

氏名	宮岡 雄太
(ふりがな)	(みやおか ゆうた)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成29年6月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Chymase inhibitor prevents the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet (キマーゼ阻害薬によるラット高脂肪高コレステロール食負荷非アルコール性脂肪肝炎の発症および進行予防効果)
論文審査委員	(主) 教授 樋口 和 秀 教授 朝日 通 雄 教授 今川 彰 久

学位論文内容の要旨

《目的》

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、飲酒歴がないにも関わらずアルコール性肝炎に類似した炎症細胞の浸潤と線維化を認め、肝硬変および肝細胞癌へ進行する。NASH は肥満、インスリン抵抗性、高脂血症、高血圧などとの関連性が指摘されていることより、糖尿病、高脂血症、高血圧の個別の症状に焦点を当てた治療薬の研究が進んでいるが、一般に認められた治療薬は確立されていない。一方、肥満細胞で発現するキマーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9およびトランスフォーミング増殖因子(TGF)- β の活性化を有する酵素である。MMP-9 は炎症細胞の蓄積を誘導し、TGF- β は組織線維化を促進することが知られていることから、キマーゼを阻害することによって NASH の予防および

び治療が期待できると考えた。

《方法》

NASH に対するキマーゼ阻害薬の予防効果を評価するため、10 週齢の雄性脳卒中易発性自然発症高血圧ラット(SHRSP5/Dmcr)に正常食または高脂肪高コレステロール(HFC)食負荷と同時にプラセボ(n=8)またはキマーゼ阻害薬(TY-51469、1 mg/kg/日 : n=8)の皮下投与を浸透圧ポンプにて開始した。正常食を与えたラットを対照群(n=6)とした。HFC 食負荷後、継時的に体重と血圧を測定し、8 週間後に血漿と肝臓に対して、生化学的、組織学的な検討を行った。

生存率に対するキマーゼ阻害薬の影響を評価するため、HFC 食負荷と同時にプラセボ(n=8)またはキマーゼ阻害薬を投与する群(前処置群 : n=8)、HFC 食 8 週間負荷後にキマーゼ阻害薬を投与する群(後処置群 : n=8)の 3 群に分け、いずれかの群における生存率が 0% になる時点をエンドポイントとした。

生化学的な指標として血漿中のアラニントランスアミナーゼ(ALT)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、トリグリセリド(TG)および総コレステロール(Tcho)の濃度を測定した。肝組織の病理学的変化を解析するため、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色標本で脂肪滴面積を測定し、シリウスレッド染色標本で線維化面積を測定して全肝臓面積から各面積の割合を定量化した。肥満細胞数をトルイジンブルー染色にて定量した。キマーゼ陽性細胞および TGF- β 陽性細胞の分布を解析するために免疫組織化学的染色を行った。

リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を用い肝組織中のミエロペルオキシダーゼ(MPO)、MMP-9、TGF- β 、コラーゲン I、18S rRNA の遺伝子発現レベルを測定し、18S rRNA で mRNA レベルを標準化した。

《結果》

血漿中の AST および ALT は、対照群と比較してプラセボ群で有意に高かったが、プラセボ群と投薬群の間には有意差を認めなかった。血漿 Tcho はプラセボ群では対照群より

も有意に高かったが、キマーゼ阻害薬群ではプラセボ群より有意に低かった。3 群間で体重に有意差は認めなかったが、肝臓重量/体重比はプラセボ群で高かった。しかし、肝臓重量/体重比は、キマーゼ阻害薬によって有意に抑制された。脂肪滴面積の割合と線維化面積の割合はプラセボ群では対照群よりも有意に高かったが、キマーゼ阻害薬群では有意に低かった。肥満細胞数、キマーゼ陽性および TGF- β 陽性細胞数は、プラセボ群で対照群よりも有意に高かったが、キマーゼ阻害薬群では有意に低かった。プラセボ群において MPO、MMP-9、TGF- β およびコラーゲン I の肝臓 mRNA レベルは有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群で有意に低下した。

HFC 食を負荷したプラセボ群は 14 週間で生存率が 0%になったが、キマーゼ阻害薬前処置群およびキマーゼ阻害薬後処置群の生存率は、それぞれ 100%($p < 0.05$)および 50%($p < 0.05$)であった。肝組織の検討では脂肪滴面積の割合は、プラセボ群と比較して前処置群および後処置群で有意に減少した。線維化面積の割合の有意な減弱を前処置群で観察されたが、後処置群では有意な改善効果が得られなかった。

《考察》

NASH は高血圧、糖尿病、高脂血症などのメタボリックシンドロームから引き起こされる。本研究で使用した動物モデルは高血圧と高脂血症から引き起こされる NASH であり、実臨床に非常に近いと考えられる。本研究で NASH を発症した肝臓ではキマーゼ陽性細胞数が増加しており、キマーゼと関連がある肥満細胞数、MMP-9、TGF- β も増加していた。これらの知見は、肝臓におけるキマーゼの増加が、NASH の発症または進行に関与することを示唆する。一方、キマーゼ阻害薬は NASH モデルにおける肝臓の脂肪滴面積や線維化面積の割合を減少させ、炎症細胞浸潤に関与する MPO の mRNA レベルを有意に低下させた。これらの結果は、キマーゼ阻害薬が NASH の発症予防に有効であることを示唆する。

生存率に対する実験では、キマーゼ阻害薬の前処置のみならず後処置でも有意にプラセボ群と比較して上昇させた。これらの知見は、キマーゼ阻害薬には予防効果だけでなく進行抑制効果を有することを示唆する。

《結論》

本研究において、キマーゼ阻害薬が NASH の発症および進行の防止に有用であることが示された。

論文審査結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、飲酒歴がないにも関わらずアルコール性肝炎に類似した炎症細胞の浸潤と線維化を認め、肝硬変および肝細胞癌へ進行する。NASH は肥満、インスリン抵抗性、高脂血症、高血圧などとの関連性が指摘されていることより、糖尿病、高脂血症、高血圧の個別の症状に焦点を当てた治療薬の研究が進んでいるが、一般に認められた治療薬は確立されていなく、治療薬の確立が必要である。

申請者らは、本研究において脳卒中易発性自然発症高血圧ラット (SHRSP5/Dmcr) に高脂肪高コレステロール(HFC)食を与え NASH モデルを作製してキマーゼ阻害薬の影響を検討した。HFC 食負荷後 8 週で NASH モデルが作製された。キマーゼ阻害薬投与群で組織学的に肝脂肪化、線維化が改善され、炎症の指標である MPO の発現抑制も認められていた。また、遺伝子発現レベルではキマーゼが活性化する TGF- β と MMP-9 の減少を認めたことより、キマーゼ阻害薬がそれらの抑制を介して NASH の改善に寄与したと考えられた。

また、死因についての検討は今後必要となるが、治療の大きな目標である生存率の改善をキマーゼ阻害薬は有していることも示した。特に NASH を発症してからのキマーゼ阻害薬投与でも、生存率を認めた。

臨床治験など今後更なる検討が必要であるが、NASH の今後の治療薬としてキマーゼ阻害薬は期待できる可能性を示唆しており、臨床的にも重要な知見と考えられた。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of pharmacological sciences 134(3): 139-146, 2017