

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861078

研究課題名(和文) 門脈圧亢進症/肝線維化に対するリポソーム化Rhoキナーゼ阻害剤を用いた治療法

研究課題名(英文) Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents liver fibrosis without major systemic adversity in rats

研究代表者

黒田 慎太郎 (Shintaro, Kuroda)

広島大学・大学病院・医科診療医

研究者番号：30457246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Rhoキナーゼ阻害剤は肝疾患などに対する大きな効果が期待されるものの、全身循環への副作用が強く、臨床応用が進まなかった。今回、われわれは、活性化肝星細胞をターゲットに、ビタミンA不可リポソーム体で内包化したRhoキナーゼ阻害剤を利用した、Dug Delivery System (DDS) を用いることで、大きな副作用なく、肝虚血再灌流障害や、肝線維化を抑制することに成功した。今回の検討で、このDDSは肝臓に臓器特異的に、そして肝星細胞に集中して取り込まれることを証明し、その結果、通常量の1/100量で同等以上の効果を示し、また、副作用の低減を確認した。

研究成果の概要(英文)：Rho-kinase (ROCK) inhibitors improve liver blood flow after ischemia/reperfusion (IR) injury or improve liver fibrosis, by preventing the activation of hepatic stellate cell (HSC). However, the systemic administration of ROCK inhibitors causes severe hypotension; therefore, liver-specific ROCK inhibition is required. Here, we tested vitamin A coupled liposomes carrying the ROCK inhibitor for targeted HSCs in rat IR model and liver fibrosis model. Liposomal ROCK inhibitor was 100-fold more effective in inhibiting HSC activation than free ROCK inhibitor without major systemic adversity in rats.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝線維化 星細胞 リポソーム DDS Rhoキナーゼ阻害剤

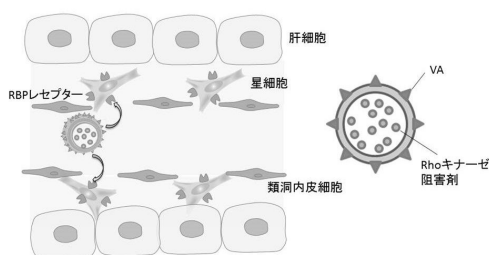
1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は、類洞壁の Disse 腔に存在し、ビタミン A の代謝、門脈系の血流調節などに加え、肝線維化においても重要な役割を果たす。肝障害が起こると、肝星細胞は活性化し増殖因子・コラーゲンなど線維成分を産生する。また、肝硬変に伴う門脈圧亢進症は、肝内血管抵抗の上昇に起因し、そのメカニズムとして肝星細胞の活性化による類洞の収縮も一因とされている。

われわれはこれまで、脂肪肝星細胞における Rho キナーゼ活性は亢進し、収縮能が亢進した、いわゆる活性化状態であり、虚血再灌流(エンドセリン刺激)により Rho キナーゼ活性はさらに亢進し、肝星細胞がより活性化・収縮することで類洞はさらに狭小化し、微小循環障害が増悪する事を解明した。さらに Rho キナーゼ阻害剤は肝星細胞の活性化を抑制し肝類洞微小循環を改善することで脂肪肝虚血再灌流障害を軽減することも明らかにした(文献1)。

しかしながら、Rho シグナルは、生理学的に細胞の運動、収縮、接着、分裂などに関わる重要なシグナル伝達系(文献2, 3)である。そのため、全身投与では全身の血管平滑筋が弛緩し低血圧などの副作用を認めるため、より選択的な Drug Delivery System (DDS)が求められる。一般的に、星細胞は、Retinol-binding protein (RBP) のレセプターを発現しているビタミン A 貯蔵細胞でもある。この特性を利用し、ビタミン A を付加したリポソームに Rho キナーゼ阻害剤を内包化した薬剤を作成することにより、選択的に星細胞に作用させ、ラット肝硬変の進行を軽減化することが求められる。(図1)

(図1)



これまでに、このリポソーム体が、Rho キナーゼ阻害剤単剤と比較し 1/100 の投与量でラット分離肝星細胞の活性化を抑制し (collagen gel-contraction assay で確認) ラット脂肪肝虚血再灌流障害モデルにおいても同様に約 1/100 の少ない量で肝虚血再灌流障害を抑制し、且つ低血圧などの有害事象も軽減できることを明らかにした(申請時投稿中→文献4)。一方、ビタミン A 付加リポソーム体におけるそれぞれの最適とする構成比、その詳細な作用機序、さらに肝硬変症などへの応用については、検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、肝星細胞への同リポソーム体の取り込みのメカニズム、肝星細胞以外の細胞への分布、さらにリポソーム体を構成する成分の最適化を明らかにする。次に同リポソーム体により肝線維化や門脈圧亢進症を軽減できるか否か、またラット肝虚血再灌流障害実験、さらに同リポソーム体の循環系その他の臓器における有害事象の有無について検討する。

