

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
田代圭太郎	主査 教授 樋口 和秀 副査 教授 芝山 雄老 副査 教授 林 秀行 副査 教授 古谷 榮助
主論文題名 Chymase inhibitor prevents the nonalcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet (メチオニン・コリン欠損食誘発性ハムスター非アルコール性脂肪肝炎モデルにおけるキマーゼ阻害薬の効果)	
学位論文内容の要旨	
《研究目的》 非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic Steatohepatitis; NASH)は飲酒歴がないにも関わらず肝細胞に著明な中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が起こり、アルコール性肝障害に特徴とされる病理所見が認められることを特徴とする疾患概念である。これらの疾患は肥満や糖尿病、脂質異常症などのメタボリック症候群を背景に持つことが多いとされているが、未だ有効な治療法は確立されていない。 最近になって NASH ラットモデルに肥満細胞脱顆粒抑制剤であるトラニラストの投与が肥満細胞の活性化を抑制し、さらに肝線維化の進行を抑制したと報告された。キマーゼは、肥満細胞顆粒中に存在している酵素であり、刺激時に脱顆粒をして活性化され、酵素機能を発揮する。キマーゼと肝線維化についての報告はこれまでにほとんどなかった。最近、ヒト肝硬変症例において、線維化に伴い肝臓組織中のキマーゼ活性が増加したことが報告され、肝線維化とキマーゼ含有肥満細胞との関連性が強く示唆された。 本研究ではメチオニン・コリン欠損(MCD)食誘発性ハムスターNASH モデルを使用してキマーゼ阻害薬の効果を検討した。	

《方 法》

20 週齢の F1B ハムスター 21 匹を 3 群に分けて、Placebo 群(n=7)には MCD 食と生理食塩水、TY 群(n=7)には MCD 食とキマーゼ阻害薬 TY-51469(1mg/kg/day)を投与し、Control 群(n=7)には標準固形飼料にて各々 8 週間飼育した。

血漿中の総ビリルビン量、トリグリセリド量およびヒアルロン酸量を測定した。キマーゼ活性は肝組織抽出液を用いてアンジオテンシン I(AI)を基質に測定した。マロンジアルデヒド(MDA)は TBARS 測定キットを使用して測定した。matrix metalloprotease (MMP)-9 を測定するためにゼラチンザイモグラフィを用いた。

組織学的検討として、カルノア固定した後パラフィン包埋した肝組織から厚さ 4 μ m の切片を作成して H.E.染色を行った。線維化面積を定量するためシリウスレッド染色を行った。また、肝臓内の肥満細胞数を定量するためにトルイジンブルー染色を、キマーゼ陽性細胞数とアンジオテンシン II(AII)陽性細胞数を定量するために免疫組織学的染色を行った。

《結 果》

摘出された肝臓は肉眼的に Placebo 群で黄白色を示し、TY 群では Control 群と同様に暗赤色を呈していた。血漿中総ビリルビン、トリグリセリド、ヒアルロン酸量は全て Placebo 群で著明に上昇し、TY 群で有意に抑制された。

組織学的検討では H.E.染色で Placebo 群では脂肪滴の高度蓄積がみられたのに対し、TY 群ではこれを劇的に改善した。さらに、Placebo 群では好中球の浸潤も高度にみられたため、酸化ストレスのマーカである MDA を測定すると Placebo 群で有意に上昇し、TY 群でこれを有意に抑制していた。

肝線維化を解析するためシリウスレッド染色でコラーゲンの定量を行った。Placebo 群で著明なコラーゲンの沈着を認め、キマーゼ阻害薬はこれを有意に減少させた。

肝組織における肥満細胞数は Placebo 群で有意に増加し、TY 群で有意に抑制されていた。この結果と同様にキマーゼ陽性細胞数や AII 陽性細胞数は Placebo 群で増加し、キマーゼ阻害薬で有意に減少した。キマーゼ活性も Placebo 群での著明な上昇がキマーゼ阻害薬によって有意に抑制されていた。

肝 MMP-9 活性は Control 群と比較して Placebo 群で有意に上昇し、TY 群ではそれを有意に抑制した。

《考 察》

キマーゼはハムスターモデルにおいて AI から AII へ変換する酵素機能を有し、AII はコラーゲン生成を促進する TGF- β の遺伝子発現も上昇させる。既に AII 受容体拮抗薬が NASH の線維化を抑制することが報告されており、今回の研究でもキマーゼ阻害薬により AII 陽性細胞数は減少した。さらにキマーゼは TGF- β を活性型に変換する酵素としても知られており、今回の研究ではキマーゼを阻害することにより AII 産生が抑制されたことに加え、TGF- β の活性化も阻害され肝線維化を抑制させたと考えられる。

