

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メカニズム解析

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。これまでの研究で、ACLF には肝老化細胞が多数存在し、老化細胞除去薬である Navitoclax を用いることで、ACLF を改善させることを明らかにした。今回は Navitoclax により ACLF を改善させることができるメカニズムを明らかにするために、ミトコンドリア機能に着目してさらなる解析を実施した。

**【方法】**放射線照射で作成した老化肝細胞に、Navitoclax (1.25 $\mu$ M)を添加した前後でのATPの変化量と膜電位の変化量を計測した。四塩化炭素とリポポリサッカライドで作成したACLFマウスに、Navitoclax (50mg/kg)を投与した前後でのATPの変化量を計測した。

**【結果】**放射線照射で作成した老化肝細胞において、ATPはNavitoclax投与後に34.9%増加( $p < 0.05$ )、膜電位は58.9%上昇( $p < 0.01$ )した。ACLFマウスにおいて、ATPはNavitoclax投与後に43.2%増加( $p < 0.01$ )した。

**【結論】**In vitro、In vivoの両面からミトコンドリア機能評価を実施し、ACLFに対してNavitoclaxが効果を示す背景には、ミトコンドリア機能の改善が介在する可能性があると考えられた。さらなる検証を行い、ACLFに対する新規治療開発を目指したい。

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)

ズムを明らかにするために、ミトコンドリア機能に着目して、さらなる解析を実施した。

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。これまでの研究で、ACLFには肝老化細胞が多数存在し、老化細胞除去薬である Navitoclax を用いることで、ACLF を改善させることを明らかにした。今回は、同薬により ACLF を改善させることができるメカニ

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 $\mu$ Mの濃度で添加し、添加後48時間時点でのATP合成量を吸光度測定法により計測し、添加していない群のATP合成量と比較解析した。また、同様の方法で、膜電位の計測を蛍光免疫染色で実施して、Navitoclaxを添加していない群の膜電位と

比較解析した。

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) とリポポリサッカライド (1.0 $\mu$ 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、7 日後に肝組織を採取して ATP 合成量を吸光度測定法により計測した。計測値をコントロール群 (PBS を経口内服投与) の肝組織における ATP 合成量と比較解析した。

(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 の肝細胞へ放射線を照射して肝老化細胞化すると照射前と比べて ATP 合成量が 46.5% 低下した ( $p < 0.01$ )。Navitoclax を添加して 48 時間培養すると、ATP 合成量は 34.9% 増加した ( $p < 0.05$ )。膜電位について、同様に放射線を照射すると、照射前と比べて膜電位は 81.6% 低下した ( $p < 0.01$ )。Navitoclax を添加して 48 時間培養すると、膜電位は 63.2% 増加した ( $p < 0.05$ )。

In vivo では、ACLF マウスの肝組織における ATP 合成量は Wild マウス肝組織と比較すると 73.2% 低下していた ( $p < 0.01$ )。一方で Navitoclax 投与群の肝組織における ATP 合成量は ACLF マウス肝組織と比較して 43.2% 上昇していた ( $p < 0.01$ )。

#### D. 考察

In vitro と In vivo の結果において、Navitoclax 投与後に ATP 合成量や膜電位が有意に増加していた結果から、Navitoclax が ACLF に対して効果を示す過程に、ミトコンドリア機能の改善が介在している可能性が考えられた。

#### E. 結論

Navitoclax が肝組織内のミトコンドリア機能を改善し、ACLF 治療に貢献する可能性がある。今回の結果を基盤にして ACLF に対する新規治療開発を目指していく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yusuke Watanabe, Atsunori Tsuchiya, Shuji Terai, et al. Navitoclax improves acute-on-chronic liver failure by eliminating senescent cells in mice. *Hepatol Res.* 2023 Jan 11. DOI: 10.1111/hepr.13879.

Yusuke Watanabe, Atsunori Tsuchiya, Shuji Terai, et al. Prognostic study of acute-on-chronic liver failure patients: Usefulness of the fibrosis-4 index. *Medicine.* 2022 Nov 4; 101(44): e31328.

##### 2. 学会発表

渡邊雄介、土屋淳紀、寺井崇二・Acute-on-chronic liver failure に対する老化細胞除去治療の新規開発のための基盤研究・第 108 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 3・WEB 開催・2022 年 4 月 23 日

渡邊雄介、土屋淳紀、寺井崇二・老化細胞除去治療の Acute-on-chronic liver failure に対する効果の検証・日本肝臓学会総会 2022

一般演題・WEB開催・2022年6月3日

Yusuke Watanabe, Atsunori Tsuchiya,  
Shuji Terai. The basic research to  
develop a novel treatment for ACLF. The  
30<sup>th</sup> JDDW Panel Discussion, At Fukuoka,  
October 27<sup>th</sup> /2022.

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