)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号：30324073

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：