

令和元年5月27日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18971

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪肝疾患に対する新規ビタミンEエステル型プロドラッグの効果

研究課題名(英文) The effect of a novel tocotrienol prodrug on nonalcoholic fatty liver disease in vitro and in vivo

研究代表者

渡瀬 大輔 (Watase, Daisuke)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：00580200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究室で開発した2R- α -tocotrienyl N,N-dimethylglycinate hydrochloride (α -T3DMG)は α -トコトリエノールを肝臓へ効率的に送達する水溶性プロドラッグである。本研究では α -T3DMGの脂肪肝抑制効果を評価した。 α -T3DMGは、HepG2細胞を用いたin vitro脂肪肝モデルでトリグリセリド(TG)量及び総コレステロール量を有意に抑制し、in vivo脂肪肝モデルのTSODマウスで血漿中TG濃度およびALT活性を有意に抑制した。 α -T3DMGの優れた脂肪肝抑制効果が明らかとなり、NAFLD治療薬として応用できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究室で開発した2R- α -Tocotrienyl N,N-dimethylglycinate hydrochloride (α -T3DMG)は α -トコトリエノールを肝臓へ効率的に送達する水溶性プロドラッグである。本研究ではin vitro及びin vivo脂肪肝モデルを用いて α -T3DMGが優れた脂肪肝抑制効果を有することを明らかにした。よって本研究により α -T3DMGを新規のNAFLD治療薬として臨床応用するための基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：2R- α -Tocotrienyl N, N-dimethylglycinate hydrochloride (α -T3DMG) is a prodrug of α -tocotrienol (α -T3) with high water-solubility and stability to oxidation, it could effectively deliver α -T3 in the rat liver. The present study investigated the therapeutic effects of α -T3DMG on a fatty liver model in vitro and in vivo. α -T3DMG significantly suppressed levels of triglyceride (TG) and total cholesterol on a fatty liver model using HepG2 cells. In addition, α -T3DMG significantly suppressed plasma ALT activities and plasma TG concentrations in TSOD mice with spontaneously developed obesity. These results indicated that α -T3DMG had a beneficial effect on hepatic steatosis, thus could be a promising candidate for the treatment of NAFLD.

研究分野：薬物送達学

キーワード：プロドラッグ NAFLD 脂肪肝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における成人の肥満人口(BMI 25 kg/m^2)は男性 1300 万人、女性 1000 万人に上り、肥満者では高頻度に脂肪肝性疾患を伴っている。脂肪肝性疾患とは肝細胞に中性脂肪(トリグリセリド、TG)が沈着して肝障害をきたす疾患の総称であり、年々その頻度は増加している。脂肪肝性疾患は以前アルコールによる肝障害が多かったが、糖尿病や肥満によっても同様な肝障害が起こることがわかり、現在ではそのような非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD)が増加している。

NAFLD は単純性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝炎 (NASH)からなり、10~20%は NASH が占める。NASH は NAFLD の重症型でアルコール性肝炎に類似した炎症、肝細胞風船様腫大、線維化などを肝組織に認め、治療介入がない場合は 5-10 年で 5-20%の症例が肝硬変に進行、さらには肝硬変から肝細胞癌へと発展しうるとされている。

NAFLD は肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧などの合併症を伴うことが多く、メタボリックシンドロームとともに密接に関連している。NAFLD に対する治療の原則は食事療法、運動療法などの生活改善により、背景にある肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧を是正することである。あわせてビタミン C,E を用いた抗酸化療法やピオグリタゾンなどでのインスリン抵抗性治療など、NAFLD 発症に重要な病態に対する治療を行う。種々の病態改善を目指した治療法が試みられ、その有効性が報告されているが、確立した治療法はないのが現状である。

ビタミン E 同族体において、抗酸化作用に加えてそれぞれ固有の新たな作用があることがわかり、そのうち γ -tocotrienol (γ -T3)については α -tocopherol (α -Toc)に見られない様々な固有の作用が発見され、新たな有用性が注目されてきている。 γ -T3 は脳ミトコンドリアにおいて、酸化ストレスにより惹起された脂質過酸化に対して α -Toc よりも優れた抑制効果を有する。さらに、 γ -T3 のコレステロール低下作用、癌細胞増殖抑制作用などの独自の作用が報告されている。しかし γ -T3 は水に全く溶けず、高粘性の油状物質であり、大気中の酸素で容易に酸化される不安定な化合物であるため、これらの物理化学的性質が bioavailability の確保において障害となる。そこで本研究室では、これまでに γ -T3 の十分な bioavailability を確保できる効率的な薬物送達法の確立を目的として、 γ -T3 のフェノール性水酸基にアミノカルボン酸類をエステル結合で導入した水溶性プロドラッグ 2R- γ -Tocotrienyl N,N-dimethylglycinate hydrochloride (γ -T3DMG)を開発した(Akaho et al. *Drug Metab Dispos* 2007)。

