

氏 名 (生年月日) <sup>かな い し ほ</sup>  
金 井 志 帆 (1984 年 6 月 15 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 論博 第 206 号

学位授与の日付 2017 年 3 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 非アルコール性脂肪性肝炎の進展機構への IVA 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の関与と  
その新規阻害剤の進展阻止効果

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 秋 葉 聡

(副査) 教 授 大 矢 進

(副査) 教 授 中 田 徹 男

## 論 文 内 容 の 要 旨

学位論文の基礎とした一連の研究では、非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) の薬物療法に関する新規治療観点の提唱を目指しており、炎症の制御が治療に繋がる可能性を考え、脂質性起炎物質の産生初発反応を担う IVA 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (IVA-PLA<sub>2</sub>) が病態進展に関与すること、および、本酵素の阻害が NASH の進展阻止に繋がることを明らかにした。

NASH は、過度の飲酒歴なしに脂肪肝から肝線維化をきたすことで肝硬変や肝がんへと進展する生活習慣病であり、肝細胞での脂肪蓄積に伴う酸化ストレスや、これに続く肝組織での炎症が肝線維化の要因となると考えられている。現在、NASH の治療としては第一に食事・運動療法であるが、脂肪肝から肝線維化へと至る過程では無症状のためコンプライアンス不良となりやすい。そのため病態進展に関与する分子に作用する治療薬の使用や開発が望まれるが、酸化ストレスの抑制を狙った治療観点は必ずしも十分な効果を示さない。本研究では、炎症を担う分子として着目した IVA-PLA<sub>2</sub> が NASH における肝線維化過程に関与すると考え、IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスおよび新規 IVA-PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤を用いて本酵素を介した進展機構や阻害剤の有効性について検証した。

### 1. NASH モデルマウスにおける IVA-PLA<sub>2</sub> を介した肝線維化形成機構

NASH の進展機構への IVA-PLA<sub>2</sub> の関与を明らかにするために、NASH モデルとして野生型および IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスに高脂肪高コレステロール食 (HFCD) を 16 週間摂取させ組織学的に解析した結果、野生型マウスでの肝線維化は IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスにおいて軽減されていた。これらの肝組織のプロテオーム解析により、野生型において HFCD 摂取により変動したタンパク質のうち、欠損型においてその変動が抑制されていたタンパク質を同定したところ、脂肪肝形成に関連するタンパク質ではなかったが、肝線維化形成に関連するタンパク質が 3 つ同定された。それらのうち、特に NASH で増加することが報告されている cytokeratin 18 が野生型において増加しており、欠損型においては顕著に減少していたことから、IVA-PLA<sub>2</sub> は NASH の進展に促進的に関与していることが示唆された。さらに、脂肪肝を経由せずに酸化ストレスを初発とした肝線維化を四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) の 6 週間の投与により誘起したモデルにおいても、欠損型では肝線維化や、コラーゲン線維の蓄積、これを産生する

肝星細胞の活性化が減少していた。また、肝星細胞の活性化に関与する炎症細胞の変動を調べたところ、IVA-PLA<sub>2</sub>欠損マウスでは単球やマクロファージのマーカーである F4/80 や CD11b の mRNA 発現量およびこれらの遊走因子である MCP-1 の mRNA 発現量が減少していた。一方、CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞や NKT 細胞は、定量的 RT-PCR 解析や FACS 解析では野生型において見られた肝組織への集積は欠損型では抑制されなかった。したがって、IVA-PLA<sub>2</sub> は NASH において肝線維化形成に関与しており、それに単球やマクロファージの浸潤を促進させる機構が関与することが示唆された。

## 2. 新規 IVA-PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 (ASB14780) の NASH 進展阻止効果

肝線維化過程への IVA-PLA<sub>2</sub> の関与が示唆されたことから、その阻害が病態の進展阻止に繋がる可能性を検証した。新規経口活性型 IVA-PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 (ASB14780) を CCl<sub>4</sub> 誘発性の NASH モデルマウスに連日投与した結果、肝組織でのコラーゲン繊維の蓄積、単球/マクロファージの集積、MCP-1 の mRNA 発現増加が抑制された。一方、HFCD の摂取下でも、ASB14780 の連日投与は肝での SREBP1c などの脂質合成関連分子の mRNA 発現増加を抑え、脂肪肝形成を抑制した。また、ASB14780 はほぼ完全に HFCD 摂取による体重増加を抑えたが、IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでは体重減少は見られなかったため、HFCD 誘発性の肥満に対する ASB14780 の薬理学的効果は IVA-PLA<sub>2</sub> の活性抑制とは異なる作用機序であると思われる。さらに、CCl<sub>4</sub> または HFCD 処理による病変が形成された状態に ASB14780 を投与し、その治療効果を検証した結果、ASB14780 は肝線維化や脂肪肝の進行を抑え、肝組織障害の回復を促した。したがって、IVA-PLA<sub>2</sub> は NASH の進展阻止に有効な標的分子となる可能性が示された。

