

氏名 (生年月日) おざき たけよし  
尾崎 健芳 (1994年3月29日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博薬第225号

学位授与の日付 2023年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 非アルコール性脂肪肝炎における肝線維化過程への類洞内皮細胞および肝星細胞の IVA 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の関与の解明

論文審査委員 (主査) 教授 秋葉 聡

(副査) 教授 中田 徹男

(副査) 教授 長澤 一樹

## 論文内容の要旨

### 序章

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、高カロリー食の過剰摂取に起因した肝での脂肪蓄積にはじまり炎症を伴った線維症をきたす進行性の肝疾患である。NASH 患者は自覚症状に乏しいため NASH の早期発見が困難であり、また、線維化の進展に伴い予後不良の肝硬変や肝がんの発症リスクが上昇することから、特に NASH 線維症に対する治療が重要課題である。現在、運動や食餌療法による生活習慣の改善が NASH の第一選択の治療法として推奨されているが、本療法には長期間を要し、患者のコンプライアンス不良が大きな障害となっていることから、NASH 線維症の治療に向けた薬物療法の確立が求められている。

NASH での肝線維化は炎症により進展することから、所属分野では、線維症の治療標的分子として起炎分子産生の初発反応を担う IVA 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (IVA-PLA<sub>2</sub>) に着目し、本酵素の全身性欠損マウスにおいて肝線維化が抑制されることが見出された。しかしながら、IVA-PLA<sub>2</sub> は全身の細胞に普遍的に発現しており、本酵素を介した炎症の制御や恒常性の維持を担う細胞も存在することから、細胞種非選択的な本酵素の阻害は治療効果の低下や副作用の発現リスクの上昇に繋がる可能性が危惧される。したがって、IVA-PLA<sub>2</sub> を治療標的とした線維症の薬物療法の確立には本酵素を介した肝線維化を担う責任細胞を同定することが必須となる。そこで本研究では、細胞種選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスを用い、NASH での肝線維化における各種肝構成細胞の本酵素の関与を検証した。

### 第1章 非アルコール性脂肪肝炎における肝線維化への類洞内皮細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> の関与

本章では、NASH の病態に対する細胞種選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損の影響から、IVA-PLA<sub>2</sub> を介した NASH 進展を担う責任細胞種を特定した。Cre/loxP システムでの条件特異的遺伝子破壊法により、全身性に IVA-PLA<sub>2</sub> を欠損させたマウスの他、脂肪滴を含む肝実質細胞、線維化促進因子を分泌する内皮細胞/類洞内皮細胞や単球・マクロファージ、およびコラーゲン産生を担う活性化肝星細胞の各細胞において選択的に IVA-PLA<sub>2</sub> を欠損させたマウスに、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料 (CDAHFD) を3週間摂食させ、初期段階の NASH モデルを作出した。血清肝逸脱酵素である AST・ALT の活性およ

び肝トリグリセリド量の測定により肝障害および脂肪肝形成の程度を、肝組織切片のピクロシリウスレッド染色によりコラーゲンの蓄積に伴う線維化の程度をそれぞれ評価した。さらに、肝星細胞の活性化マーカーである $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) の発現量をウェスタンブロット法および免疫染色法により解析した。その結果、CDAHFDにより肝障害や脂肪肝形成が誘発されたが、これらは全身性および各細胞種選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損により軽減されなかった。一方、CDAHFDによる肝線維化は、対照マウスに比し全身性および内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでは有意に抑制されたが、他の細胞種選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでは抑制効果はみられなかった。また、CDAHFDによる $\alpha$ -SMA 発現量および $\alpha$ -SMA 発現細胞数の増加が、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスにおいて低減していたことから、類洞内皮細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> が肝星細胞の活性化を促進することが明らかになった。さらに、類洞内皮細胞の毛細血管化が肝星細胞の活性化を促進することから、毛細血管化の指標となる類洞内皮の小孔数の減少程度を走査電子顕微鏡にて観察した結果、内皮細胞/類洞内皮細胞選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでは、CDAHFDによる毛細血管化が顕著に抑制された。以上のことから、NASH の進展において、類洞内皮細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> が類洞内皮の毛細血管化を亢進するとともに、肝星細胞の活性化や肝線維化を促進することが示唆され、類洞内皮細胞が IVA-PLA<sub>2</sub> を介した NASH 進展を担う責任細胞種であると考えられる。

