

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11599

研究課題名（和文）非アルコール性脂肪性肝疾患における薬物代謝酵素発現変動と薬物相互作用予測への応用

研究課題名（英文）Changes in expression/activity of Cytochrome P450 in simple fatty liver and steatohepatitis

研究代表者

浦丸 直人 (Uramaru, Naoto)

日本薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90424069

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、単純性脂肪肝（NAFL）と脂肪肝に炎症を伴い、病態の進行を伴う脂肪性肝炎（NASH）に分類される。NAFLDにおけるシトクロムP450（CYP）の変化を明らかにすることは、薬物療法を最適化するために重要である。本研究では、NAFLD進展過程であるNAFL/NASHにおけるCYP分子種の発現/活性をNAFL/NASHモデルラットを用いて比較検討した結果、CYP1A2 mRNA/タンパク発現レベルが、NAFLモデルでは有意に増加し、NASHモデルでは有意に減少することを明らかにした。この変動要因の一つとして、炎症の有無が関与してい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

本研究では、非アルコール性脂肪肝（NAFL）および非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）におけるCYP分子種の発現変動を同時に解析するために炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝（NAFLモデル）と炎症/組織損傷を伴う脂肪性肝炎（NASHモデル）ラットを作製し、NAFLモデルおよびNASHモデルにおけるシトクロムP450分子種の発現/活性を検討した。本研究結果は、シトクロムP450の発現/活性の差異を明確にすることにより、非アルコール性脂肪性肝疾患の病期進展と各CYP分子種による薬物代謝能との関係性を明らかにする上で重要な基礎的データとなり得ると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Clarifying the cytochrome P450s (CYPs) changes in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is important for optimizing drug therapy. This study compared the expression of CYP enzymes in rat models of nonalcoholic fatty liver (NAFL) without inflammation and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with inflammation. Here, the mRNA and protein expression levels of several CYP enzymes in NAFL and NASH models were compared with those in rats fed a control diet. CYP1A2 expression and activity were upregulated in the NAFL model and downregulated in the NASH model, suggesting a reversal of CYP1A2 expression between NAFL and NASH. Differential expression of CYP1A2 in the NAFL and NASH models was observed in primary rat hepatocytes. These findings suggest that CYP1A2 expression/activity vary from the early stages of NAFL to NASH and that monitoring the pharmacokinetics of CYP1A2-metabolized drugs in humans with NAFL and NASH is necessary.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：シトクロムP450 非アルコール性脂肪性肝疾患 薬物代謝 生活習慣病 薬物相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では、衛生水準の向上や医療技術の進歩により、感染症による死亡が激減し、この数十年で疾病構造が大きく変化した。がん、心疾患、脳血管疾患で死因の6割近くを占めるようになり、これらの疾患は、日々の生活習慣に起因する生活習慣病と呼ばれている。食習慣、運動習慣、喫煙、飲酒などの生活習慣は、高血圧、糖尿病、肝硬変、腎臓病などの発症・進行に大きく関与しており、日々の生活習慣の積み重ねによって、発症する慢性疾患となっている。また飽食の近年、高カロリー、高脂肪摂取による食生活の変容により、若年層においても生活習慣病を誘発する病因は身近な問題となっている。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、ウイルス性、アルコール性、薬物性など起因する肝疾患ではなく、生活習慣の乱れ、内臓脂肪の蓄積、ストレス、運動不足等を起因として発症する肝疾患である。また、NAFLD が進行することにより、脂肪変性、炎症、肝細胞障害を特徴とする非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) を誘発し、さらに将来的に肝硬変や肝がんを発症することが知られている。近年、生活習慣に起因する NAFLD 患者は推定 2,000 万人ともいわれており、疾病構造変化の本質として、肝硬変や肝がんなどの重篤な肝障害は、今後ますます生活習慣に依存する疾病となりうる。NAFLD は、糖尿病、肥満、脂質異常症と強い関連があり、メタボリックシンドローム患者では、NAFLD 発症のリスクを上昇させることが知られている。生活習慣を要因とする NAFLD の治療法では、食習慣や運動、睡眠などの生活習慣を改善することが第一であるが、糖尿病治療薬、脂質異常症治療薬などの薬物療法が重要なカギを握っている。

