

氏 名	今 井 義 朗
(ふりがな)	(いまい よしろう)
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 26 年 1 月 15 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 inhibition attenuates lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure in hamsters (ハムスターリポポリサッカライド/D-ガラクトサミン誘発急性肝不全におけるキマーゼ阻害の効果)
論文審査委員	(主) 教授 樋 口 和 秀 教授 朝 日 通 雄 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

急性肝不全(劇症肝炎を含む)は、広範囲な肝細胞壊死を呈し、肝性脳症、黄疸、腹水、浮腫、消化管出血、播種性血管内凝固などが出現する予後不良な疾患である。一旦劇症肝炎に陥ると、内科的治療における救命率は低く、肝移植は確立された治療法ではあるが、本邦の現状を考えると、その機会も少なく、新たな治療法の確立は急務である。

近年、不明であった急性肝不全における急激に進行する肝細胞破壊のメカニズムに、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の一種である MMP-9 が深く関わっている事が報告された。MMP-9 活性化には、前駆体である proMMP-9 を酵素的に切断する必要があるが、肥満細胞顆粒球に存在する酵素であるキマーゼが、その MMP-9 活性化作用を持つと報告されている。そこで、申請者らは、急性肝不全における MMP-9 とキマーゼの関与に

着目し、ハムスターにリポポリサッカライド(LPS)/D-ガラクトサミン(GalN)を投与して作製する急性肝不全モデルを用いて、キマーゼ阻害薬による MMP-9 に対する影響と急性肝不全に対する予防効果を検討した。

《方 法》

キマーゼの動物種差を考慮し、動物モデルをヒトと類似した特徴のキマーゼを持つハムスターで行った。実験 1 では、急性肝不全の関連因子とキマーゼおよび MMP-9 の経時的解析を行い、実験 2 では、キマーゼ阻害薬の予防効果を検討した。

実験 1: 7 週齢の雄性ハムスターを用いて、LPS/GalN の投与前、投与後 1 時間、2 時間、4 時間、24 時間に肝臓の摘出と血漿を採取した。摘出した肝臓より炎症性サイトカインである tumor necrosis factor(TNF)- α と interleukin(IL)-1 β 、そして、MMP-9 とキマーゼの活性、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド(MDA)を測定した。また、血漿中の AST および ALT を測定した。

実験 2: 7 週齢の雄性ハムスターを正常群、LPS/GalN 投与群(placebo 群)、キマーゼ阻害薬 (TY-51469) 投与 2 群(10mg/kg と 30mg/kg)の 4 群に分類した。炎症性サイトカイン、MMP-9 活性およびキマーゼ活性が最高値を示した LPS/GalN 投与後 2 時間において、実験 1 と同様に解析した。また、LPS/GalN 投与後 24 時間において、血液中の AST および ALT と肝臓組織の壊死面積に対するキマーゼ阻害薬の影響を解析した。また、肝組織中の肥満細胞数も定量し、IL-1 β および好中球のマーカーであるミエロペルオキシダーゼ(MPO)の遺伝子発現レベルを測定した。

《結 果》

実験 1: LPS/GalN 投与後 2 時間において、肝臓組織中のキマーゼ活性、MMP-9 活性、TNF- α 濃度は、最高値を示したが、その後は経時的に低下した。LPS/GalN 投与後 24 時間において血液中の AST、ALT、そして、肝臓中の MDA 値が有意な高値を示した。

実験 2: キマーゼ阻害薬は、LPS/GalN 投与後 2 時間におけるキマーゼ活性、MMP-9 活性、

TNF- α 活性、IL-1 β と MPO の遺伝子発現をすべて用量依存的に抑制した。また、LPS/GalN 投与後 24 時間における AST、ALT は共に有意に抑制され、肝組織中の MDA 値も有意に抑制された。また、壊死層の面積、肥満細胞数も同様にキマーゼ阻害薬で有意に抑制された。

《考 察》

本研究で行った実験 1 において、ハムスターに LPS/GalN を投与することにより、AST/ALT の著明な上昇、広範囲な肝細胞壊死、好中球、リンパ球の浸潤が認められた。急性肝不全モデルとしては、LPS/GalN 投与量などの改善の余地があるが、急性肝不全の pre-stage における組織所見としては矛盾がなかった。また、LPS/GalN 投与後 2 時間において、TNF- α や MMP-9 活性が急増したが、同時期にキマーゼ活性も有意に亢進していた。キマーゼが急性肝不全モデルの急性期において亢進することが示されたのは、申請者らの知る限り今回の実験が初めてと言える。

実験 2 では、急性期に急増する MMP-9 活性がキマーゼ阻害薬により有意に抑制され、TNF- α も有意に抑制された。好中球は TNF- α を含有し、MMP-9 の阻害は、炎症部位への好中球浸潤を抑制することが知られている。事実、本研究でも好中球のマーカである MPO の遺伝子発現が抑制された。また、肥満細胞も TNF- α を発現するが、キマーゼ阻害薬は、肥満細胞の集積抑制作用を持ち、本研究でも肥満細胞の集積抑制を認めた。これらの好中球や肥満細胞の集積抑制が、TNF- α の抑制に寄与したと考えられる。

以上の結果より、キマーゼ阻害薬は、急性肝不全モデルの急性期において MMP-9 活性や炎症性サイトカインである TNF- α を強力に抑制することを介して、急性肝不全の病状を軽減する可能性が示された。

論文審査結果の要旨

急性肝不全(劇症肝炎を含む)は、予後不良な疾患であり、未だ有効な治療法は確立されていない。本研究では、ハムスターにリポポリサッカライド(LPS)/D-ガラクトサミン(GalN)を投与して作製する急性肝不全モデルを用いて、キマーゼ阻害薬による急性肝不全に対する予防効果を検討している。

その結果、申請者はまず LPS/GalN 投与後 2 時間において、肝組織中の MMP-9 活性および TNF- α 濃度に加え、キマーゼ活性も著明に増加することを示している。この急性肝不全モデルの急性期におけるキマーゼの亢進は、今回の実験で初めて確認されている。さらに、キマーゼ阻害薬の投与により、LPS/GalN 投与 2 時間後に増加する肝組織中の MMP-9 活性および TNF- α 濃度、そして、肝組織中の MPO 活性や IL-1 β 濃度が抑制されること、また、LPS/GalN 投与 24 時間後において、血漿中の AST、ALT、肝組織中の壊死面積、肥満細胞数もキマーゼ阻害薬で有意に抑制されることを示している。以上より、キマーゼ阻害薬が急性肝不全に対して予防効果を持つ可能性が示唆された。

キマーゼは、肥満細胞顆粒に存在する酵素で、MMP-9 の前駆体を MMP-9 に活性化することが知られている。本研究では、キマーゼ阻害薬により肝不全急性期に増加する MMP-9 が抑制され、急性肝不全と関連性がある TNF- α も抑制されることを示した。MMP-9 の阻害により、TNF- α を含有する好中球の浸潤が抑制されることやキマーゼの阻害により、TNF- α を含有する肥満細胞の集積が抑制されることが報告されている。本研究でも好中球のマーカーである MPO の遺伝子発現が抑制され、肥満細胞の集積抑制が認められていることから、好中球や肥満細胞の集積抑制が、TNF- α の抑制に寄与したものと考えられる。

結論として、キマーゼ阻害薬は LPS/GalN 誘発急性肝不全モデルにおいて、MMP-9 や炎症性サイトカインを抑制し、急性肝不全の予防効果を持つ可能性が示唆されたことより、今後の臨床応用が期待される。

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)

Pharmacology 93(1-2): 47-56, 2014