NASH/NAFLD に対するビタミン E を用いた多くの研究報告は α -Toc の研究評価であり、NASH/NAFLD に対する T3 での研究報告は少ない。

抗酸化作用を持つ α -Toc が NASH/NAFLD に対して有用であるというこれまでの研究報告をもとに、我々は新たな NASH/NAFLD 治療薬候補化合物として、 γ -T3 の水溶性プロドラッグ γ -T3DMG に着目した。

2. 研究の目的

In vitro 及び *in vivo* 脂肪肝モデルを用いて、本研究室で開発した γ -T3 の水溶性プロドラッグ γ -T3DMG の NAFLD 治療薬としての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

1. *In vitro* 脂肪肝モデル(free fatty acid-treated HepG2 cells)を用いたトリグリセリド(TG)及び総コレステロール(TCHO)生成に対する γ -T3DMG の効果

1-1 *In vitro* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG の細胞増殖性に及ぼす効果の検討
細胞増殖抑制を起ささない薬物濃度を設定するために下記の実験を行った。

96 well plate に HepG2 を 5.0×10^3 cells/100 μ L の密度で播種し、48 時間培養したものをを用いた。薬物含有培地(0, 10, 20, 40, 80, 100 μ M α -Toc, γ -T3 及び γ -T3DMG, 含 500 μ M パルミチン酸)を各ウェルに 100 μ L/well 添加し、12-48 時間後に CellTiter-Glo 試薬 (Promega)を用いて生細胞数を反映する ATP 活性をルミノメーターで測定した。

1-2 *In vitro* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG の TG 及び TCHO 生成に及ぼす効果の検討

1-1 の結果に基づき下記を行った。

HepG2 に薬物(α -Toc, γ -T3 及び γ -T3DMG)含有培地(含 500 μ M パルミチン酸)を添加し、24-48 時間培養した。Oil-Red-O 試薬を用いて細胞内脂肪滴を染色し、観察後色素を抽出して吸光度を測定した。ラボアッセイキット(Wako)を用いて TG 及び TCHO 量を測定した。

2. *In vivo* 脂肪肝モデル(TSOD マウス)に対する γ -T3DMG 長期経口投与による効果

7 週齢 TSOD マウス及び対照マウスである TSNO マウスを搬入後、8 週齢から 21 週齢まで薬剤 (α -Toc, γ -T3, γ -T3DMG) (47 μ mol/kg)を連日強制経口投与した。餌(CE-2)及び水は自由摂取とした。

2-1 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与が各組織重量へ及ぼす効果の検討
体重は連日測定した。さらにエンドポイントにて肝臓、皮下脂肪、精巣上体脂肪及び腎周囲脂肪の重量を測定し、 γ -T3DMG 長期経口投与が各組織重量へ及ぼす効果を検討した。

2-2 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与による血漿中 ALT 活性、TG 及び TCHO 量に及ぼす効果の検討

エンドポイントにて富士ドライケムスライド(FUJIFILM)を用いて血漿中 ALT 活性、TG 量及び TCHO 量を測定した。

2-3 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与による肝臓中 TG 及び TCHO 量に及ぼす効果の検討

エンドポイントにて摘出した肝臓より Folch 法に従って脂質を抽出しラボアッセイキット (Wako)を用いて TG 及び TCHO 量を測定した。

2-4 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与後の血漿及び肝臓中薬物量の測定
エンドポイントにおける血漿及び肝臓中の薬物を抽出し、LC-MS/MS を用いて薬物量(α -Toc, γ -T3)を測定した。

4. 研究成果

1-1 *In vitro* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG の細胞増殖性に及ぼす効果の検討

薬物添加 48 時間後、80, 100 μ M γ -T3 添加群及び 100 μ M γ -T3DMG 添加群において、コントロール群 (0 μ M)と比較して細胞増殖性が有意に抑制された。よって以下の評価項目は、薬物添加時間は 24 及び 48 時間、薬物濃度は 40 μ M 以下で検討した。

1-2 *In vitro* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG の TG 及び TCHO 生成に及ぼす効果の検討

