

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K14970

研究課題名(和文)新規ビタミンEエステル型プロドラッグによるNAFLDからNASHへの進展抑制効果

研究課題名(英文)The effect of a novel tocotrienol prodrug on progression from NAFLD to NASH

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) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：2R- $\alpha$ -Tocotrienyl N,N-dimethylglycinate hydrochloride ( $\alpha$ -T3DMG) は  $\alpha$ -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。 $\alpha$ -T3DMGは、高脂肪食負荷TSODマウス由来肝細胞にTNF- $\alpha$ を負荷して作製したin vitro NASHモデルにおいて、IL-1 $\beta$ のmRNA発現量を有意に減少させ、ヒト肝星細胞株LX-2細胞に脂肪酸を負荷して作製したin vitro NASHモデルにおいて、 $\alpha$ -SMA及びTGF- $\beta$ 1のmRNA発現量を有意に減少させた。  
以上より、 $\alpha$ -T3DMGはNASHの進展を抑制できる可能性が示された。

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- $\alpha$ -Tocotrienyl N,N-dimethylglycinate hydrochloride ( $\alpha$ -T3DMG) は  $\alpha$ -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。本研究ではいくつかのin vitro NASHモデルを用いて  $\alpha$ -T3DMGが優れたNASH進展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  $\alpha$ -T3DMGを新規のNASH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- $\alpha$ -Tocotrienyl N, N-dimethylglycinate hydrochloride ( $\alpha$ -T3DMG) is a prodrug of  $\alpha$ -tocotrienol ( $\alpha$ -T3) with high water-solubility and stability to oxidation, it could effectively deliver  $\alpha$ -T3 in the rat liver. The present study investigated the therapeutic effects of  $\alpha$ -T3DMG on progression from NAFLD to NASH.  $\alpha$ -T3DMG significantly suppressed mRNA levels of IL-1 $\beta$  on in vitro NASH model prepared by adding TNF- $\alpha$  to hepatocytes derived from high-fat diet-fed TSOD mice. In addition,  $\alpha$ -T3DMG significantly suppressed mRNA levels of  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 on in vitro NASH model prepared by loading human hepatic stellate cell line LX-2 cells with free fatty acid. These results indicated that  $\alpha$ -T3DMG had a beneficial effect on progression from NAFLD to NASH, thus could be a promising candidate for the treatment of NASH.

研究分野：薬物送達学

キーワード：プロドラッグ

## 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 $\geq$ 25kg/m<sup>2</sup>)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。脂肪性肝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おこることがわかり、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 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。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。

それぞれのビタミン E 同族体について、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 $\gamma$ -T3 については $\alpha$ -トコフェロール( $\alpha$ -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。 $\gamma$ -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 $\alpha$ -Toc よりも優れた抑制効果を有する。さらに、 $\gamma$ -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 $\gamma$ -T3 は水に全く溶けず、高粘性の油状物質であり、水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っており、患者への治療薬としての効率的な投与を困難にしている。そこで $\gamma$ -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、本研究室では、これまでに $\gamma$ -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- $\gamma$ -Tocotrienyl N,N-dimethylglycinate hydrochloride ( $\gamma$ -T3DMG)を開発した(Akaho et al. *Drug Metab Dispos* 2007)。

NASH/NAFLD に対して $\alpha$ -Toc を用いた多くの研究報告があるが、なぜ $\alpha$ -Toc が NASH を改善することができるのかについては未だ明らかではない。また、 $\alpha$ -Toc の NASH 改善効果が抗酸化によるものであるならば、ビタミン E 同族体 $\gamma$ -T3 の水溶性プロドラッグである $\gamma$ -T3DMG についても同等、あるいはそれ以上の効果が期待できるのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

これまでに、*in vitro* 及び *in vivo* 脂肪肝モデルにおいて $\gamma$ -T3 より有意に TG 量を抑制すること、即ち First hit への有効性を明らかにした。