以上の検討を行うことにより、肝星細胞への指向性を高めた新たな Drug Delivery System を開発し、肝星細胞の活性化が関わる肝疾患に対する新たな分子・細胞標的治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)リポソーム複合体の最適化、肝星細胞への標的指向性の確認

用いるリポソーム製剤種類ごとの内包化率を検証し Rho キナーゼ阻害剤の内包化率を検証する。また、この GFP を用いたリポソーム体をラットに全身投与し、各臓器における取り込みの定量化を行う。

(2)肝線維化と同じく、肝星細胞の機能不全によって起こる肝虚血再灌流障害モデルにおけるリポソーム体の有効性を確認する。

具体的には、分離活性化肝星細胞の抑制効果を collagen gel-contraction assay、ファロイジン染色を用いて検討する。また、ラット脂肪肝虚血再灌流障害モデルにおいて、薬剤投与による肝機能の改善効果や、生存率を検討する。さらに肝虚血再灌流モデルにおいて、薬剤投与による肝血流、門脈灌流圧の変化を検討する。また、副作用の有無の確認として、薬剤投与時の全身の動脈圧の変化を検討する。

(3)ラット肝硬変モデルに対する同リポソーム体の有効性(線維化の抑制)を検討する。

四塩化炭素を用いたラットに肝線維化を誘導し、免疫組織学的に肝線維化の程度を定量することで安定したモデルを作成する。このラットにリポソーム体と Rho キナーゼ阻害剤単剤の投与を行い、効果を測定する。また、同様に肝線維化ラットモデルに対するリポソーム体投与を行い、生存率、肝機能に与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1)リポソーム複合体の最適化、肝星細胞への標的指向性の確認

用いるリポソーム製剤ごとの内包化率を検証し、正荷電リポソームでの Rho キナーゼ阻害剤の内包化率が最も高いことを確認し、それに肝星細胞に選択的なリガンドとして、ビタミン A を付加した、リポソーム化 Rho キナーゼ阻害剤複合体を作製した。(文献4)

この GFP を用いたリポソーム体をラットに全身投与し、肝、心、肺、腎、小腸、脾臓への取り込みの定量化を行い、このリポソーム体が肝の星細胞に選択的に取り込まれていることを明らかにした。

(2) 肝虚血再灌流障害モデルにおけるリポソーム体の有効性を確認した。

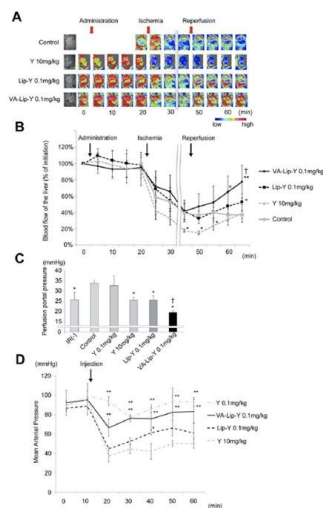
作製したリポソーム体(0.1mg/kg)が Rho キナーゼ阻害剤単剤(10mg/kg)と比較し 1/100 の投与量でラット分離肝星細胞の活性化を抑制することを collagen gel-contraction assay、ファロイジン染色で確認した。

ラット脂肪肝虚血再灌流障害モデルにおいても同様に 1/100 の投与量で肝機能、生存率を有意に改善した。

肝虚血再灌流モデルにおいて、肝血流は有意に低下し、門脈灌流圧の有意な上昇を認めしたが、作製したリポソーム体(0.1mg/kg)が Rho キナーゼ阻害剤単剤(10mg/kg)と比較し 1/100 の投与量で、肝血流の低下は有意に軽減し、また、門脈灌流圧も有意に低下を認めた。(図 2A,B,C)

副作用の有無の確認として、薬剤投与時の全身の動脈圧の変化を検討したところ、Rho キナーゼ阻害剤単剤の投与で見られた有意な血圧低下は、軽度な血圧の変化にとどまった。(図 2D)(文献 4)

(図2)