## 第2章 食餌療法開始後にみられる肝線維化進展への肝星細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> の関与

高脂肪食下の肝組織では、IVA-PLA<sub>2</sub> が産生を担う脂質性起炎因子以外に、コラーゲン産生促進因子である形質転換増殖因子- $\beta$  や、炎症性サイトカインなどの複数の因子が肝星細胞を活性化させる。このことを踏まえると、肝星細胞での IVA-PLA<sub>2</sub> の欠損が高脂肪食下での肝線維化に影響しなかった前章の結果は、肝星細胞活性化因子群の共存に起因すると考えられ、高脂肪食の影響を除く目的で普通食へと切り替えた条件下では肝星細胞選択的な IVA-PLA<sub>2</sub> の欠損が肝線維化に対して抑制効果を示す可能性がある。そこで本章では、この食餌療法を想定した実験系にて肝星細胞 IVA-PLA<sub>2</sub> の肝線維化への関与について検証した。肝星細胞選択的 IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスおよび対照マウスに CDAHFD を9週間投与し、著しい脂肪肝および白血球の浸潤を伴う肝線維化を誘発した後、普通食を5週間摂食させたところ、両遺伝子型マウスとも脂肪滴はほぼ消失したが、対照マウスでの肝線維化の程度は約2倍に増大し、CDAHFD 投与下にみられた白血球の浸潤はほとんど抑制されていなかった。しかしながら、同欠損マウスでの普通食投与後の肝線維化の増加は1.3倍程度で統計学的に有意な差はなく、白血球の浸潤は有意に抑制されていたことから、肝星細胞選択的な IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損により食餌療法後の線維症の悪化は軽減されることが判明した。さらに、対照マウスの肝組織では、単球の浸潤を担う単球走化因子 (MCP-1) の遺伝子が CDAHFD 投与下に発現していたが、同欠損マウスでの発現量は対照マウスに比し有意に34%低下していた。なお、普通食投与後の MCP-1 遺伝子の発現量は、両遺伝子型マウスとも CDAHFD 投与下に比し70%以上低下し同程度であった。このように、食餌療法下に肝星細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損による抗炎症および抗線維化効果がみられたことは、白血球浸潤や肝線維化への肝星細胞 IVA-PLA<sub>2</sub> の促進的な関与を示唆しており、肝星細胞由来の MCP-1 に応答した単球の浸潤がそのメカニズムの一端を担っていると推察する。

## 総括

本研究では、類洞内皮細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> が、NASH の進展過程における毛細血管化および肝星細胞の活性化を亢進し、肝線維化を促進することを明らかにした。さらに、肝星細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> は MCP-1 の発現を介して、肝線維化の要因となる単球等、白血球の浸潤に関与することを見出した。本研究成果は、食餌療法と併せて類洞内皮細胞と肝星細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> を選択的に阻害することが、副作用の