本研究では、更なる展開として、 $\gamma$ -T3DMG の Second hit への有効性、即ち肝細胞障害への効果及びそのメカニズムを明らかにし、 $\gamma$ -T3DMG を新規の NASH/NAFLD 治療薬として臨床応用するための基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

## 1, マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果及びその効果発現メカニズム

### 1-1 マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルの作製

TSOD マウス(オス)を7週齢で搬入後、8週齢から高脂肪食 F2WTD (Oriental Yeast Co.)にて8週間飼育して、脂肪肝となった肝臓をコラゲナーゼ灌流し、得られた脂肪肝細胞を48時間培養した。Oil-red-O 染色により脂肪滴生成を、Hematoxylin 染色により核を確認した。その後1 nM TNF- $\alpha$ を添加して培養肝細胞に炎症を誘導し、4時間後に回収して、リアルタイム RT-PCR にて炎症性サイトカイン interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )及び interleukin-6 (IL-6)の mRNA 発現量を測定した。

### 1-2 マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

1-1 で作製した *in vitro* NASH モデルを用いて下記の実験を行った。

コラゲナーゼ灌流後、得られた脂肪肝細胞を30時間培養した。その後20  $\mu$ M  $\gamma$ -T3DMG を添加して18時間培養し、TNF- $\alpha$ を添加してさらに4時間培養後に細胞を回収して、リアルタイム RT-PCR 法にて炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 及び IL-6 の mRNA 発現量を測定した。

### 1-3 マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する薬物送達性の評価

薬物は10, 20  $\mu$ M  $\gamma$ -T3DMG を用いて1-2と同様に実験した。各細胞群から抽出した細胞中薬物量( $\gamma$ -T3,  $\gamma$ -T3DMG)を、LC-MS/MS (Shimadzu) にて測定した。

## 2, HepG2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果及びその効果発現メカニズム

### 2-1 HepG2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルの作製及び $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を  $3.0 \times 10^4$  cells で24 well plate に48時間培養後、薬物( $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc),  $\gamma$ -T3,  $\gamma$ -T3DMG)添加パルミチン酸(0.5 mM)含有培地に交換した。薬物添加12, 24時間後、NAFLD/NASH の進展に関連するサイトカイン、fatty acid synthase (FASN), hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), interleukin-8 (IL-8)及び transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で評価した。

### 2-2 HepG2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する薬物送達性の評価

2-1と同様に実験し、薬物添加12, 24, 48時間後における細胞内 $\gamma$ -T3,  $\gamma$ -T3DMG 及び $\gamma$ -T3の代謝物である、2,7,8-trimethyl-5-( $\beta$ -carboxyethyl)-6-hydroxychroman ( $\gamma$ -CEHC)量を LC-MS/MS を用いて測定した。

## 3, LX-2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果及びその効果発現メカニズム

### 3-1 LX-2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルの作製及び $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

ヒト肝星細胞株 LX-2 細胞を  $7.5 \times 10^4$  cells で24 well plate に播種し、24時間培養後、0.5 mM 遊離脂肪酸(FFA,オレイン酸:パルミチン酸=2:1)と薬物(10  $\mu$ M  $\gamma$ -T3,  $\gamma$ -T3DMG)を含む培地に交換した。3, 6, 12, 24, 48時間後に細胞を回収し、肝線維化の進展に関連するサイトカイン TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)及び tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)の mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法で評価した。

### 3-2 LX-2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する薬物送達性の評価

3-1と同様に実験し、薬物添加3, 6, 12, 24, 48時間後における細胞内 $\gamma$ -T3 及び $\gamma$ -T3DMG 量を LC-MS/MS を用いて測定した。