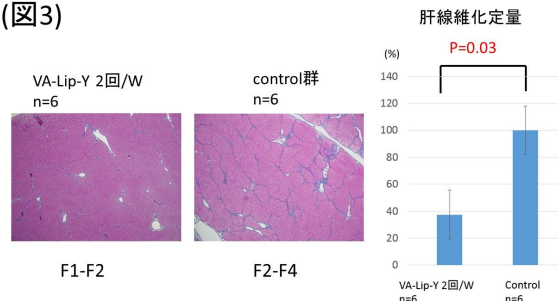


(3) ラット肝硬変モデルに対する同リポソーム体の有効性(線維化の抑制)を検討。

4 週齢 Wistar ラットに四塩化炭素を 0.2ml/kg を週 2 回腹腔内注射、8 週間投与を行ったラット肝線維化モデルの肝組織像を観察した。いずれも新犬山分類 F2-F4 の中等度肝線維化を認めた。これをコントロール群とし、同様に四塩化炭素を投与しながら、作成したリポソーム化 ROCK 阻害剤を四塩化炭素投与開始後 5 週目から合計 3 週間、0.1mg/kg 週 2 回投与し、これを治療群とした。治療群の肝組織像では、F1-F2 の軽度の肝線維化を認めるのみで、薬剤による肝線維化抑制効果を認めた。また、病理組織像から、線維化の量を定量化したところ、コントロール

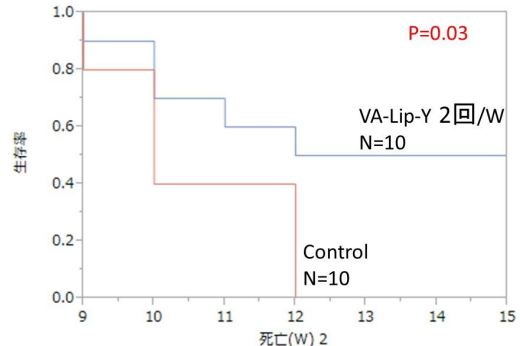
群の線維化を 100% とすると、治療群の線維化は 38% まで有意に軽減されていた($P < 0.05$)。(図 3)

(図3)



同様に四塩化炭素を 15 週まで投与継続し、肝線維化による生存率をみた(コントロール群)。また、治療群としてはリポソーム化 ROCK 阻害剤を四塩化炭素投与開始 5 週目から 0.1mg/kg 週 2 回投与を継続した。治療群の生存率は、コントロール群と比べ有意に改善された。($P < 0.05$)(図 4)

(図4)



過去に、肝星細胞を標的とした、ビタミン A 付加リポソーム体を DDS として使い、コラーゲンに対する siRNA によりラット肝硬変の進行を抑制できることが報告された(文献 5)が、遺伝子を用いた治療は臨床応用へのハードルが高く、以後このシステムを応用した報告はない。また、現在まで肝疾患に対する細胞標的の DDS を用いた治療法も開発されていない。現在までのわれわれの研究において、この DDS を用いることで、Rho キナーゼ阻害剤を単剤による全身投与量の 1/100 の投与量で同程度以上に肝虚血再灌流障害を軽減することを証明した。また、同薬剤単独に比べ、標的指向性が高まったことにより副作用も低減できたため、実臨床への応用に大きな可能性を示した。

本薬剤による肝線維化抑制効果は非常に高く、現在継続中の、長期投与による副作用の確認を行った後に、然るべき学術誌に発表する予定である。

また、この薬剤は、肝虚血再灌流障害や肝線維化以外にも、星細胞の活性化が関与する肝疾患(門脈圧亢進症など)に対する効果も期待され、肝星細胞を標的とした臨床応用可能な新たな治療法の開発も可能となり、肝疾患治療へのインパクトは非常に高い。

(参考文献)

