

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461017

研究課題名(和文) 肝前駆細胞と既存薬剤を用いた肝疾患進展抑制治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic approaches against chronic liver diseases with combination of hepatic progenitor cells and clinical available agents

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究期間において効率的な肝再生を伴う肝前駆細胞(HPC)と臨床で使用されている薬剤を用いて慢性肝疾患進展抑制法の開発に繋がる多くの成果を得た。さらに、HPCの分化運命を胆管上皮細胞に向けているNOTCHを特異的に阻害するNOTCH1阻害薬を用いて生体における肝線維化抑制効果について検討し成果を得た。HPCと既存薬剤の併用によるハイブリッド療法、既存薬剤によるMultipleカクテル療法など多面的アプローチにより、さらに効果的な慢性肝疾患進展抑制治療法を開発する基礎的知見を得たことから、本研究による成果は近い将来臨床応用が可能であり、慢性肝疾患患者の予後向上に大きく寄与し得ると考える。

研究成果の概要(英文)：During the period of this grant, we revealed many new findings about the usefulness of the combined cocktail therapy with hepatic progenitor cells (HPC) and clinical available agents such as angiotensin II receptor blocker (ARB) in several types of animal models of liver fibrosis development and hepatocarcinogenesis. Even at clinical comparable low doses of these agents, we observed significant inhibitory effects on the liver fibrosis development, hepatocarcinogenesis, and the growth of hepatocellular carcinoma (HCC) with many publications in international journals. Furthermore, we observed that specific NOTCH-1 inhibitor significantly suppressed the liver fibrosis development along with augmentation of hepatic regeneration. It is well known that augmentation of liver regeneration would play a pivotal role for improvement of hepatic reserve. Collectively, our studies with this grant could contribute to the improvement of prognosis in patients with chronic liver diseases.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝線維化 肝再生 肝前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

成因に関わらず慢性肝疾患患者の予後を規定するのは肝硬変への進展および肝発癌であり、肝線維化進展抑制、および肝発癌・再発予防治療法の確立は慢性肝疾患患者の予後を飛躍的に改善すると考えられる。我々はこれまで2002年より継続してきた基盤研究で、既存薬剤を用いた肝線維化および肝発癌に対する治療法開発を行ってきた。本研究では、これまでの研究で得られた成果をさらに発展させると共に、効率的な肝再生を伴う肝前駆細胞 (HPC) と既存薬剤の併用によるハイブリッド療法、既存薬剤による Multiple カクテル療法など多面的アプローチにより、さらに効果的な慢性肝疾患進展抑制治療法を開発し、早期に臨床に還元することを目的として研究を開始した。

2. 研究の目的

本基盤研究では以下の二項目を研究目標として設定した。

A: HPC とアンジオテンシン II 受容体阻害薬 (ARB) 併用投与による効率的肝再生を伴う肝線維化抑制治療法の開発。ARB を用いたのはこれまでの基盤研究で ARB やアンジオテンシン II 変換酵素阻害薬 (ACE-I) が血管新生および活性化肝星細胞 (HSC) に対し直接的抑制効果を示し、肝線維化進展を著明に抑制することを見いだしていたため、ARB の効果について HPC を併用することにより増強させようと考えた。

B: 個別化カクテル療法および Response-guided 療法の効率的開発。すでに臨床で使用され安全性が確立している明日の診療から使える薬剤を用いて効果的な治療法を探索していくという点で臨床応用に向けた現実性が高く、医療経済上も有効なアプローチと考えられる。さらに、治療効果を予測し得るバイオマーカーの探索を行う。

3. 研究の方法

HPC と ARB 併用投与による効率的肝再生を伴う肝線維化抑制治療法の開発のために HPC や線維化進展において中心的役割を果

たしている活性化肝星細胞 (HSC) の細胞株を用いて各種シグナル解析などを行った。いて生体における影響について解析を加えた。HPC と HSC の interaction につき解析するために、マウスに、HPC を強く誘導する 5-diethoxycarbonyl- 1,4- dihydrocollidine (DDC) を 4 週間投与して HPC 増加を伴う実験的肝線維症を作成した。本モデルに ARB であるを投与して HPC の分化効率、および HSC との関連を A6、CK19、および SMA 免疫染色にて解析した。

4. 研究成果

(1) 平成 26 年度の成果

In vitro 実験系においては、HSC 株 (LX-2) の conditional medium による HPC 株の分化誘導効率につき検討した。その結果、DDC 投与により HPC の著明な増加を伴う肝線維化の進展が見られた。ARB の投与により肝線維化が著明に抑制されると共に、有意な肝重量増加が見られたことから ARB による効率的な肝再生促進が示唆された。肝線維化進展に伴って A6 陽性、CK19 陽性の HPC は SMA 陽性 HSC に取り囲まれるように増加したが、ARB 投与にて HSC は線維化と平行するように減少し、A6 陽性、CK19 陰性の HPC 由来新生肝細胞数が有意に増加した。一方、*in vitro* 実験系において HSC 由来の conditional medium により HPC の胆管細胞分化が促進され、肝細胞分化能は著明に低下することを確認した。

