

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究
分担研究報告書

Acute-on-chronic liver failure に対する老化肝細胞除去治療の基盤研究

研究協力者 寺井崇二 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 教授

研究要旨：【目的】 Acute-on-chronic liver failure (ACLF)は致死率の高い疾患である。根治治療としての肝移植では救命率が改善せず、新規治療開発が望まれる。ACLF の機序には肝細胞老化の関与が示唆されており、老化細胞を除去する薬剤である Navitoclax を用いて、ACLF の新規治療を基盤研究の面から模索した。

【方法】 In vitro では、放射線照射で作成した老化肝細胞に、Navitoclax(1.25 μ M)を添加し、老化肝細胞が減少するか検証した。In vivo では、四塩化炭素とりポポリサッカライドで作成した ACLF マウスに、Navitoclax (50mg/kg) を投与して、肝胆道系酵素、肝老化細胞数、肝細胞分裂数、炎症性サイトカインの変化を計測した。

【結果】 In vitro では、Navitoclax 添加後に老化肝細胞は 36.3%減少($p < 0.05$)した。In vivo では、Navitoclax 投与で肝酵素の低下($p < 0.01$)、肝臓内の老化細胞の 73.4%の減少($p < 0.01$)、肝細胞分裂数の 55.2%の増加($p < 0.01$)を認めた。さらに Navitoclax 投与軍では、肝臓内の炎症性サイトカインである IL-1 β ・IL-6 の発現低下($p < 0.01$)を認めた。

【結論】 In vitro、In vivo の両面から、Navitoclax が肝老化細胞を除去し、ACLF 治療に貢献する可能性があるを示した。介在する機序をさらに検証し、新規治療開発を目指す。

共同研究者

土屋淳紀（新潟大学・准教授）

渡邊雄介（新潟大学・特任助教）

A. 研究目的

ACLF は致死率が高く予後不良な疾患である。ACLF に対する根治治療としては肝移植が存在するが、移植治療は侵襲性が高く、救命率の改善も乏しいため、移植治療に取って代わる新規治療開発が必要である。これまでの研究から、ACLF の発症機序には、肝細胞の老化の関与が示唆されている。そこで今回我々は、老化細胞を排除する薬剤である Navitoclax を用いて、ACLF に対する新規治療を基盤研究の面から模索することとした。

B. 研究方法

In vitro では、Cell-line の肝細胞 (AML12、ATCC 社より購入) に対して放射線照射 (Total 10Gy) を行い、老化肝細胞を作成し、Navitoclax (Selleck 社より購入) を 1.25 μ M の濃度で添加し、48 時間培養した後の老化細胞数の変化 (p21 蛍光免疫染色) と細胞分裂数の変化 (Ki-67 蛍光免疫染色) とサイトカインおよび老化マーカーの mRNA level の変化 (Real-time PCR) を非添加群と比較した。

In vivo では、四塩化炭素 (0.5ml/kg) を 8 週間腹腔内投与した後に 4 倍量の四塩化炭素 (2.0ml/kg) とりポポリサッカライド (1.0 μ g/kg) を腹腔内投与し、急性障害を模

倣して ACLF マウスを作成した。ACLF マウスに、急性障害の直後から Navitoclax (50mg/kg) を 5 日間連続で経口内服投与し、肝胆道系酵素 (血液生化学検査) と肝老化細胞数 (p21 免疫染色) と肝細胞分裂数 (Ki-67 免疫染色) とサイトカインおよび老化マーカーの mRNA level の変化 (Real-time PCR) を、コントロール群 (PBS を経口内服投与) と比較した。

(倫理面への配慮)

実験の際には麻酔薬や鎮痛薬を使用し、動物への苦痛を最小限にして実験を実施した。また、所属機関の実験規則に基づいて動物実験計画書を申請し、動物実験倫理委員会より承認を得て研究を行った。

C. 研究結果

In vitro では、Cell-line の肝細胞へ Navitoclax 添加して 48 時間培養すると、老化肝細胞数 (p21 陽性細胞数) が 36.3%減少 ($p < 0.05$) し、細胞分裂数 (Ki-67 陽性細胞数) が 85.3%増加 ($p < 0.01$) した。また、IL-1 β と TNF- α の mRNA level には変化を認めなかったが、p21 と IL-6 の mRNA level は発現の低下 (それぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$) を認めた。

In vivo では、Navitoclax 投与群で血清 ALT が低下 (389IU/L \rightarrow 147IU/L、 $p < 0.01$) し、肝臓内の老化細胞数 (p21 陽性細胞数) が 73.4%減少 ($p < 0.01$) し、肝細胞分裂数 (Ki-67 陽性細胞数) の 55.2%の増加 ($p < 0.01$) を認めた。さらに Navitoclax 投与群では、全肝臓の p21 の mRNA level の発現低下 ($p < 0.05$) を認め、IL-1 β ・IL-6 の発現低下 (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$) を認めた。

D. 考察

In vitro の結果から、Navitoclax は、老

化した肝細胞を除去し、それに伴って老化細胞に由来した炎症性サイトカイン (SASP) を減少させる可能性を認めた。

In vivo では、In vitro で想定した通り、Navitoclax は、ACLF 肝臓内の老化細胞を排除し、老化細胞由来の SASP を減少させた。その結果、肝臓の炎症が軽減し、分裂肝細胞が増加して、最終的に ACLF 治療に貢献する可能性を認めた。

E. 結論

In vitro、In vivo の両面から、Navitoclax が肝老化細胞を除去し、ACLF 治療に貢献する可能性があるを示した。今回の結果に介在する機序をさらに検証し、新規治療開発を目指していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

渡邊雄介、土屋淳紀、寺井崇二・Improvement of hepatocyte senescence for acute on chronic liver failure・日本消化器病学会総会 International session・WEB 開催・2021 年 4 月 15 日

渡邊雄介、土屋淳紀、寺井崇二・Acute on chronic liver failure モデルに対する老化肝細胞除去治療の基礎的検討・日本肝不全研究会パネルディスカッション・WEB 開催・2021 年 6 月 16 日

渡邊雄介、土屋淳紀、寺井崇二・Acute on chronic liver failure に対する老化肝細胞除去治療の基盤研究・肝類洞壁細胞研究会 Basic research session・新潟県新潟市・2021 年 12 月 16 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし