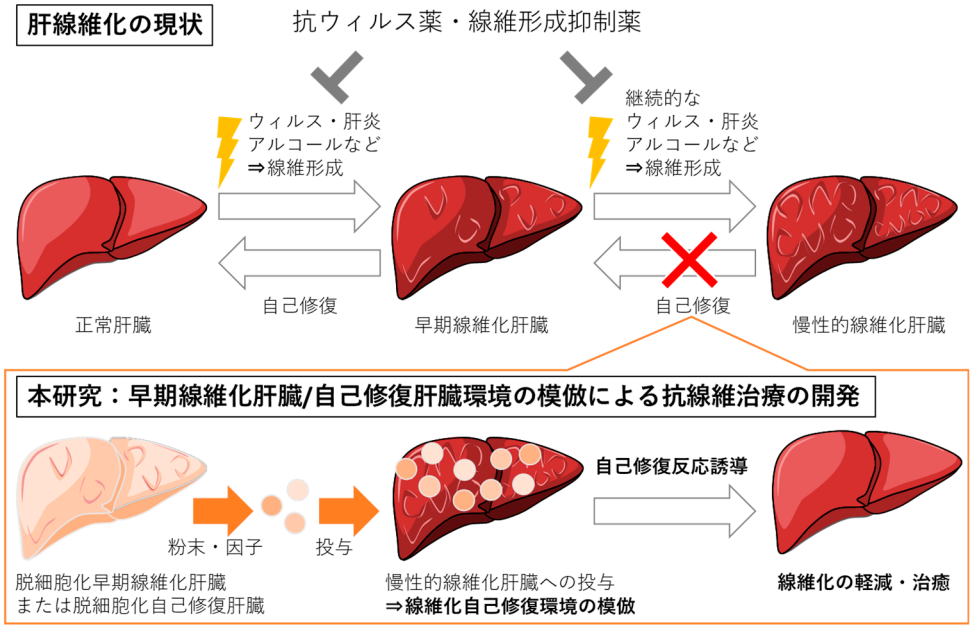
| 205　肝線維化自己修復環境模倣材料の抗線維化能の解析 | 根岸　淳 |
|---|---|

**【目的】**肝臓の線維化は、肝炎や脂肪肝の終末像であり、進行すると重度の肝硬変や肝臓がんを併発する可能性がある。アルコールや肝炎ウィルスの持続感染、種々の疾患により肝臓が損傷を受けると線維化が生じる。早期の線維化は自己修復するが、頻回損傷による慢性的な線維化は自己修復しない。現在、完成してしまった線維化に対する有用な治療法は確立されておらず、新たなアプローチによる抗線維化治療の開発が望まれている。本研究では、マウスの正常肝臓、早期線維化肝臓、自己修復肝臓（早期線維化後の回復段階の肝臓）と慢性線維化肝臓から脱細胞化肝臓粉末を作製し、線維化の自己修復環境を模倣することで線維化肝臓の線維溶解を助長できるかもしれないと仮説を立て、慢性線維化肝臓に対する線維溶解療法の基盤確立を目指した。また、各脱細胞化肝臓の細胞外マトリックス解析の抗線維化能評価から、抗線維化能を有する細胞外マトリックスの解明を目的とした（下図）。

**【方法】**チオアセトアミド（TAA）投与により早期線維化、自己修復および慢性線維化肝臓マウスを作製、正常肝臓と各段階の線維化肝臓を脱細胞化処理した。HE 染色とシリウスレッド染色により細胞除去と細胞外マトリックス中のコラーゲン線維沈着を評価した。また、作製した脱細胞化肝臓を粉末化し、SDS-PAGE によるタンパク解析および細胞毒性試験を行った。抗線維化評価として、肝星細胞の活性化試験および慢性肝線維化マウスを用いた脱細胞化肝臓粉末含有ゲル塗布試験を実施した。

**【結果】**TAA 投与期間を検討することにより、線維化進行度の異なる肝臓が得られた。脱細胞化処理により、すべての肝臓から細胞が除去されたことが認められ、また、線維化の進行度によって脱細胞化肝臓中のコラーゲン線維の沈着度合いが異なっていることも明らかになった。脱細胞化正常肝臓と比較し、脱細胞化線維化肝臓の抽出液のタンパク質濃度が高かったが、SDS-PAGE では脱細胞化線維化肝臓に特異的なバンドは認められなかった。脱細胞化肝臓粉末の生理食塩水抽出液に細胞毒性はなく、脱細胞化肝臓粉末添加による肝星細胞の活性化促進は認められなかった。さらに、慢性線維化肝臓マウスへの脱細胞化肝臓粉末含有フィブリンゲル塗布実験において、脱細胞化早期線維化肝臓および脱細胞化自己修復肝臓粉末含有ゲル塗布群のコラーゲン線維軽減が認められた。以上から、生体環境を模倣する脱細胞化肝臓粉末による抗線維化治療の可能性が示唆された。

肝線維化の進行と本研究の自己修復環境模倣材料による抗線維化治療のイメージ



# 205. 肝線維化自己修復環境模倣材料の抗線維化能の解析

根岸　淳

信州大学 繊維学部 応用生物科学科 根岸研究室

Key words：肝線維化，脱細胞化組織，細胞外マトリックス

## 緒　言

肝臓の線維化は、肝炎や脂肪肝の終末像であり、進行すると重度の肝硬変や肝臓がんを併発する可能性がある。アルコールや肝炎ウィルスの持続感染、種々の疾患により肝臓が損傷を受けると線維化が生じる。早期の線維化は自己修復するが、頻回損傷による慢性的な線維化は自己修復しない。現在、完成してしまった線維化に対する有用な治療法は確立されておらず、新たなアプローチによる抗線維化治療の開発が望まれている。近年、肝臓線維化のメカニズムが解明されるにつれて、線維化に関与する分子をターゲットとする治療法が開発されつつある［1］。

既存治療や他グループの研究は、主に線維化の原因となる肝炎ウィルス除去や線維形成関与因子をターゲットにしている。肝炎ウィルス除去は、B 型・C 型肝炎由来の線維化進展予防に有効かもしれないが、その他の原因による線維化、既に沈着した線維除去には有効ではない。また線維形成因子をターゲットにした治療も新たな線維沈着抑制を目的としており、すでに完成している線維に働きかけるものではない。熱ショックタンパク質 47（HSP47）は、コラーゲンのフォールディングに関与するタンパク質である。HSP47 に対する siRNA は、線維の主成分であるコラーゲンの生成を抑制することで抗線維化効果を示すことが確認されている［2］。また、多くの研究グループにより、コラーゲン架橋に関与するリジルオキシダーゼやトランスグルタミナーゼ、細胞接着分子であるインテグリン、組織再生や修復に関与する線維芽細胞活性化タンパク質などの抑制効果を有する薬剤による抗線維化治療が検討されているが、良好な結果が得られていないのが現状である［3］。

我々は、生体組織から免疫原となる細胞を除去した脱細胞化組織の研究に取り組み、粉末化脱細胞化肝臓による心筋梗塞線維化の抑制を報告している［4］。また、成体動物と比較し、胎児動物由来脱細胞化組織の高い組織再生能を明らかにし、原料組織により脱細胞化組織の機能が異なることを見出している。

本研究は、生体が早期の線維化を自己修復しうることに着目し、線維化から自己修復中の肝臓や早期線維化肝臓を原料とする脱細胞化肝臓加工材料を慢性線維化肝臓に添加することで、生体の線維化修復反応を誘導する環境を提供し、完成した線維化に対して自己修復が働くことを想定している。正常肝臓、早期線維肝臓、自己修復肝臓（早期線維化後の回復段階の肝臓）と慢性線維化肝臓から脱細胞化肝臓を作製、注入可能な剤形に加工した脱細胞化肝臓加工材料を開発する。脱細胞化肝臓加工材料により線維化の自己修復環境を模倣し、線維化肝臓の線維溶解を助長できるかもしれないと仮説を立て、慢性的線維化肝臓に対する線維溶解療法の基盤確立を目指す。また、各脱細胞化肝臓の細胞外マトリックス解析と脱細胞化肝臓加工材料の抗線維化能評価から、抗線維化能を有する細胞外マトリックスを解明する。