(2) 平成 27 年度の成果

平成 27 度は HPC と ARB の相互作用について主に HPC 細胞株を用いて検討を行ない、次年度からの生体での検討に向けた基礎的データを得る事ができた。HSC は HPC の niche 構成細胞としても知られており、HPC と HSC の interaction が肝線維化など障害肝の再生過程において重要な役割を果たすことが示唆されている。我々はこれまでの基盤研究において ARB の肝線維化抑制効果について報告してきた。今年度は、ARB により肝線維化を制御した際の HPC の分化運命および肝再生効率について検討すると共に、*in vitro* での HPC と HSC の interaction につき

解析した。マウスに、HPC を強く誘導する 5- diethoxycarbonyl- 1,4- dihydrocollidine (DDC)を 4 週間投与して HPC 増加を伴う実験的肝線維症を作成した。本モデルに ARB である Losartan (7.5mg/kg/day)を投与して HPC の分化効率、および HSC との関連を A6、CK19、および SMA 免疫染色にて解析した。その結果、肝線維化進展に伴う HSC 活性化は HPC の分化運命を胆管細胞に向けていることを確認した。

(3) 平成 28 年度の成果

最終年度は HPC と ARB の相互作用に加えて、HPC の分化運命を胆管上皮細胞に向けている NOTCH を特異的に阻害する NOTCH1 阻害薬を用いて生体における肝線維化抑制効果について検討し成果を得た。我々はこれまでの本基盤研究において、障害肝において NOTCH1 を制御すると HPC の分化運命が胆管上皮細胞から肝細胞に向かうことにより効率的な肝再生をきたす事を報告してきた。今回は、マウス肝線維化モデルにおける新規 NOTCH1 選択的阻害剤による肝再生治療の可能性について検討した。マウスに、HPC を強く誘導する DDC を 4 週間投与して HPC 増加を伴う実験的肝線維症を作成して多方面からの解析を行った。また、マウス HPC 株における NOTCH1 阻害剤の肝細胞分化効率についても in vitro で解析を加えた。その結果、NOTCH1 阻害薬投与群では有意な肝重量増加、血清 T-bil 値低下を呈し、NOTCH1 制御による肝再生促進が示唆された。組織学的検討を行ったところ、両群とも A6/CK19 両陽性 HPC が見られたが、NOTCH1 阻害薬投与群において A6 陽性・CK19 陰性の新生肝細胞数が増加する一方、A6/CK19 両陽性新生胆管数は減少していた。また、マウス HPC 株の肝細胞分化効率は、NOTCH1 阻害剤の投与によって増加した。これらの結果より、NOTCH1 制御によって HPC の分化運命が胆管上皮細胞から肝細胞

に傾き、その結果肝再生が効率的に行われた事が示唆された。以上の結果より新規 NOTCH1 阻害剤による肝線維化抑制と共に、HPC 分化運命制御を介した効率的な肝再生治療の可能性を確認した。

これら3年間にわたる本研究で明らかにし得た新規発見は、近い将来臨床応用が可能であり、慢性肝疾患患者の予後改善にきわめて有用であると考えられる。

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 14 件)

1: Combined treatment with dipeptidyl peptidase-4 inhibitor (sitagliptin) and angiotensin-II type 1 receptor blocker (losartan) suppresses progression in a non-diabetic rat model of steatohepatitis.

Okura Y, Kitade M, Yoshiji H. Hepatol Res.

2016 Dec 28. PMID: 28029729 doi:

10.1111/hepr.12860

2: Liver fibrosis progression predicts survival in patients with primary biliary cirrhosis.

Namisaki T, Kitade M, Yoshiji H. Hepatol Res. 2016 May 18. PMID: 27189879

3: Ipragliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, ameliorates the development of liver fibrosis in diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Nishimura N, Kitade M, Yoshiji H. J Gastroenterol. 2016 Dec;51(12):1141-1149. PMID:27025708

Epub 2016 Mar 29.

4: The relationship between hepatic progenitor cell-mediated liver regeneration and non-parenchymal cells. Kitade M, Yoshiji H. Hepatol Res. 2016 Feb 19. PMID: 2689545 doi: 10.1111/hepr.12682.