## 3. IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損下でのオートファジー増強による CCl<sub>4</sub> 誘発性肝細胞死の抑制

肝線維化における IVA-PLA<sub>2</sub> の役割を解明するため、CCl<sub>4</sub> 単回投与下での酸化ストレスを初発とした急性肝障害の実験系において IVA-PLA<sub>2</sub> の関与を検討した結果、IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでは野生型マウスに比し血清 AST および ALT レベルの上昇は軽減されており、また、TUNEL 染色陽性となる肝実質細胞の増加も抑制されていたことから、酸化ストレスが引き金となる肝障害や、アポトーシス性と思われる細胞死に IVA-PLA<sub>2</sub> の関与が示唆された。この IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損下での TUNEL 陽性細胞数の減少に、アポトーシス性細胞死に対して抑制的に働くオートファジーの関与を考え、初代培養肝細胞を用いてクロロキン処理下で検出される恒常性オートファジーの指標として microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II (LC3-II) を測定した。その結果、IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損型では野生型に比し LC3-II が増加し、オートファゴソームの蓄積が見られた。このことから、肝実質細胞の IVA-PLA<sub>2</sub> は酸化ストレス下に恒常性オートファジーを抑制することで急性肝障害を促進することが示唆され、このことが継続的な酸化ストレスに伴う肝組織での炎症の惹起にも関与すると思われる。

以上の成果から、IVA-PLA<sub>2</sub> は HFCD や CCl<sub>4</sub> 誘発性の肝線維化の進展や CCl<sub>4</sub> 誘発性の急性肝障害に対して促進的に作用していることが示唆された。IVA-PLA<sub>2</sub> を介した CCl<sub>4</sub> 誘発性の肝線維化の進展機構として、MCP-1 の発現増大によるマクロファージの肝組織への浸潤が関与すると考えられる。また、IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損の肝実質細胞では恒常性オートファジーが亢進しており、肝細胞死が生じにくいことが示唆された。オートファジー関連遺伝子を単球特異的に欠損させたマウスでは、CCl<sub>4</sub> 誘発性の肝線維化を促進するとの報告があり、本研究における IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでも肝実質細胞だけではなくマクロファージのオートファジーが亢進して肝線維化が抑制された可能性もある。また、IVA-PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤の経口投与は CCl<sub>4</sub> 誘発性の肝線維化形成や HFCD 誘発性の脂肪肝形成を抑制したことから、

IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスでの結果も考慮すると、本酵素を阻害することが NASH の治療上有効である可能性が示された。本阻害剤を治療薬として用いるにはさらなる研究が必要であるが、IVA-PLA<sub>2</sub> の阻害は NASH の薬物療法に関する新規治療観点として期待される。

## 論文審査の結果の要旨

金井志帆氏より提出された論文博士学位論文は、非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis: NASH）の薬物療法における新規治療観点の提唱を目指した研究の成果を基に構成されている。本研究で取り上げた NASH は、過度の飲酒歴なしに脂肪肝から肝線維化をきたすことで肝硬変や肝がんへと進展する生活習慣病であるが、予後不良要因となる肝線維化の阻止を目的とした有効な薬物療法はないのが現状であり、その確立ために病態進展を担う責任分子同定、および、それに基づいた治療薬の開発が望まれている。申請者は、NASH の新規治療観点として、炎症の制御が治療に繋がる可能性を考え、脂質性起炎物質の産生初発反応を担う IVA 型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (IVA-PLA<sub>2</sub>) が病態進展に関与する責任分子の候補となること、および、本酵素の阻害が NASH における肝線維化への進展阻止に繋がることを実証した。その成果は、3 報の国際学術誌に掲載されており、本論文では 3 つの章からなる論文としてまとめている。

第 1 章では、炎症を担う分子として着目した IVA-PLA<sub>2</sub> が NASH における肝線維化過程に関与することを、高脂肪食負荷または四塩化炭素投与による酸化ストレスを負荷した IVA-PLA<sub>2</sub> 欠損マウスを用いて検討しており、IVA-PLA<sub>2</sub> が肝組織での単球の遊走因子 (MCP-1) の産生を担うことで、マクロファージの活性化を介した肝星細胞の活性化、これに続くコラーゲン線維の産生を促進することで肝線維化を誘起することを明らかにした。

第 2 章では、新規 IVA-PLA<sub>2</sub> 特異的阻害剤 (ASB14780) を経口投与したマウスを用い、SREBP1c などの脂質合成関連分子の mRNA 発現亢進を阻害することで脂肪肝形成を軽減させること、また、MCP-1 産生阻害およびマクロファージ集積阻害により肝線維化を抑制することを示した。さらには、脂肪肝および肝線維化が形成された後においても、本阻害剤は病変を軽減させることを実証した。

第 3 章では、IVA-PLA<sub>2</sub> の欠損が肝線維化を軽減させる機構の 1 つとして、IVA-PLA<sub>2</sub> の欠損下では肝細胞での恒常的なオーファジーが亢進していることで酸化ストレス下での肝障害・細胞死が抑制されることを示した。

申請者は、以上の研究成果から、NASH における脂肪肝形成および肝線維化のいずれの過程にも IVA-PLA<sub>2</sub> が病態進展因子として関与することを明確にし、その機構として、本酵素は肝細胞での恒常的なオーファジーを抑制することにより酸化ストレスによる肝細胞死を助長し、これに呼応した MCP-1 の産生亢進が肝線維化へと繋がる炎症を惹起することが示唆された。また、IVA-PLA<sub>2</sub> を阻害することが NASH の治療上有効である可能性が示された。

学位論文およびその基礎となる報文の内容を審査した結果、NASH の薬物療法に関する新規治療観点を提示した本研究成果は、NASH の病態分子機構を解明した点で学術的意義があり、薬学を基盤とした医療への貢献が期待される点でも評価できる。したがって、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有すると判断する。