発現リスクを抑えた、高効果的な線維症の治療に繋がることを示しており、NASH の薬物療法の実現化に貢献すると考える。

## 審査の結果の要旨

### 《緒言》

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、高脂肪食等の過剰摂取に起因した脂肪肝や炎症とともに肝線維化をきたす進行性の肝疾患である。NASH における肝線維症の治療法の確立は、肝硬変・肝がんへの進展を防ぐための最重要課題であるが、現状は効果に乏しく継続し難い食餌療法が主体である。一方、薬物療法に関しても、食餌療法と同様に脂肪肝を抑制する観点から脂質異常症治療薬などの既存薬での治療が試みられているが、肝線維症に対する効果は低く、肝線維化の進展阻止を狙った治療薬が求められている。このような現状において、本研究では、炎症の制御により肝線維化を抑制する観点から、細胞質に存在する起炎関連酵素である IVA 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>（IVA-PLA<sub>2</sub>）が治療標的となる可能性を考え、肝線維化への IVA-PLA<sub>2</sub> の関与を明確にする目的で、各種肝構成細胞において選択的に IVA-PLA<sub>2</sub> を欠損させたマウスを用い、本酵素を介した肝線維化を担う責任細胞の特定を試みた。

### 《審査結果の要旨》

第 1 章では、IVA-PLA<sub>2</sub> を介した肝線維化を担う責任細胞を明確にする目的で、肝組織を構成する肝実質細胞、内皮細胞/類洞内皮細胞、単球・マクロファージ、および肝星細胞のそれぞれにおいて選択的に IVA-PLA<sub>2</sub> を欠損させたマウスに、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料を 3 週間摂食させることで NASH における初期段階の肝線維症を誘起させた。その結果、線維化促進因子を分泌する内皮細胞/類洞内皮細胞において選択的に IVA-PLA<sub>2</sub> を欠損させたマウスでのみ、高脂肪食誘発性の肝線維化が対照マウスに比し有意に軽減されていた。さらに、対照マウスでは、線維成分であるコラーゲンの産生を担う肝星細胞が活性化状態にあり、肝星細胞の活性化の促進に関与する類洞内皮細胞の毛細血管化が誘起されていたが、同欠損マウスでは、高脂肪食摂取に伴う肝星細胞の活性化は低減しており、類洞内皮細胞の毛細血管化は顕著に抑制されていた。したがって、類洞内皮細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> が類洞内皮細胞の毛細血管化を誘起することで、肝星細胞の活性化を介した肝線維化を促進させることが示唆され、類洞内皮細胞が IVA-PLA<sub>2</sub> を介した肝線維化を担う責任細胞種であることが判明した。

第 2 章では、高脂肪飼料を 9 週間摂食させることで著しい肝線維症を誘起させた後、食餌療法を想定した実験系として普通食を 5 週間摂食させた条件下にて、肝星細胞選択的な IVA-PLA<sub>2</sub> の欠損が食餌療法下での肝線維化状態に対して抑制効果を示す可能性について検証した。高脂肪食摂取下の同欠損マウスおよび対照マウスに普通食を摂食させた結果、対照マウスでは肝線維化が増悪化し、白血球の浸潤も普通食投与前に比しほとんど抑制されていなかったが、同欠損マウスでの肝線維化は普通食投与前と同程度で悪化することはなく、白血球の浸潤は有意に抑制されていた。さらに、対照マウスの肝組織では、単球の浸潤を担う単球走化因子（MCP-1）の遺伝子が高脂肪食摂取下に発現していたが、同欠損マウスでの発現量は対照マウスに比し有意に低下していた。これらの結果から、肝星細胞での IVA-PLA<sub>2</sub> を介した MCP-1 の産生が、食餌療法下でもみられた白血球浸潤や肝線維化の増悪化に関与していることが示唆された。

#### 《審査の結論》

本研究で得られた知見からは、類洞内皮細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> が NASH の進展過程における類洞内皮細胞の毛細血管化および肝星細胞の活性化を亢進して肝線維化を促進すること、さらに、肝星細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> は MCP-1 の発現を介して肝線維化の要因となる白血球の浸潤に関与することが推察された。本研究の成果は、食餌療法と併せた類洞内皮細胞および肝星細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> の選択的な阻害が高効果的な肝線維化の阻止に繋がることを示唆しており、NASH での肝線維症に対する薬物療法に関して新規治療観点を提示するものである。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。