

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462049

研究課題名(和文)キマーゼ阻害薬・MMP阻害薬を用いた肝類洞閉塞症候の予防および治療効果の検討

研究課題名(英文)reventive and ameliorative effects of chymase inhibitor and MMP inhibitor on sinusoidal obstruction syndrome

研究代表者

米田 浩二 (KOMEDA, Koji)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70531896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：モノクロタリン誘発肝類洞閉塞症候(SOS)マウスに対するキマーゼ阻害薬とMMP阻害薬の効果を検討した。モノクロタリン投与2日後、肝臓組織中キマーゼ活性とMMP-9レベルは有意に増加した。キマーゼ阻害薬とMMP阻害薬はモノクロタリン投与後に増加する血漿中ASTとALTを有意に抑制し、肝臓壊死面積率も有意に抑制した。キマーゼによるMMP-9の増加がSOS発症に関与し、キマーゼ阻害薬とMMP阻害薬はSOS発症予防に有効であった。

研究成果の概要(英文)：The effects of chymase inhibitor and matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor were evaluated in monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome (SOS) mice. Both hepatic chymase activity and MMP-9 level were significantly augmented 2 days after monocrotaline administration. Significant increases of plasma AST and ALT were significantly decreased by chymase and MMP inhibitors, and the ratio of hepatic necrotic area was also significantly attenuated. Chymase-dependent MMP-9 augmentation was involved in the development of SOS, and chymase and MMP inhibitors were useful for prevention of the development of SOS.

研究分野：一般・消化器外科学

キーワード：キマーゼ MMP 肝類洞閉塞症候 阻害薬 予防 治療

1. 研究開始当初の背景

化学療法の進歩で、切除不能大腸癌肝転移症例が、腫瘍の縮小効果により切除可能となり、ヨーロッパでは切除可能転移性肝癌に対して標準治療と位置づけられている。一方で、大腸癌化学療法の中でもオキザリプラチンを含む FOLFOX は、高い奏効率を示しており、中心的な役割を果たしているが、肝類洞閉塞症候 (SOS) が指摘され、肝切除後の合併症の増加、偽腫瘍形成、そして、転移との鑑別が困難な場合もみられるなど問題となっている。化学療法後肝障害対策は重要な意味合いを持つものと考えられるが、有効な治療方法がないのが現状である。

我々は肥満細胞由来のキマーゼがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の活性化を介して肝臓の炎症に重要な役割を担っている可能性を動物実験の結果より報告してきた。しかし、SOS におけるキマーゼおよび MMP の役割やその阻害薬を用いた効果については不明であった。

2. 研究の目的

SOS モデルを動物で作製し、SOS 発症におけるキマーゼおよび MMP の役割を明らかにするため、キマーゼ阻害薬とキマーゼの発現細胞である肥満細胞の脱顆粒抑制剤および MMP 阻害薬の効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

・SOS モデル作製および解析時点

6 週齢の雄性マウス (C57 Black/J: 日本エスエルシーより購入) にモノクロタリンの 200 mg/kg を腹腔内に投与した。投与後 2 日、5 日、14 日の時点において麻酔下でヘパリン採血および肝臓の摘出を行った。

・薬物投与方法

キマーゼ阻害薬の影響を検討するために、各阻害薬はモノクロタリンを投与する 3 日前より背部皮下にオスモティックミニポンプ (ALZET MODEL2004) 包埋して持続的に試験期間中投与した。また、キマーゼを発現する肥満細胞との関連性を明らかにする目的で肥満細胞脱顆粒抑制剤をモノクロタリン投与 3 日前より経口投与した。MMP 阻害薬の影響もモノクロタリン投与 3 日前より経口投与した。

採血後、冷蔵遠心機を用いて 4 度、3,000 回転にて 15 分間遠心して血漿を採取し、AST および ALT を測定した。

肝臓組織の一部は、酵素および炎症関連因子を測定するめに摘出直後に液体窒素にて冷凍し、使用するまで -80 度のディープフリーザーにて保存した。また、その他の組織は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて肝臓組織壊死面積比を解析するためにカルノア固定液へ摘出直後に浸漬し、24 時間後にエタノール置換して組織ブロックを作製した。