1. Kuroda S, Tashiro H, et al. Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in the rat steatotic liver. *J Hepatology* 56:146-152, 2012.
 2. Ogawa T, Tashiro H, et al. Rho-associated kinase inhibitor reduces tumor recurrence after liver transplantation in a rat hepatoma model. *Am J Transplant.* 7:347-55, 2007.
 3. Hall A et al. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629-635, 2002.
 4. Kuroda S, Tashiro H, et al, Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats. *Liver Transpl.* 21: 123-31, 2015.
 5. Sato Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nature Biotech* 26: 431-442, 2008.
5. 主な発表論文等
- [雑誌論文](計 16 件)
1. Tanimoto Y, Kuroda S, et al, Radiopaque biodegradable stent for duct-to-duct biliary reconstruction in pigs. *Langenbecks Arch Surg.* (査読有り) 2016, [Epub ahead of print] PMID: 27138018 (8人中 番目)
 2. Honmyo N, Kuroda S, et al, Stepwise approach to curative surgery using percutaneous transhepatic cholangiodrainage and portal vein embolization for severe bile duct injury during laparoscopic cholecystectomy: a case report. *Surg Case Rep.* (査読有り) 27, 2016: doi: 10.1186/s40792-016-0154-5. (8人中 番目)
 3. Honmyo N, Kuroda S, et al, Inflammatory pseudotumor of the liver occurring during the course of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma treatment: A case report, *Int J Surg Case Rep.* (査読有り) 20, 2016: 96-100. doi: 10.1016/j.ijscr.2016.01.011. (10人中 番目)
 4. Abe T, Kuroda S, et al, Efficacy and Feasibility of Salvage Living Donor Liver Transplantation after Initial Liver Resection in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Dig Surg.* (査読有り) 33, 2016:8-14. doi: 10.1159/000441397. (13人中 番目)
 5. Taguchi K, Kuroda S, et al, Pseudolymphoma of the liver: a case report and literature review. *Surg Case Rep.* (査読有り) 107, 2015: doi: 10.1186/s40792-015-0110-9. (10人中 番目)
 6. Yano T, Kuroda S, et al, Obstructive jaundice caused by a giant liver hemangioma with Kasabach-Merritt syndrome: a case report. *Surg Case Rep.* (査読有り) 93, 2015: doi: 10.1186/s40792-015-0095-4. (6人中 番目)
 7. Takahashi G, Kuroda S, et al, A case of biliary cystic tumor with repeated hemobilia. *Surg Case Rep.* (査読有り) 34, 2015: doi: 10.1186/s40792-014-0006-0. (10人中 番目)
 8. Abe T, Kuroda S, et al, Prediction of long-term survival by using the Glasgow Prognostic Score in patients with hepatocellular carcinoma after liver transplantation. *Hepatol Res.* (査読有り) 2015, doi: 10.1111/hepr.12597. (10人中 番目)
 9. Abe T, Kuroda S, et al, Prognostic evaluation of mucin-5AC expression in intrahepatic cholangiocarcinoma, mass-forming type, following hepatectomy. *Eur J Surg Oncol.* (査読有り) 41, 2015, 1515-21. doi: 10.1016/j.ejso.2015.07.006. (8人中 番目)
 10. Kuroda S, et al, Administration of antithrombin III attenuates posthepatectomy liver failure in hepatocellular carcinoma. *Dig Surg.* (査読有り) 32, 2015:173-80. doi: 10.1159/000379759. (6人中 番目)
 11. Mikuriya Y, Kuroda S, et al, Clinicopathological features of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Langenbecks Arch Surg.* (査読有り) 400, 2015:471-6. doi: 10.1007/s00423-015-1295-x. (7人中 番目)
 12. Kuroda S, et al, Rho-kinase inhibitor

targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats. *Liver Transpl.* (査読有り) 21, 2015:123-31. doi: 10.1002/lt.24020. (10人中 番目)

13. Mikuriya Y, Kuroda S, et al, Fatty liver creates a pro-metastatic microenvironment for hepatocellular carcinoma through activation of hepatic stellate cells. *Int J Cancer.* (査読有り) 136, 2015: E3-13. doi: 10.1002/ijc.29096. (8人中 番目)

14. Okimoto S, Kuroda S, et al, Pancreaticoduodenectomy with preservation of gastric tube blood flow after esophagectomy: Report of a case. *Int J Surg Case Rep.* (査読有り) 5, 2014: 746-9. doi: 10.1016/j.ijscr.2014.08.007. (9人中 番目)

15. Shimizu S, Kuroda S, et al, Multiple hepatic vein reconstruction using an all-in-one sleeve patch graft technique in living donor liver transplantation: a case report. *Transplant Proc.* (査読有り) 46, 2014: 982-5. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.11.105. (11人中 番目)

16. Tashiro H, Kuroda S, et al, Ischemia-reperfusion injury in patients with fatty liver and the clinical impact of steatotic liver on hepatic surgery. *Surg Today.* (査読有り) 44, 2014: 1611-25. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00595-013-0736-9> (4人中 番目)

〔学会発表〕(計5件)

1. 黒田慎太郎, 亜区域・区域切除における Liver Hanging Maneuver の応用, 第70回日本消化器外科学会総会, 2015年7月15日, 静岡県浜松市
2. 黒田慎太郎, 腹腔鏡下胆嚢摘出術によって生じた胆管損傷症例に対する外科的治療例の提示, 第27回日本肝胆膵外科学会学術集会, 2015年6月11日, 東京都港区
3. 黒田慎太郎, 肝細胞癌肝切除術後肝不全に対する AT-III 製剤使用例の検討, 第115回日本外科学会, 2015年4月16日, 愛知県名古屋市中

4. 黒田慎太郎, 肝細胞癌肝切除術後肝不全に対する AT-III 製剤使用例の検討, 第12回日本消化器外科学会大会, 2014年10月13日, 兵庫県神戸市

5. 黒田慎太郎, 肝星細胞を標的とした肝虚血再灌流障害の制御法の開発, 第114回日本外科学会定期学術集会, 2014年4月3日, 京都府京都市

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 慎太郎 (KURODA SHINTARO)

広島大学病院・医科診療医

研究者番号: 30457246