## 4, In vivo NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の連続経口投与による効果及びその効果発現メカニズム

### 4-1 *In vivo* NASH モデルの作製

TSOD マウス及び TSNO マウス (対照マウス) を 8 週齢からそれぞれ高脂肪食 F2WTD または通常食 CE-2 (九動) にて 4 週間飼育した。その後、TSOD マウスに D-ガラクトサミン (GalN) (250 mg/kg) を腹腔内投与し、その 30 分後に炎症誘導剤 TNF- $\alpha$  (1  $\mu$ g/kg) を静脈内投与した。5 時間後、マウスを解剖し、血漿及び肝臓中 TG, TCHO 量の測定 (First hit の評価)、リアルタイム RT-PCR 法による IL-1 $\beta$ , IL-6 及び TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現量の測定 (Second hit の評価) を行った。

### 4-2 *In vivo* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

4-1 と同様に実験し、TSOD マウス 8 週齢から高脂肪食の摂取及び $\gamma$ -T3DMG (25 mg/kg) の強制経口投与を 4 週間行った。その後、肝臓中 IL-1 $\beta$ , IL-6 及び TGF- $\beta$ 1 の mRNA 量を測定した。

## 4. 研究成果

### 1-1 マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルの作製

高脂肪食を 8 週間摂取したマウスの肝臓は肥大し、白くなっていたことから脂肪肝が進行していると考えられた。Oil-red-O 染色により、肝細胞内に脂肪滴の生成が確認された。TNF- $\alpha$  添加により脂肪肝細胞内の IL-1 $\beta$  及び IL-6 の mRNA 発現量は有意に増加した。

以上より、肝細胞内の脂肪蓄積 (First hit) と炎症誘導 (Second hit) を確認できたことから、本培養細胞を *in vitro* NASH モデルとして以下の実験を行った。

### 1-2 マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

$\gamma$ -T3DMG+TNF- $\alpha$  添加群の IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量は、TNF- $\alpha$  単独添加群と比較して有意に減少した。また、 $\gamma$ -T3DMG+TNF- $\alpha$  添加群の IL-6 の mRNA 発現量は、TNF- $\alpha$  単独添加群と比較して減少傾向を示した。

以上の結果から、本 *in vitro* NASH モデルにおいて、 $\gamma$ -T3DMG は炎症誘導を抑制できることが明らかとなり、脂肪肝から NASH への進展を抑制できることが示唆された。

### 1-3 マウス初代培養肝細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する薬物送達性の評価

$\gamma$ -T3DMG (10, 20  $\mu$ M) 添加により、細胞内の $\gamma$ -T3 及び  $\gamma$ -T3DMG 量は濃度依存的に高くなった。 $\gamma$ -T3DMG 自身の量は、二つの添加群において継時的に減少し、20  $\mu$ M  $\gamma$ -T3DMG 添加群において $\gamma$ -T3 量は継時的に高くなった。

以上の結果より、 $\gamma$ -T3DMG は本 *in vitro* NASH モデルにおいて $\gamma$ -T3DMG として取り込まれ、 $\gamma$ -T3 へ変換されることが明らかとなった。

### 2-1 HepG2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルの作製及び $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

パルミチン酸含有培地の添加により、FASN, HMGCR, IL-8 及び TGF- $\beta$ 1 の mRNA 量は有意に増加した。薬物添加後 12, 24 時間において、 $\alpha$ -Toc,  $\gamma$ -T3 及び $\gamma$ -T3DMG は FASN 及び HMGCR mRNA 量を有意に減少させ、 $\gamma$ -T3DMG は IL-8 及び TGF- $\beta$ 1 mRNA 量も有意に減少させた。

### 2-2 HepG2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する薬物送達性の評価

薬物添加 48 時間後において $\gamma$ -T3 添加群と比較して $\gamma$ -T3DMG 添加群の細胞内の $\gamma$ -T3 量は 1.26 倍であり、有意に高くなった。さらに、薬物添加 12 及び 48 時間後において $\gamma$ -T3 添加群と比較して $\gamma$ -T3DMG 添加群の細胞内の、 $\gamma$ -T3 の代謝物である $\gamma$ -CEHC 量はそれぞれ 1.18, 1.28 倍であり、有意に高くなった。薬物添加後 48 時間までの $\gamma$ -T3 及び $\gamma$ -T3DMG 量を合わせた薬物濃度曲線下面積 (AUC<sub>0-</sub>

