

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861172

研究課題名(和文) Drug Delivery Systemを用いた肝硬変に対する新規治療薬の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapeutic agents for liver cirrhosis using retinoic acid-modified adenosine encapsulating Liposome

研究代表者

田村 孝史 (Tamura, Takafumi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：20633192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：有効性の確立した肝線維化治療法は肝移植のみであり、他の治療法の確立が必要である。我々は肝線維化が血小板増加により抑制される事を報告した。また血小板はアデニンヌクレオチドを介し肝星細胞の活性化を抑制し、Ⅰ型コラーゲン産生を抑制することを報告した。そこで肝類洞内に存在する肝星細胞に直接的作用を及ぼすレチノイン酸に着目し、レチノイン酸修飾アデノシン封入リポソームを作成することで選択的に肝線維化を抑制する事を試みた。不死化ヒト肝星細胞株に対しアデノシン添加することによりTWNT-1の活性化が抑制されることを確認した。しかし、線維化モデル動物に対してはアデノシンの有効性を証明することが困難であった。

研究成果の概要(英文)：Currently, liver transplantation is the only way to treat the hepatic fibrosis, it is necessary to establish the other treatments. We have reported that hepatic fibrosis is inhibited by increased platelet. Also Platelets inhibit the activation of hepatic stellate cells via an adenine nucleotide and suppress the type I collagen production. Retinoic acid has been reported to be a direct effect on hepatic stellate cells. Therefore, we attempted to selectively suppress hepatic fibrosis by creating a retinoic acid-modified adenosine encapsulating liposomes. Activation of TWNT-1 was confirmed to be suppressed by the addition of adenosine for TWNT-1. However, in the fibrosis model animals, it was difficult to prove the effectiveness of adenosine.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝星細胞 Drug Delivery System 肝線維化 アデノシン

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、厚生労働省はウイルス性肝炎を国内最大の感染症と位置づけ、国民の間で肝疾患に対する予防や治療法への注目が集まっている。現在 170 万人が慢性肝炎となっているが、そのうち約 40%は肝硬変から肝細胞癌を発生する。我が国の HCV の特徴は抗ウイルス療法に反応しにくい 1b 型が大多数を占めることであり、線維化の進行とともに肝癌の発生率が高くなる。また、メタボリックシンドロームの一種である非アルコール性脂肪性肝疾患は本邦でも成人の 15~30%が有する疾患であり、そのうち約 10%は非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に進行する。

(2) NASH は肝臓への脂肪沈着に加えて壊死炎症性変化を示し、肝硬変から肝細胞癌を発症する。しかし、C 型慢性肝炎、ならびに NASH における病態の進行ならびに発癌を効果的に抑制する治療法は全くないのが現状であり、その開発が社会的に強く求められている。これまでの線維化抑制の研究は遺伝子導入や SiRNA を用いた研究が多く、実用化に至っていない。海外では、重篤な慢性・急性肝疾患に対する有効的な治療として脳死後臓器提供による肝移植療法が一般的であるが、本邦ではドナー不足による困難な状況で、生体部分肝移植が健康なドナーの犠牲の上に行われている現状を鑑みると、誰もが容易に享受できる治療法の開発が社会的な急務である。

2. 研究の目的

有効性の確立した肝線維化治療法は肝移植のみであり、他の治療法の確立が必要である。我々は肝線維化が血小板増加により抑制される事を報告した。また血小板はアデニンヌクレオチドを介し肝星細胞の活性化を抑制し、I 型コラーゲン産生を抑制することを報告した。そこで肝類洞内に存在する肝星細胞に直接的作用を及ぼすレチノイン酸に着

目し、レチノイン酸修飾アデノシン封入リポソームを作成することで選択的に肝線維化を抑制する事を試みた。

3. 研究の方法

本研究では肝星細胞の活性化を抑制させるキープクターとしてのアデノシンに着目し、アデノシンによる肝星細胞活性化抑制メカニズムの詳細な解明を行う。さらにアデノシンを選択的に取り込ませるため、**drug delivery system (DDS)**、具体的にはアデノシンをリポソーム内に封入し、レチノイド酸を **Ligand** として修飾したものを開発し、アデノシンを肝星細胞に取り込ませる。さらに過大肝切除、肝線維化、劇症肝炎、NASH の各種肝障害マウスにレチノイン酸修飾アデノシン封入リポソームを投与し、病態制御と肝線維化抑制効果を検討する。加えてレチノイン酸修飾アデノシン封入リポソームのヒト初代培養肝星細胞および肝硬変患者の初代培養肝星細胞に対する抗線維化作用を検討し、その有用性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 肝星細胞に対するアデノシンの影響の検討: *in vivo* において、不死化ヒト肝星細胞株にアデノシンを添加し、形態が活性化型から静止型へと変化することを確認した。 α -SMA の発現がアデノシン添加により抑制されることを **Western blot** で確認した(Fig1).

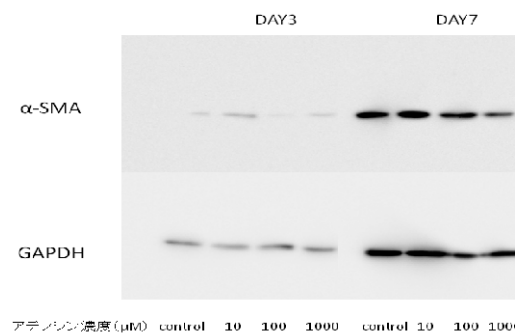


Fig1. アデノシン添加による TWNT-1 活性化抑制

(2) 肝線維化モデル動物の作成: SD ラットに胆管結紮を施行し, 線維化傾向を検討した. 胆管結紮後 1w-5w の組織標本を Masson trichrome 染色 (以下, MT 染色) により評価した. 胆管結紮後 1w で Glisson 周囲の線維化を認め, 経時的に架橋形成が増強し不可逆性の線維化を生じていたため, 実験モデルを SD ラット胆管結紮 1w 以内の系に設定することとした(Fig2).

