

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

ACLF に対する老化細胞除去剤の効果機序解析

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。また、ACLF の改善の機序には、ミトコンドリア機能の上昇が関与している可能性があることを明らかにした。今回はこれらのデータをより強固にするため、細胞のミトコンドリア機能評価を目的として酸素消費速度の検証を行ったため報告する。

【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酸素消費速度を計測し、老化させていない肝細胞、老化肝細胞に Navitoclax を添加しない群と比較解析した。

【結果】老化肝細胞に Navitoclax を添加した群の酸素消費速度は、Navitoclax を添加しない群に比べて増加し、老化させていない肝細胞の酸素消費速度より減少していた。

【結論】 Navitoclax 添加群で酸素消費速度が増加していた結果から、Navitoclax によりミトコンドリア機能が上昇する可能性があることを Biogenesis の面からも確認することができた。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）

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。また、改善の機序にはミトコンドリア機能の上昇が関与し

ている可能性があり、ATP 変化量と膜電位の変化量から、ミトコンドリア機能が上昇することを明らかにした。今回は、これらのデータをより強固にする目的で酸素消費速度の検証を行い、ミトコンドリアの Biogenesis の面からの解析を実施した。

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 $\mu$ M の濃度で添加した。OCR late assay Kit (DOJINDO 社から購入) の手順に従い、添加後から約 200 分間の断続的な酸

素消費量を測定し、消費量から算出した消費速度を、Navitoclax を添加していない群、老化させていない正常な肝細胞の群と比較解析した。解析は INFINIT 200Pro M series (TECAN 社から購入) のマイクロプレートリーダーを用いて、少なくとも3つの異なる検体で検証した。

#### (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

Navitoclax を添加した群の酸素消費速度は、Navitoclax を添加しない群よりも増加していた。Navitoclax を添加した群の酸素消費速度は、老化させていない肝細胞の群に比べて減少していた。

#### D. 考察

Navitoclax を添加したことにより酸素消費速度が増加したことから、老化肝細胞のミトコンドリア機能を上昇させたと考えられる。一方で、その消費速度は老化させていない肝細胞よりは減少しており、老化する以前までのミトコンドリア機能の回復には至らなかったと考えられる。

#### E. 結論

ミトコンドリア機能の Biogenesis の面からも、Navitoclax は、ミトコンドリア機能を上昇させる可能性がある。これまでの実験結果と総合して、Navitoclax が老化細胞除去の観点から、ACLF の新規治療となる可能性が考えられる。

#### 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 May, 53(5): 460-472.

##### 2. 学会発表

Yusuke Watanabe, Atsunori Tsuchiya, Shuji Terai. The relationships between liver fibrosis and senescent cells in ACLF. The 59<sup>th</sup> Japan Society of Hepatology, Panel Discussion 1, At Nara, June 16<sup>th</sup> /2023.

渡邊雄介、土屋淳紀、寺井崇二

新規 ACLF モデルの開発と老化細胞除去の効果の検討、急性肝不全研究会、奈良県、2023年6月13日発表

#### 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