5: Efficacy of alogliptin in preventing

- non-alcoholic fatty liver disease progression in patients with type 2 diabetes. Mashitani T Kitade M, Yoshiji H. Biomed Rep. 2016 4(2):183-187. PMID: 26893835
- 6: Treatment for cirrhotic ascites. Kawaratani H, Yoshiji H. Hepatol Res. 2016 Jul 1. PMID: 27363974
- 7: DNA methylation of angiotensin II receptor gene in nonalcoholic steatohepatitis-related liver fibrosis Asada K, Kitade M, Yoshiji H. World J Hepatol. 2016 Oct 8;8(28):1194-1199. PMID:27729955
- 8: Clinical significance of the Scheuer histological staging system for primary biliary cholangitis in Japanese patients. Namisaki T, Kitade M, Yoshiji H. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2017 Jan;29(1):23-30. PMID:27755231
- 9: DNMT1 is a required genomic regulator for murine liver histogenesis and regeneration. Kaji K, Hepatology. 2016 64(2):582-98. PMID: 26999257
- 10: Oncogenic driver genes and the inflammatory microenvironment dictate liver tumor phenotype. Kaji K, Kitade M, Yoshiji H. Hepatology. 2016 63(6):1888-99. PMID: 26844528
- 11: Beneficial effects of combined ursodeoxycholic acid and angiotensin-II type 1 receptor blocker on hepatic fibrogenesis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Namisaki T, Kitade M, Yoshiji H. J Gastroenterol. 2015 Jul 21. PMID: 26190501
- 12: Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. Douhara A, Kitade M, Yoshiji H. Mol Med Rep. 2015 11(3):1693-700. PMID: 25421042
- 13: Curcumin effectively inhibits oncogenic NF- κ B signaling and restrains stemness features in liver cancer. Kitade M, J Hepatol. 2015 63(3):661-9. PMID: 25937435
- 14: Differential expression of drug uptake and efflux transporters in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. Namisaki T, Kitade M, Yoshiji H. Drug Metab Dispos. 2014 42(12):2033-40. PMID: 25231932
- 15: Combination of sorafenib and angiotensin-II receptor blocker attenuates preneoplastic lesion development in a non-diabetic rat model of steatohepatitis. Kitade M, Yoshiji H. J Gastroenterol. 2014 49(10):1421-9. PMID: 24197250
- 16: Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor attenuates hepatic fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cell in rats. Kaji K, Kitade M, Yoshiji H. J Gastroenterol. 2014 49(3):481-91. PMID: 23475323
- 17: MYC activates stem-like cell potential in hepatocarcinoma by a p53-dependent mechanism. Kitade M. Cancer Res. 2014 74(20):5903-13. PMID: 25189530
- 18: Antitumor effects in hepatocarcinoma of isoform-selective inhibition of HDAC2. Kitade M Cancer Res. 2014 74(17):4752-61. PMID: 24958469
- {学会発表}(計 10件:海外学会のみ)
- 1: Combined treatment of low dose sorafenib and clinically available safety agent; angiotensin- receptor blocker, significantly attenuated the hepatocarcinogenesis via angiogenesis suppression in the rat; Yoshiji H; ILCA

2014. 9. 5

2: Tumor number is the most important factor for recurrence of hepatocellular carcinoma after resection as its initial treatment; Douhara A, Yoshiji H; ; ILCA 2014. 9. 5

3: Direct renin inhibitor attenuates hepatocarcinogenesis via angiogenesis suppression in rats; Kitade M, Yoshiji H; ILCA 2014. 9. 5

4: DNMT1 is essential for effective postnatal and regenerative growth of adult liver. Kaji K, Yoshiji H; AASLD 2015.11.14

5: Attenuation of liver fibrosis development by angiotensin 2-receptor blocker 1-treatment augments hepatocyte differentiation of hepatic progenitor cells. Kitade M, Yoshiji H; AASLD 2015.11.14

6: Impact of the combination of dipeptidyl peptidase IV inhibitor and angiotensin-type 1 receptor blocker on hepatocarcinogenesis in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Okura Y, Yoshiji H; EASL 2016. 4.14

7: Antifibrotic effects of combined treatment with farnesoid X receptor agonist and angiotensin-type 1 receptor blocker on hepatic fibrogenesis in the rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Namisaki T, Yoshiji H; EASL 2016. 4.14

8: DNMT1-deleted hepatocytes cause promoted replicative senescence and induce liver fibrosis development with global DNA hypomethylation. Kaji K, Yoshiji H; AASLD 2016.11.11

9: Combination treatment of dipeptidyl peptidase inhibitor and angiotensin-type 1 receptor blocker attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. Sato S, Yoshiji H; AASLD

2016.11.11

10: Impact of the combination of Farnesoid receptor agonist and angiotensin-type 1 receptor blocker on hepatic fibrogenesis in the rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Namisaki T, Yoshiji H; AASLD 2016.11.11

〔図書〕(計3件：英文図書および筆頭著者のみ)

1: NASH 肝発癌抑制のための薬物療法の可能性：消化器の臨床 17(1):66-71, 2014

2: 非代償性肝硬変：腹水，肝性脳症，栄養療法ほか：今日の治療指針 2015 年版 P535-538: 2015

3: Metabolic Syndrome and the Liver: The Liver in Systemic Diseases: p149-177, 2016

〔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
吉治仁志 (YOSHIJI HITOSHI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40336856

(2)研究分担者
北出 光輝(KITADE MITSUTERU)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：4052795

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()