パルミチン酸添加により、HepG2 細胞内の脂肪滴及び TG・TCHO 量は有意に増加した。薬物添加 24 時間後において、薬物非添加群と比較して 40 μ M γ -T3DMG は脂肪滴を有意に抑制し、48 時間後において 40 μ M γ -T3 及び γ -T3DMG は脂肪滴を有意に抑制した。また TG 量は、薬物添加 48 時間後において、薬物非添加群と比較して 40 μ M のすべての薬物で有意に抑制された。TCHO 量は、薬物添加 48 時間後において、薬物非添加群と比較して 10 μ M においては γ -T3DMG のみ有意に抑制され、40 μ M ではすべての薬物で有意に抑制された。

以上 *in vitro* 脂肪肝モデルを用いた評価により、 γ -T3DMG は γ -T3 及び α -Toc よりも効果的に脂肪生成を抑制することが明らかとなった。

2-1 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与が各組織重量へ及ぼす効果の検討
薬物非投与群において TSOD マウスの 8 週齢から 21 週齢まで体重増加量は、TSNO マウスと比較して大きくなった。その一方で γ -T3DMG 投与群および γ -T3 投与群では薬物非投与群と比較して体重増加量は小さくなる傾向を示した。また薬物非投与群においてエンドポイントにおける TSOD マウスの肝臓、皮下脂肪、精巣上体脂肪及び腎周囲脂肪の重量は TSNO マウスと比較して有意に増加した。皮下脂肪と腎周囲脂肪の重量に関して TSOD マウス薬物非投与群と比較し、 γ -T3DMG 投与群でのみ有意に減少した。

2-2 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与による血漿中 ALT 活性、TG 及び TCHO 量に及ぼす効果の検討

薬物非投与群において TSOD マウスの血漿中 ALT 活性及び血漿中 TG 濃度は、TSNO マウスと比較して有意に増加した。一方で血漿中 TCHO 濃度は、増加する傾向にはあったが、有意な変化ではなかった。血漿中 ALT 活性及び血漿中 TG 濃度は、TSOD マウス薬物非投与群と比較し、 γ -T3DMG 投与群でのみ有意に抑制された。血漿中 TCHO 濃度においては薬物による影響は見られなかった。

2-3 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与による肝臓中 TG 及び TCHO 量に及ぼす効果の検討

薬物非投与群において TSOD マウスの肝臓中 TG 及び TCHO 量は、TSNO マウスと比較して有意に増加した。肝臓中 TCHO 量は、TSOD マウス薬物非投与群と比較し、 γ -T3DMG 投与群でのみ有意に抑制された。肝臓中 TG 量は、 γ -T3DMG 投与群において減少する傾向にはあったが、薬物投与による有意な変化は見られなかった。

2-4 *In vivo* 脂肪肝モデルに対する γ -T3DMG 長期経口投与後の血漿及び肝臓中薬物量の測定
TSOD マウスの α -Toc 投与群の α -Toc 量は、他の群と比較して肝臓中では約 8 倍、血漿中では約 4 倍高くなった。一方で、 γ -T3 量は、 γ -T3 投与群における濃度と比較して γ -T3DMG 投与群の肝臓中で約 1.5 倍、血漿中では約 2 倍に高くなった。 γ -T3DMG 投与は、血漿や肝臓へ γ -T3 をより効率的に送達することによって γ -T3 投与よりも優れた脂肪抑制効果を示したと考えられた。

以上 *in vivo* 脂肪肝モデルを用いた評価により、 γ -T3DMG 投与は γ -T3 投与よりも効果的に γ -T3 を肝臓へ送達し、 γ -T3 及び α -Toc よりも優れた ALT 活性抑制効果及び脂肪抑制効果を有することが明らかとなった。

本研究により、 γ -T3DMG の優れた脂肪肝抑制効果が明らかとなり、NAFLD 治療薬として応用できる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 渡瀬大輔、長田-赤穂菜美、楠田真理子、寺田一樹、松永和久、加留部善晴、高田二郎
 γ -トコトリエノールエステル誘導体の *in vitro* 脂肪肝モデルにおける効果 ; 日本薬学会第 137 年会 (仙台)、平成 29 年 3 月 25 日

2) 渡瀬大輔、長田-赤穂菜美、楠田真理子、寺田一樹、後藤将太郎、松永和久、加留部善晴、高田二郎
 γ -トコトリエノールエステル型プロドラッグによる脂肪肝抑制効果 ; 第 29 回ビタミン E 研究

会 (京都)、平成 30 年 1 月 26 日

3) 平田茉莉花、渡瀬大輔、長田-赤穂菜美、平野-楠田真理子、寺田一樹、山川博文、後藤将太郎、松永和久、加留部善晴、高田二郎

In vivo 脂肪肝モデルにおける γ -トコトリエノールエステル型プロドラッグの脂肪肝抑制効果の評価；日本薬学会第 138 年会 (金沢)、平成 30 年 3 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。