・生化学的解析

血漿中の AST および ALT の測定はエスアールエルに依頼した。

肝臓組織の抽出液は、肝臓組織に対して 10 倍量のリン酸緩衝液にてホモジネートしたのち冷蔵遠心機を用いて 4 度、12,000 回転にて 30 分間遠心した。その上澄液を廃棄し、沈殿物に 0.1% Triton-X-100 を含有するリン酸緩衝液を用いて再度ホモジネートした。その後、冷蔵遠心機を用いて 4 度、12,000 回転にて 30 分間遠心し、その上澄液を用いてキマーゼ活性、MMP-9 レベルおよび Tumor Necrosis Factor (TNF)- α レベルの測定用の酵素測定用抽出液とした。

キマーゼ活性は、前述の酵素活性測定用抽出液に合成基質である Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-pNA (最終濃度: 2 mM) を添加し、37 度で 30 分間インキュベートしたのち 405 nm にて測定した。

MMP-9 レベルは、マウス MMP-9 測定用 ELISA キット (R&D 社) にてマニュアルに従って実施した。

TNF- α レベルは、マウス TNF- α 測定用 ELISA キット (R&D 社) にてマニュアルに従って実施した。

組織標本を用いて解析を行うため、カルノア固定して作製したブロックより 4 μ m の切片を作製し、HE 染色したのち、壊死面積を定量し、全肝臓組織面積で割ることにより壊死面積率を求めた。

4. 研究成果

・SOS モデル

血漿中 AST と ALT は、モノクロタリンを投与したのち 2 日後において著明に増加した (図.1)。

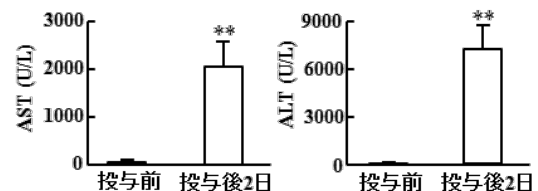


図.1 血漿中 AST および ALT

肝臓組織中のキマーゼ活性は、モノクロタリンを投与したのち 2 日後において著明に増加した (図.2)。

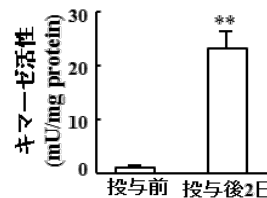


図.2 肝臓組織中キマーゼ活性

肝臓組織中の MMP-9 レベルは、モノクロタリンを投与したのち 2 日後において著明に増加した (図.3)。

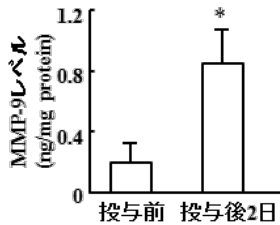


図3. 肝臓組織中 MMP-9 レベル

肝臓組織中の TNF- α レベルは、モノクロタリンを投与したのち 2 日後において著明に増加した (図.4)。

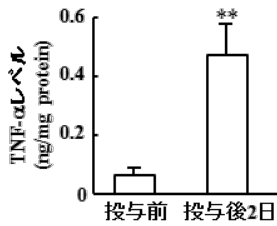


図4. 肝臓組織中 TNF- α レベル

肝臓組織切片を用いて HE 染色した結果、投与前の肝臓組織では壊死像を全く検出できなかったが、モノクロタリン投与後 2 日においては約 50% の壊死面積率を示した。

・キマーゼ阻害薬の効果

キマーゼ阻害薬の影響の有無を確認するため、0.1、0.3、1、3、10 mg/kg のキマーゼ阻害薬をモノクロタリンの投与 1 時間前に尾静脈より投与してモノクロタリン投与後 2 日の時点の血漿中 AST と ALT に対する影響を解析した結果、1 mg/kg 以上のキマーゼ阻害薬の濃度では明らかな低下傾向を示したので 1 mg/kg を用いて SOS に対するキマーゼ阻害薬の効果を検討することにした。