以上のように、従来のような線維化の進展予防ではなく、生体の自己修復を利用し、完成した線維に対しても治癒を促すことができる新規性の高い治療法開発に取り組んだ。

## 方　法

### 1. 早期線維化、自己修復および慢性線維化肝臓マウスの作製

本研究に関する動物実験は、信州大学動物実験委員会で承認された方法で行った。具体的には、信州大学に附属する実験動物管理施設の指針に従い、適切な麻酔剤及び鎮痛剤を用いて動物の苦痛の軽減に努めるとともに、実験計画を綿密に練ることにより、不要な動物実験を避け必要最低限の頭数で研究を遂行した。

C57BL/6 マウス（♂、6 週齢）に 4%チオアセトアミド（TAA、富士フイルム和光純薬株式会社）を腹腔投与することで肝臓の線維化を誘導した［5］。2 週間の計 6 回投与したマウスを早期線維化群、2 週間の計 6 回投与後に 2 週間経過したマウスを自己修復群、6 週間の計 18 回投与したマウスを慢性線維化群とした。マウスを安楽死後、TAA 未投与の正常肝臓と各線維化肝臓を採取して HE 染色とシリウスレッド染色を行って肝線維化を評価した。

### 2. 脱細胞化肝臓粉末の作製とタンパク質解析

採取した肝臓を高静水圧処理（980MPa、10 分）し、その後、DNase 含有生理食塩水と 80%エタノール溶液で振盪洗浄して脱細胞化肝臓を作製、未処理肝臓と脱細胞化肝臓の HE 染色とシリウスレッド染色を行った。また、凍結乾燥した脱細胞化肝臓を粉砕機で粉砕して脱細胞化肝臓粉末を調製した［4］。

各脱細胞化肝臓粉末を生理食塩水に浸漬して 37℃で 24 時間振盪、遠心後の上清を採取して脱細胞化肝臓抽出液を作製した。また、Total Protein Extraction (TPE™) Kit（Geno Technology 社）を用いて各脱細胞化肝臓可溶化液を調製、脱細胞化肝臓抽出液とともにタンパク質濃度を測定後、SDS-PAGE を行った。

### 3. 脱細胞化肝臓抽出液の細胞毒性試験

マウス線維芽細胞（L929）を $5.0\times10^3$ cells/well で 96well プレートに播種、24 時間後に各脱細胞化肝臓の生理食塩水抽出液および生理食塩水（Negative control）とエタノール（Positive control）を添加した。また、検量線用に L929 を播種した。さらに 24 時間培養後、Cell Counting Kit-8（同仁化学）を添加、2 時間培養後に吸光度を測定して生細胞数を算出した。

### 4. 脱細胞化肝臓抽出液の肝星細胞の活性化試験

ラット肝星細胞（RI-T）を $5.0\times1^4$ cells/well で 96well プレートに播種、24 時間後に無血清培地に交換して 6 時間培養した。続いて、TGF-β 含有培地または各脱細胞化肝臓抽出液含有培地に交換して 24 時間培養した。その後、遺伝子発現解析により RI-T の活性化を評価した［6］。

### 5. 慢性線維化肝臓マウスを用いた抗線維化評価

C57BL/6 マウス（♂、6 週齢）に 6 週間の 4% TAA 腹腔投与を行って慢性線維化肝臓マウスを作製した。慢性線維化肝臓マウスを吸入および注射麻酔で不動化し、開腹して肝臓を露出させた。脱細胞化肝臓粉末混合フィブリノーゲンをマウス肝臓表面に塗布、その後、トロンビン溶液を添加することで脱細胞化肝臓粉末含有フィブリンゲルを形成させた。4 週間飼育後、マウスを安楽死させて肝臓を採取、HE 染色とシリウスレッド染色を行い、線維化修復を評価した。

## 結　果

### 1. TAA 投与によるマウス肝臓の線維化誘導と脱細胞化肝臓の作製

肝臓線維化の進行度が異なるマウスを作製するため、TAA 腹腔投与期間の検討を行った。3 回／週の TAA 投与を 2 週間行ったマウスから採取した早期線維化肝臓と 2 週間の TAA 投与後に 2 週間未投与で飼育したマウスの自己修復肝臓では、血管周囲にコラーゲン線維の沈着が認められ、6 週間の TAA 投与を行ったマウスの慢性線維化肝臓では血管周囲と肝臓実質部分にコラーゲン線維が存在していた（図 1E～H）。続いて、正常肝臓と各線維化段階の肝臓から高静水圧法を用いて脱細胞化肝臓を作製した。未処理肝臓の HE 染色画像では青く染まった細胞核が確認されたが、脱細胞化肝臓では細胞核は認められなかった（図 1A～D、I～J）。また、シリウスレッド染色において、脱細胞化自己修復肝臓、脱細胞化早期線維化肝臓、脱細胞化慢性線維化肝臓の順でコラーゲン線維が多く観察された（図 1M～P）。

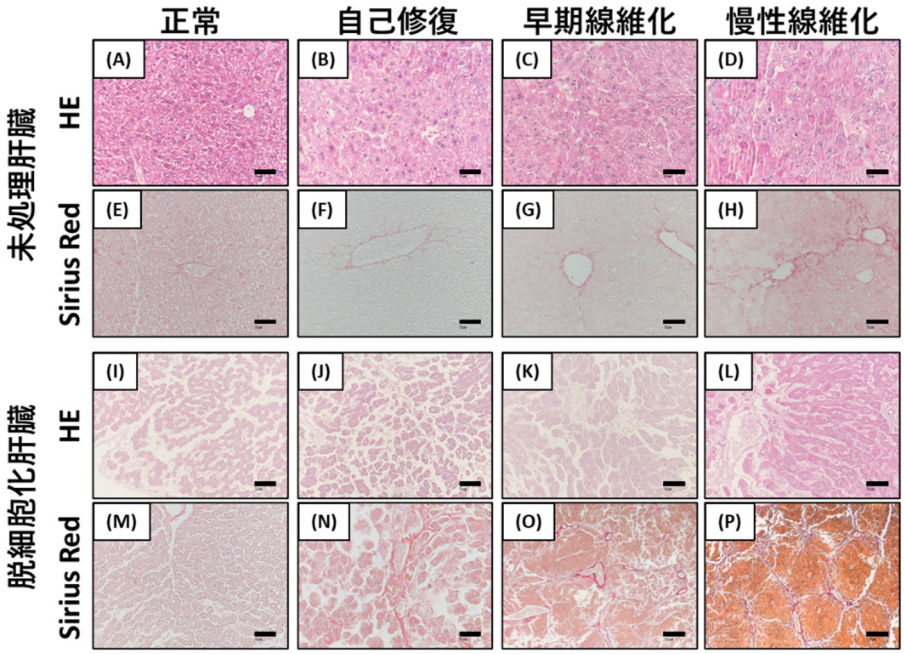



図 1. 未処理および脱細胞化肝臓の細胞除去と線維化評価
（A～D、I～J）HE 染色画像と（E～H、M～P）シリウスレッド染色画像
（スケールバー：50 μm）。

**2. 脱細胞化肝臓抽出液と脱細胞化肝臓可溶化液のタンパク質解析**

各脱細胞化肝臓粉末の生理食塩水抽出液と可溶化液の含有タンパク質を SDS-PAGE で解析した。各脱細胞化肝臓抽出液のタンパク質濃度は、脱細胞化正常肝臓が 511 μg/mL、脱細胞化自己修復肝臓が 422 μg/mL、脱細胞化早期線維化肝臓が 667 μg/mL、脱細胞化慢性線維化肝臓で 792 μg/mL だった（図 2A）。また、SDS-PAGE において、脱細胞化肝臓抽出液では 10 kD 以下のバンドが認められ、可溶化液では 50 kD、25 kD と 15 kD 付近にバンドが認められた。脱細胞化肝臓抽出液および可溶化液ともに、各脱細胞化肝臓で異なるバンドは確認されなかった（図 2B）。

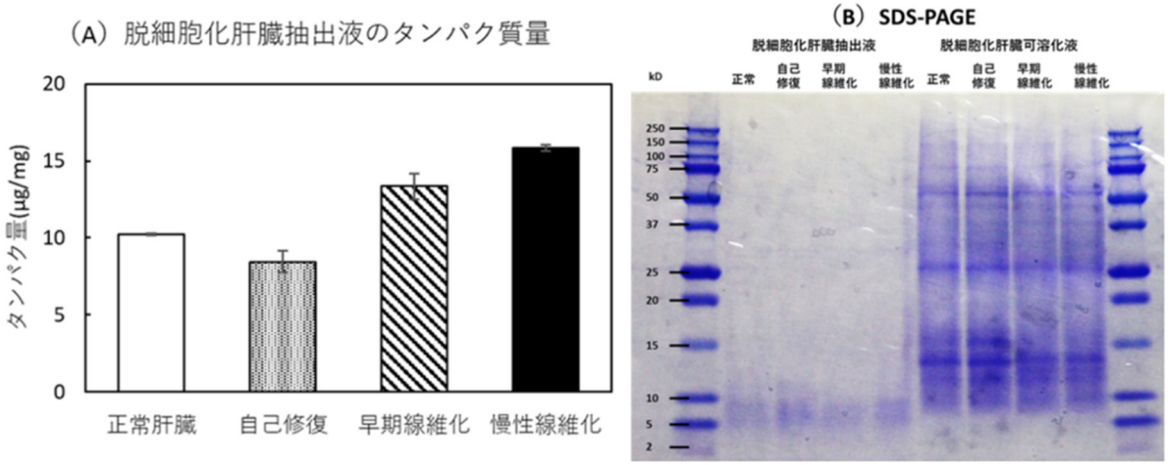



図 2. 脱細胞化肝臓の含有タンパク質解析
A） 脱細胞化肝臓抽出液のタンパク質濃度。
B） 脱細胞化肝臓の SDS-PAGE。

### 3. 脱細胞化肝臓抽出液の L929 毒性試験と RI-T 活性化試験

培養中の L929 に脱細胞化肝臓抽出液および生理食塩水（Negative control）とエタノール（Positive control）を添加、24 時間培養後の細胞数を図 3A に示した。Negative control と比較して、すべての脱細胞化肝臓抽出液添加群で細胞数の減少は認められなかった。また、脱細胞化正常肝臓抽出液添加群の生細胞は $2.0\times10^4$ cells/well と多く、脱細胞化線維化肝臓抽出液添加群の生細胞数は $1.5\times10^4$ cells/well 程度だった。

脱細胞化肝臓粉末抽出液添加後の RI-T の遺伝子発現を評価した。活性化因子である TGF-β 添加群では活性化マーカーの発現が上昇していたが、脱細胞化肝臓抽出液添加群では遺伝子発現上昇は認められなかった（図 3B）。

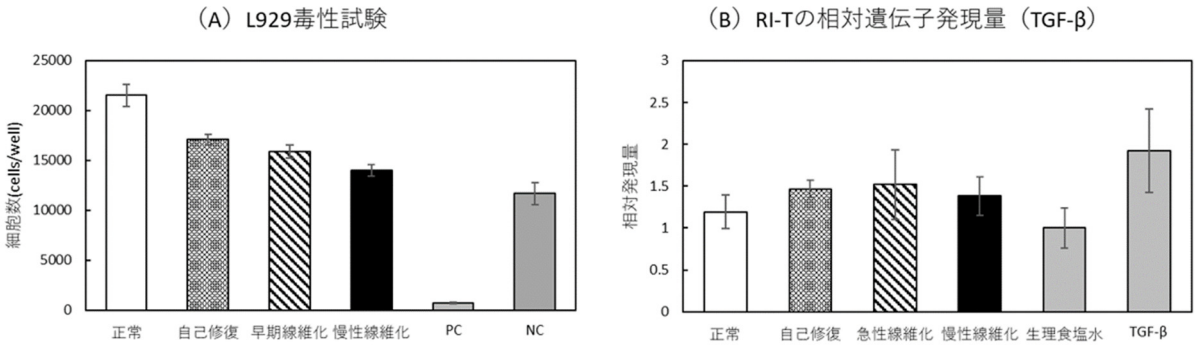



図 3. 脱細胞化肝臓抽出液の細胞試験による機能評価

A） 脱細胞化肝臓抽出液添加 24 時間後の生細胞数。

B） 脱細胞化肝臓抽出液添加後の RI-T の TGF-β 発現量。

### 4. 脱細胞化肝臓粉末含有フィブリンゲルによる慢性線維化肝臓の線維化抑制効果

マウスの慢性線維化肝臓に脱細胞化肝臓粉末含有フィブリンゲルを塗布、4 週間後に線維化評価を行った。未処置、フィブリンゲルと脱細胞化正常肝臓粉末含有フィブリンゲル塗布群では、実質部分までのコラーゲン線維が観察された（図 4G～I）。一方、脱細胞化自己修復、早期線維化および慢性線維化肝臓粉末含有フィブリンゲル塗布群では、線維の減少が認められ、特に脱細胞自己修復肝臓と早期線維化肝臓群でコラーゲン線維が少なかった（図 4J～L）。

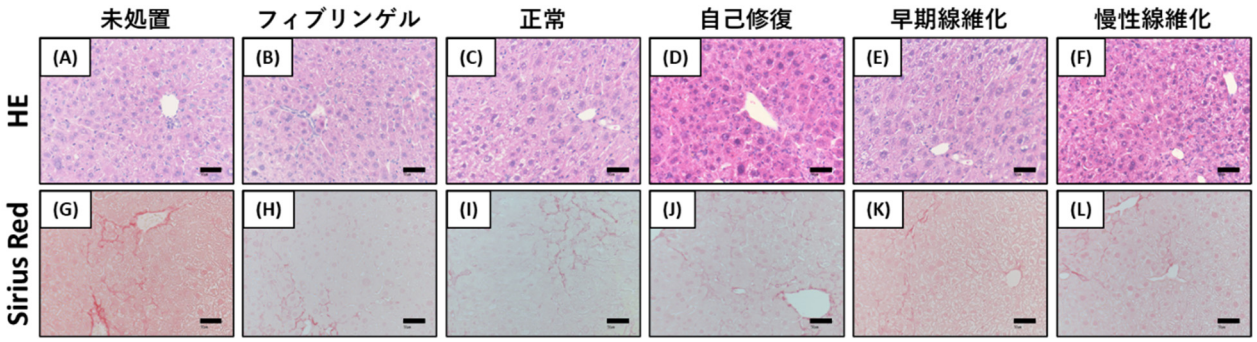



図 4. マウス試験による脱細胞化肝臓粉末含有ゲルの抗線維化評価

（A～F）HE染色画像と（G～L）シリウスレッド染色画像（スケールバー：50μm）。

## 考　察

本研究では、脱細胞化肝臓を利用して生体の自己修復を誘導、完成した線維に対しても治癒を促すことができる新規性の高い治療法開発に取り組んだ。脱細胞化肝臓のシリウスレッド染色において、自己修復肝臓、早期線維化肝臓および慢性線維化肝臓にはコラーゲン線維が認められたことから、原料臓器の状態によって脱細胞化肝臓の細胞外マトリックスの構成が異なることが明らかになった。また、脱細胞化早期線維化肝臓および慢性線維化肝臓粉末抽出液のタンパク質濃度が正常肝臓や自己修復肝臓より高かったことから、線維化に関連する水溶性タンパク質が脱細胞化後も残存していた可能性が考えられる。一方、SDS-PAGE では、脱細胞化肝臓可溶化液と脱細胞化肝臓抽出液ともに、正常肝臓と線維化肝臓で異なるバンドは認められなかったため、脱細胞化線維化肝臓には特異的なタンパク質が存在するのではなく、水溶性タンパク質や不溶性タンパク質の量が増減している可能性が示唆された。

L929 毒性試験において、各脱細胞化肝臓抽出液には毒性がないことが明らかになった。また、脱細胞化正常肝臓抽出液添加群では、細胞増殖促進が認められた。脱細胞化肝臓には多数の増殖因子が含まれていることが明らかになっており［7］、本研究で使用した脱細胞化正常肝臓にも増殖因子が存在していたと推察される。各線維化段階の脱細胞化肝臓抽出液では細胞増殖促進が認められなかったことから、線維化進行により細胞増殖因子が減少したと考えられる。

肝星細胞は肝臓の線維化に関与する細胞であり、肝障害の際に活性化し肝臓の修復などに働くことが知られているが、長期的な肝星細胞の活性化は線維化を誘導することが明らかになっている［8］。各脱細胞化肝臓抽出液の添加によって、肝星細胞の活性化マーカーの上昇は認められなかったことから、脱細胞化肝臓粉末による肝線維化の重篤化は生じにくいと推察される。また、動物試験において、脱細胞化早期線維化肝臓と自己修復肝臓粉末による慢性線維化肝臓の線維の軽減が認められ、自己修復肝臓や早期線維化肝臓の環境を模倣することで自己治癒を誘導可能なことが示唆された。

以上のように、本研究では、脱細胞化肝臓を用いた抗線維化治療の可能性を明らかにすることは達成されたが、抗線維化関連因子の解明には至らなかった。今後は、より詳細な解析を行い、脱細胞化早期線維化肝臓および自己修復肝臓中の抗線維化関連因子の解明を目指す。

## 共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、東京医科歯科大学生体材料工学研究所物質医工学分野の岸田教授と橋本助教に貴重なご意見を頂きました。また、信州大学繊維学部の村松氏には実験等にご協力いただきました。ここに感謝申し上げます。

## 文　献

1) Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. Matrix Biol. 2018 Aug;68-69:435-451. Epub 2018 Apr 12. PMID: 29656147 DOI: 10.1016/j.matbio.2018.04.006

2) 味呑憲二郎,　新津洋司郎. HSP47 siRNA を用いた線維症治療薬の開発～ビタミン A 修飾リポソームによる星細胞標的化 DDS～. Drug Delivery System 2016 年 31 巻 1 号 p. 62-70. DOI: https://doi.org/10.2745/dds.31.62

3) Altamirano-Barrera A, Barranco-Fragoso B, Méndez-Sánchez N. Management strategies for liver fibrosis. Ann Hepatol. 2017 Jan-Feb;16(1):48-56. PMID: 28051792 DOI: 10.5604/16652681.1226814.

4) Tabuchi M, Negishi J, Yamashita A, Higami T, Kishida A, Funamoto S. Effect of decellularized tissue powders on a rat model of acute myocardial infarction. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015 Nov 1;56:494-500. Epub 2015 Jul 15. PMID: 26249619 DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.010.

5) Kim YO, Popov Y, Schuppan D. Optimized Mouse Models for Liver Fibrosis. Methods Mol Biol. 2017;1559:279-296. PMID: 28063051 DOI: 10.1007/978-1-4939-6786-5_19.

6) Sekiguchi H, Hemmi N, Maki T, Ozawa A, Kadowaki E, Kamiie J, Yamamoto M, Arishima K, Sakaue M. Culture on a fragmin/protamine-coated plate suppresses the collagen type Iαl and TGF-β1 mRNA expression of rat hepatic stellate RI-T cells. J Vet Med Sci. 2013;75(5):553-9. Epub 2012 Dec 14. PMID: 23238453 DOI: 10.1292/jvms.12-0396.
7) Ren H, Shi X, Tao L, Xiao J, Han B, Zhang Y, Yuan X, Ding Y. Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold. Liver Int. 2013 Mar;33(3):448-58. Epub 2013 Jan 10. PMID: 23301992 DOI: 10.1111/liv.12088.
8) Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. Adv Drug Deliv Rev. 2017 Nov 1;121:27-42. Epub 2017 May 12. PMID: 28506744 DOI: 10.1016/j.addr.2017.05.007.