48h)は、 $\gamma$ -T3 添加群と比較して $\gamma$ -T3DMG 添加群において有意に高くなった。

以上の結果より、本 *in vitro* NASH モデルにおいても $\gamma$ -T3DMG は $\gamma$ -T3 よりも細胞内へ $\gamma$ -T3 を効率よく送達し、 $\alpha$ -Toc 及び $\gamma$ -T3 よりも優れた NASH 進展抑制効果を有することが明らかとなった。

### 3-1 LX-2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルの作製及び $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

FFA 含有培地の添加により、TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA 及び TIMP-1 の mRNA 量は有意に増加した。FFA 及び薬物添加後 12 時間において、 $\gamma$ -T3DMG は TGF- $\beta$ 1 mRNA 量を有意に減少させた。さらに、FFA 及び薬物添加後 24, 48 時間においては、 $\gamma$ -T3 及び $\gamma$ -T3DMG が $\alpha$ -SMA mRNA 量を有意に減少させた。

### 3-2 LX-2 細胞を用いた *in vitro* NASH モデルに対する薬物送達性の評価

FFA 及び薬物添加後 48 時間の $\gamma$ -T3 量は、 $\gamma$ -T3DMG 添加群において $\gamma$ -T3 添加群と比較して有意に高くなった。薬物添加後 48 時間までの $\gamma$ -T3 及び $\gamma$ -T3DMG 量を合わせた  $AUC_{0-48h}$  は、 $\gamma$ -T3 添加群と比較して $\gamma$ -T3DMG 添加群において有意に高くなった。

本 *in vitro* NASH モデルにおいても、 $\gamma$ -T3DMG は $\gamma$ -T3 と比較して細胞内 $\gamma$ -T3 量を効率的に増加させることによって TGF- $\beta$ 1 及び $\alpha$ -SMA の mRNA 量を減少させ、NASH における肝線維化への進展を抑制できる可能性が示された。

## 4-1 *In vivo* NASH モデルの作製

高脂肪食の摂取により TSOD マウスの血漿及び肝臓中の TG 及び TCHO 量は TSNO マウスと比較して有意に増加したことから First hit が確認された。さらに TNF- $\alpha$ 添加により肝臓中の IL-1 $\beta$ , IL-6 及び TGF- $\beta$ 1 の mRNA 発現量は有意に増加したことから Second hit が確認された。以上のことから本動物モデルを *in vivo* NASH モデルとして以下の実験を行った。

### 4-2 *In vivo* NASH モデルに対する $\gamma$ -T3DMG の効果の検討

$\gamma$ -T3DMG+TNF- $\alpha$ 添加群及び TNF- $\alpha$ 単独添加群において、いずれの mRNA 発現量もデータの偏差が大きく、 $\gamma$ -T3DMG の Second hit への有効性を判断できなかった。本研究における炎症誘導剤を用いた Second hit の誘発は、症状の進展が強すぎる可能性も考えられるため、実験条件をさらに検討し再評価する必要性が考えられた。

本研究室で開発した  $\gamma$ -T3DMG は $\gamma$ -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 3 つの *in vitro* NASH モデルを用いて、 $\gamma$ -T3DMG が $\gamma$ -T3 を細胞内へ効率的に送達し、肝線維化を含めた NASH 進展に対して優れた抑制効果を有することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡瀬大輔、寺崎真優、寺田一樹、瀬戸口修一、後藤将太郎、山川博文、松永和久、加留部善晴、高田二郎           |
| 2. 発表標題<br>In vitro NASHモデルにおける -トコトリエノールエステル型プロドラッグのNASHへの進展抑制効果の評価 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第139年会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|