また、今回の研究ではキマーゼ阻害薬により脂肪滴の沈着を劇的に改善した。以前の報告では AII が脂肪肝の進展に重要な役割を担うことが示されており、AII の抑制は酸化ストレスと同時に脂肪化も抑制することが知られている。今回の研究で酸化ストレスのマーカーである MDA レベルをキマーゼ阻害薬が低下させたことから、AII の抑制が脂肪滴沈着を改善させたと考えられる。

肝臓の線維化は細胞外マトリックスの過剰産生により進展し、MMP-9 は線維化形成に重要な役割を担っている。今回の研究では MCD 食群で MMP-9 活性が有意に上昇したが、キマーゼ阻害薬によりこの上昇が有意に抑制された。それゆえ MMP-9 活性の阻害もキマーゼ阻害薬による NASH の線維化抑制に関わった可能性がある。

《結 論》

肥満細胞は肝線維化と深く関わっていることが知られているが、我々は MCD 食誘発性ハムスター NASH モデルにおいて、AII や MMP-9 の増加によりキマーゼが NASH の進展に重要な役割を担っていることを示した。この結果により、キマーゼ阻害薬がヒト NASH 患者における新しい治療戦略になることが期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	田代圭太郎
論文審査担当者			主査教授 樋口 和 秀	
			副査教授 芝山 雄 老	
			副査教授 林 秀 行	
			副査教授 古谷 榮 助	
主論文題名				
Chymase inhibitor prevents the nonalcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet				
(メチオニン・コリン欠損食誘発性ハムスター非アルコール性脂肪肝炎モデルにおけるキマーゼ阻害薬の効果)				
論文審査結果の要旨				
<p>非アルコール性脂肪肝炎(Nonalcoholic Steatohepatitis; NASH)は飲酒歴がないにも関わらず肝細胞に著明な中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が起こり、アルコール性肝障害に特徴とされる病理所見が認められる疾患概念である。NASH はメタボリック症候群を背景に持つことが多いとされているが、未だ有効な治療法は確立されていない。</p> <p>最近、NASH ラットモデルに肥満細胞脱顆粒抑制剤であるトラニラストの投与が肝線維化の進行を抑制したと報告された。また、ヒト肝硬変症例においては線維化に伴い肝臓組織中のキマーゼ活性が増加したことが報告されたことから、肥満細胞顆粒中に存在している酵素であるキマーゼと肝線維化との関連性が強く示唆された。</p> <p>本研究ではメチオニン・コリン欠損(MCD)食誘発性ハムスターNASH モデルを使用してキマーゼ阻害薬 TY-51469 の効果を検討した。</p> <p>その結果、血漿総ビリルビン、トリグリセリド、ヒアルロン酸量は全て Placebo 群で著明に上昇し、TY 群で有意に抑制された。</p>				

組織学的検討では H.E.染色で Placebo 群では脂肪滴の高度蓄積がみられたのに対し、TY 群ではこれが劇的に改善された。さらに、酸化ストレスのマーカである MDA を測定すると Placebo 群で有意に上昇し、TY 群でこの上昇が有意に抑制された。肝線維化を解析するためシリウスレッド染色でコラーゲンの定量を行うと、Placebo 群で著明なコラーゲンの沈着を認め、キマーゼ阻害薬はこれを有意に減少させた。肝組織中のキマーゼ陽性細胞数やアンジオテンシン II (AII) 陽性細胞数は Placebo 群で増加し、キマーゼ阻害薬で有意に減少した。肝 matrix metalloprotease (MMP)-9 活性は Control 群と比較して Placebo 群で有意に上昇し、TY 群ではそれを有意に抑制した。

キマーゼはハムスターモデルにおいて AI から AII へ変換する酵素機能を有し、AII は TGF- β の遺伝子発現も上昇させる。さらにキマーゼは TGF- β を活性型に変換する酵素としても知られており、キマーゼを阻害することにより AII 産生が抑制されたことに加え、TGF- β の活性化も阻害され肝線維化を抑制させたと考えられた。また、MMP-9 は線維化形成に重要な役割を担っており、MMP-9 活性の阻害もキマーゼ阻害薬による NASH の線維化抑制に関わった可能性がある。一方、今回の研究ではキマーゼ阻害薬により脂肪滴の沈着が劇的に改善された。以前に AII の抑制は酸化ストレスと同時に脂肪蓄積も抑制することが報告されており、キマーゼ阻害薬による AII の抑制が脂肪滴沈着を改善させたと考えられた。結論として AII や MMP-9 の増加によりキマーゼが NASH の進展に重要な役割を担うことを示した。この結果により、キマーゼ阻害薬投与がヒト NASH の新しい治療戦略になることが期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定める所の博士(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)

Hepatology Research: (): - , 2010 in press