

論 文 内 容 要 旨

Vitamin A-coupled liposomal Rho-kinase inhibitor ameliorates liver fibrosis without systemic adverse effects

(Rho キナーゼ阻害剤含有ビタミンA付加リポソーム製剤は全身性の副作用を引き起こすことなく肝線維化を改善する)

Hepatology Research, 2019, in press.

主指導教員：大段 秀樹 教授
(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：大毛 宏喜 教授
(広島大学病院 感染症学)

副指導教員：田邊 和照 教授
(医系科学研究科 成人健康学)

沖本 将

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景】

肝星細胞の活性化は、肝線維化の主因を成している。われわれはこれまでの研究で、肝星細胞の活性化は Rho キナーゼ阻害剤(Y-27632 : 以下 Y)で抑制できることを報告してきた。一方、Rho シグナルはさまざまな細胞応答に関与しており、Y の全身投与では、低血圧や腎機能障害などの有害事象を認める。そこでわれわれは肝星細胞に対して選択的に Y を輸送する Drug Delivery System(DDS)を開発した。この DDS を用いて肝線維化を抑制できるか実験を行った。

【方法】

肝星細胞は生体におけるビタミン A(VA)の貯蔵細胞であり、ビタミン A に対する親和性が高い。そこで薬剤をリポソーム(Lip)で内包化し、VA をリガンドとして付加した。また肝星細胞は Disse 腔と呼ばれる肝細胞と類洞内皮細胞の間隙に存在するが、通常の血管内皮細胞より類洞内皮細胞小孔は広い。このことを利用し、リポソームのサイズを調節することで DDS; Rho キナーゼ阻害剤含有ビタミン A 付加リポソーム製剤を作成した。

In vitro 実験では、ヒト肝星細胞(LX-2)を用いて Rho キナーゼ阻害剤含有ビタミン A 付加リポソーム製剤(VA-Lip-Y)による活性化抑制効果を実験した。

In vivo 実験では、4 週齢から四塩化炭素(CCl₄)を腹腔内投与し作成した肝線維化モデルラットに、9 週齢から週 2 回 VA-Lip-Y を併用投与し、肝線維化抑制効果を確認した。15 週齢で sacrifice し血液生化学検査、肝の組織学的検査を行った。生存率の試験では、そのまま薬剤の投与を継続した。肝線維化の評価法として、AZAN 染色を、肝星細胞活性化の評価法として α SMA と TGF- β 1 の免疫染色を行った。

【結果】

まずファロイジン染色による LX-2 の形態学的変化を調べた。肝星細胞は活性化されるとストレスファイバー形成および F-actin の発現により筋線維芽細胞様に形態学的変化を示すが、VA-Lip-Y と VA を付加していない Rho キナーゼ阻害剤含有リポソーム製剤(Lip-Y)投与では、Y 単独投与の 1/100 の量で同等の形態学的変化の抑制を認めた。

また肝星細胞は活性化により α SMA、TGF- β 1 などの過剰発現を示すが、LX-2 に VA-Lip-Y(P<0.01)、Lip-Y(P<0.01)、Y 単独投与(P<0.05)することで、コントロールと比較して有意に発現が抑制され、特に VA-Lip-Y、Lip-Y 投与 でその発現抑制効果は著明であった。

肝線維化ラットにおける VA-Lip-Y 投与実験では、VA-Lip-Y 投与群はコントロール群と比較し有意に肝線維化の程度は軽度であった(P<0.01)。また、肝組織における α SMA と TGF- β 1 の発現も有意に低下した (P<0.01)。血液生化学検査でも、ALT、ヒアルロン酸が有意に低値であり (P<0.05)、腎機能低下などの副作用を認めなかった。また生存率においても、VA-Lip-Y 投与群はコントロール群と比較し有意に良好であった (P<0.01)。

【考察】

この研究では、われわれの開発した DDS により Y 投与による副作用を引き起こすことなく、

肝線維化を抑制できるかを実験した。

In vitro 実験ではリポソーム化した Y は非リポソーム化 Y の 1/100 量で肝星細胞の活性化抑制効果を示した。ここでは肝星細胞に対するビタミン A 親和性を利用した特異的な抑制効果よりも非特異的なリポソーム化による効果が優位であったと考えられる。In vivo 実験において VA-Lip-Y は、Lip-Y や Y 単独投与と比較して肝線維化を抑制した。ビタミン A を付加することでより強力な抑制効果を示すことを証明した。

さらに、VA-Lip-Y の長期投与でも、腎機能低下やイレウスなどの副作用を引き起こさなかった。このことは Y を選択的に肝星細胞に輸送したことに加え、Y の投与量が微量 (0.2mg/kg) であったためと考えられる。以前の他報告では、われわれと同様の CCl₄ 誘導性の肝線維化ラットの肝線維化改善に 30mg/kg の Y 投与量を要していた。

本実験では、4 週間の CCl₄ 投与後より VA-Lip-Y の投与を開始したが、4 週間の CCl₄ 投与時点では犬山分類 F2-3 程度の線維化であった。本実験の限界として、肝硬変(F4)に VA-Lip-Y 投与の線維化改善効果があるのかは不明であることである。

肝星細胞に対する DDS の報告はいくつかあるが、いずれも遺伝子改変などを必要とする薬剤であり、われわれの開発した DDS は既存薬剤を用いており、簡便に作成可能であることも臨床応用が期待できる点である。

以上のことより、われわれの開発した VA-Lip-Y は肝星細胞に選択的に Y を輸送し活性化を抑制し、全身性の副作用を引き起こすことなく肝線維化を改善することを証明した。