1 mg/kg のキマーゼ阻害薬をオスモティックミニポンプにてモノクロタリン投与 3 日前より持続的に皮下投与したマウスにモノクロタリンを投与し、その 2 日後にキマーゼ阻害薬の影響を解析した結果を以下に示す。

モノクロタリン投与後 2 日の時点における血漿中 AST および ALT に対して、キマーゼ阻害薬投与群はプラセボ群に比して有意な抑制効果を示した (図.5)。

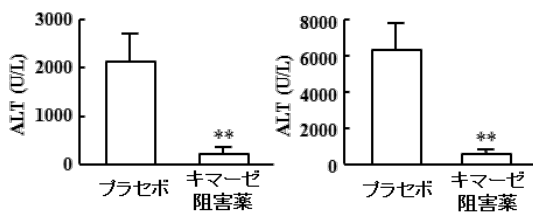


図.5 血漿中 AST および ALT に対するキマーゼ阻害薬の影響

モノクロタリン投与後 2 日の時点における肝臓組織中のキマーゼ活性および MMP-9 レベルは共にプラセボ群に比してキマーゼ阻害

薬群で有意に抑制された (図.6)

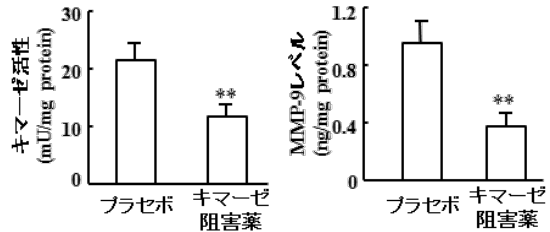


図 6. 肝臓組織中のキマーゼ活性および MMP-9 レベルに対するキマーゼ阻害薬の影響

モノクロタリン投与後 2 日の時点における肝臓組織中の TNF- α レベルおよび肝臓組織切片における壊死面積率に対して、キマーゼ阻害薬投与群はプラセボ群に比して有意な抑制効果を示した (図.7)。

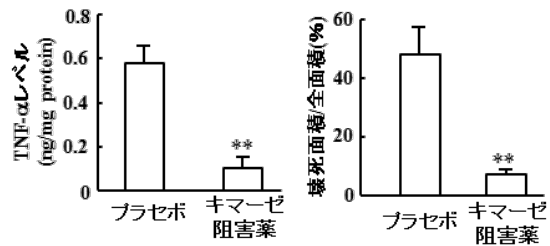


図7. 肝臓組織中の TNF- α レベルおよび肝臓壊死面積率に対するキマーゼ阻害薬の影響

肥満細胞脱顆粒抑制剤の影響の有無を確認するため、10、30、100 mg/kg の肥満細胞脱顆粒抑制剤をモノクロタリン投与 3 日前より経口投与してモノクロタリン投与後 2 日の時点で血漿中 AST と ALT に対する影響を解析した。10、30、100 mg/kg のすべての濃度で肥満細胞脱顆粒抑制剤を用いた有意な変化を認めなかった。また、100 mg/kg の肥満細胞脱顆粒抑制剤を用いた場合でも肝臓組織中のキマーゼ活性に対して有意な影響を示さず、肝臓組織中の MMP-9 レベルに対しても有意な影響を示さなかった。そして、肝臓組織中の TNF- α レベルや肝臓組織中の壊死面積率に対しても影響がなかった。肥満細胞顆粒中に存在するキマーゼの阻害薬が有効であった一方で肥満細胞脱顆粒抑制剤が無効であった理由としては、本モデル作製に使用したモノクロタリンによる刺激が強力だったため、100 mg/kg の濃度を用いても肥満細胞の脱顆粒を抑制できず、放出されたキマーゼを直接阻害できる薬剤でしか本モデルの SOS 発症を予防できなかったと考えられた。