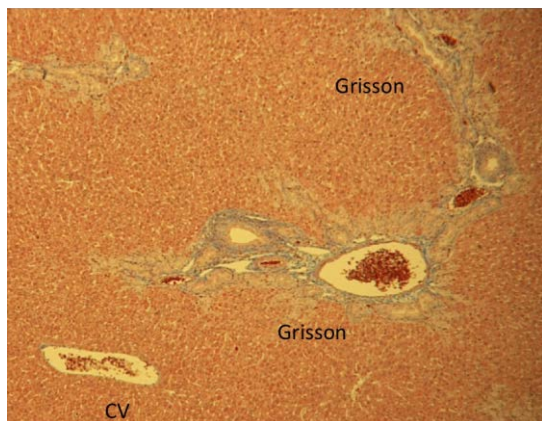


Fig2. 胆管結紮 1w 後の MT 染色(×40)

(3) 肝線維化モデル動物におけるアデノシンの影響の検討: 予備実験 1 として, sham 手術群, 胆管結紮群, 胆管結紮およびアデノシン静注 (単回投与) 群の 3 群を設定し, 血液生化学 (AST, ALT, T-bil), 肝組織標本(MT 染色), Western blot (α -SMA), PCR(COL1A1)を比較した. 胆管結紮群, 胆管結紮およびアデノシン投与群では, 組織, Western blot, PCR とも線維化傾向がみられたが, アデノシン投与の有無での有意差を認めるものではなかった(Fig3/Fig4). 予備実験 2 として, 胆管結紮後の PBS 複数回投与群とアデノシン複数回投与群(胆管結紮直前と 24, 48, 72 時間後の計 4 回)を行い, 結紮 96 時間後に犠牲死させ評価したが組織, Western blot, PCR とも線維化傾向がみられたが, アデノシン投与の有無での有意差を認めるものではなかった(Fig5/Fig6).

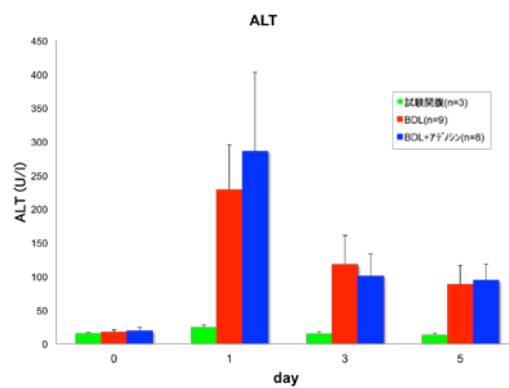


Fig3. 予備実験 1 における ALT 値

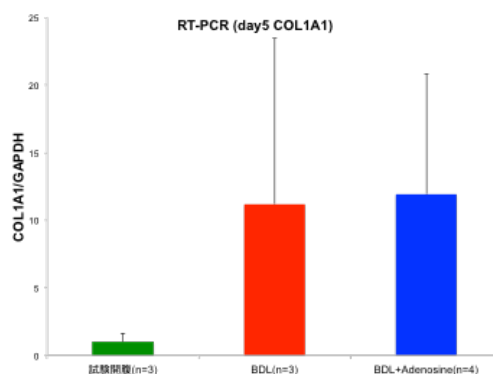


Fig4. 予備実験 1 における PCR(COL1A1)

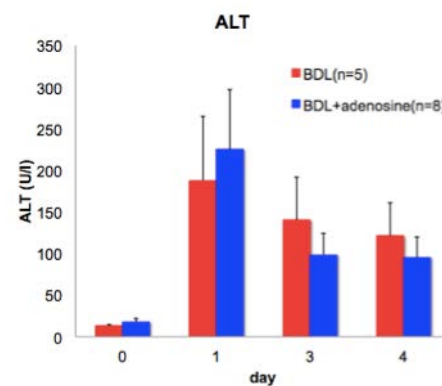


Fig5. 予備実験 2 における ALT 値

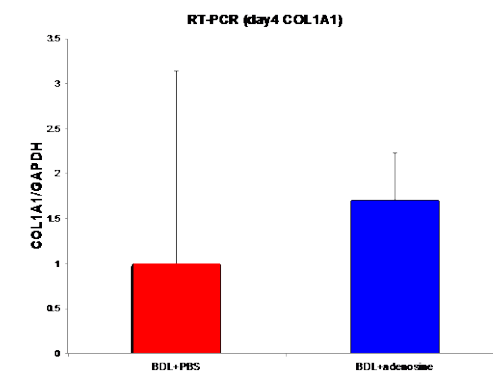


Fig6. 予備実験 2 における PCR(COL1A1)

アデノシンの全身投与では *in vitro* で効果の見られた濃度 $1000 \mu\text{M}$ ($267.24 \mu\text{g/ml}$) を肝局所で維持することは困難であることが判明した。そこで、レチノイン酸修飾アデノシン封入リポソームの作成を試みたが、電荷の問題などで **Drug Delivery** としての有効性を示す結果を得られなかった。現在、リポソーム化ではない新規の製剤を作成することを目標に研究を継続中である。

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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村孝史 (TAMURA Takafumi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号 : 20633192