MMP 阻害薬の影響の有無を確認するため、10、30、100 mg/kg の MMP 阻害薬をモノクロタリン投与 3 日前より経口投与してモノクロタリン投与後 2 日の時点で血漿中 AST と ALT に対する影響を解析した結果、100 mg/kg の MMP 阻害薬で有意な抑制効果が確認できた (図.8)

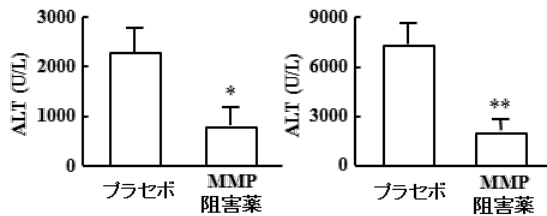


図.8 血漿中 AST および ALT に対する MMP 阻害薬の影響

モノクローリン投与後 2 日の時点における肝臓組織中のキマーゼ活性に対しては抑制傾向を示したものの有意差を認めなかったが、MMP-9 レベルに対しては MMP 阻害薬群で有意に抑制された (図.9)

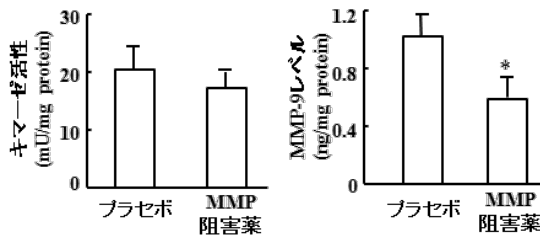
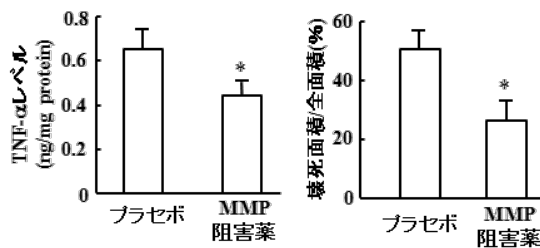


図.9 肝臓組織中のキマーゼ活性および MMP-9 レベルに対する MMP 阻害薬の影響

モノクローリン投与後 2 日の時点における肝臓組織中の TNF- α レベルおよび肝臓組織切片における壊死面積率に対して、MMP 阻害薬投与群はプラセボ群に比して有意な抑制効果を示した (図.10)。



MMP 阻害薬にもキマーゼ阻害薬より弱い傾向であったが、有意な SOS 発症抑制効果を認めた。

以上の結果より、本 SOS モデルにおいて発症初期からキマーゼ活性の上昇に伴って MMP-9 の増加を認め、キマーゼ阻害薬および MMP 阻害薬が共に SOS の発症を予防したことから SOS の発症にキマーゼが活性化する MMP-9 が炎症惹起に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。一方で、肥満細胞脱顆粒抑制剤には効果が認められなかったことより、今後、SOS 発症予防へ向けたキマーゼ阻害薬もしくは MMP 阻害薬の開発が望まれる。

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 2 件)

Osumi W, Jin D, Imai Y, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Maemura K, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. Recombinant human soluble thrombomodulin improved lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure in mice. J Pharmacol Sci (査読有) 129, 2015, 233-239

Imai Y, Takai S, Jin D, Komeda K, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Chymase inhibition attenuates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure in hamsters. Pharmacology (査読有) 93, 2014, 47-56.

[学会発表](計 1 件)

Osumi W, Jin D, Imai Y, Miyaoka Y, Tashiro K, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Nishiguchi K, Uchiyama K. Effect of recombinant human soluble thrombomodulin in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure in mice. Digestive Disease Week 2016, May 23, 2016. Chicago (USA)

[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

米田 浩二 (KOMEDA Koji)
大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：70531896

(2) 研究分担者

高井 真司 (TAKAI Shinji)

大阪医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 80288703

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()