医薬品をはじめとする多くの化学物質の体内動態、特に代謝過程においては薬物代謝酵素系が大きく関与している。肝臓は、薬物代謝を行う主要な臓器であり、多くの薬物代謝酵素が存在し、シトクロム P450 (CYP) は多くの化学物質の代謝に関与している。肝臓における急性または慢性肝障害では、肝機能に影響を及ぼし、CYP 分子種の発現/活性が大きく変動することが報告されている。肝障害時における CYP 分子種の発現/活性への影響については多くの報告があるものの、NASH の前段階である非アルコール性脂肪肝 (NAFL) における CYP 分子種の発現/活性への影響については知見に乏しく、さらに、NAFL および NASH 病態時の CYP 分子種の発現/活性を同時に比較検討した研究知見も乏しい。多くの NAFLD 患者では複数の慢性疾患を併発しており、種々の薬剤を併用していると考えられる。NAFLD 患者における薬物代謝酵素活性の変動は、個々の薬剤の薬効に影響を与え、さらに重篤な薬物相互作用を惹起し、薬物治療の大きな妨げになることが懸念される。それゆえ、NAFLD (NAFL および NASH) における薬物代謝能の変化を解明することは「薬物治療の最適化」および「医薬品の適正使用」を実行する上で必要であると考えられる。

2. 研究の目的

これまでに、NAFLD 動物モデルを用いた CYP 分子種の発現/活性の変動に関する研究報告がいくつかあるが、NAFLD 初期の炎症/組織損傷を伴わない NAFL に着目した CYP 分子種の発現変動に関する報告は少ない。さらに、NAFLD 初期の NAFL から病期進展型である NASH における CYP 分子種の発現および代謝活性を同時に、かつ詳細に比較検討した報告も乏しい。本研究では、NAFLD の初期段階である炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) モデルと

炎症/組織損傷を伴う脂肪肝 (NASH) モデルラットを同時に作製し、両モデル間における CYP 発現調節に関する差異を明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

6 週齢の雄性 Wistar 系ラットを普通食 (Control diet; CD)、高脂肪食 (High-fat diet; HFD)、メチオニン-コリン欠乏食 (Methionine-choline-deficient diet; MCDD) の 3 群に分けて 4 週間摂餌した。体重を 1 週間毎に測定し、飼育期間終了後、心臓より全血採血し、肝臓の灌流を行った後、肝臓を摘出し、肝湿重量を測定した。摘出した肝臓は既報に従い、肝ホモジネートおよび肝ミクロソームを調製し、血漿生化学検査値および肝臓脂質含量を測定した。また、摘出した肝臓の一部は、中性ホルマリン液中にて固定した後、脂肪滴蓄積の程度を Oil Red O および Hematoxylin-Eosin (HE) 染色により、肝組織の線維化の程度を Azan-Mallory 染色により評価した。各種 CYP 分子種の mRNA レベルを定量的 real-time PCR、タンパク質発現レベルを Western Blotting にて評価した。

4. 研究成果

Oil Red O 染色では、HFD 摂餌ラット (HFD 群) および MCDD 摂餌ラット (MCDD 群) の両群の肝臓において顕著な脂肪の蓄積が認められた。また、肝臓中の中性脂肪 (Triglyceride; TG) 量は、HFD 群および MCDD 群の両群において CD 摂餌ラット (CD 群) よりも有意に上昇した。HE 染色では、MCDD 群において大脂肪滴の特徴である顕著なバルーニングが観察されたのに対して、HFD 群においては明瞭なバルーニングはなく、MCDD 群よりも小さい脂肪滴に留まっていた。したがって、HFD 群は初期の単純性脂肪肝 (NAFL) を表現しているものと考えられた。肝組織の線維化を評価するために Azan-Mallory 染色にて解析したところ、MCDD 群においてのみ肝組織の顕著な線維化像が認められた。これを反映して、肝組織損傷マーカーである血漿 AST および ALT 濃度は MCDD 群でのみ有意に上昇した。これらのことから、MCDD 群では、炎症から生じる組織線維化が惹起されており、炎症/組織損傷および線維化などの病態生理学的特性からヒトにおける NASH を表現しているものと判断された。

以上より、比較的短期間である 4 週間のラットへの HFD 摂餌は炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) を形成させること、および MCDD の 4 週間摂餌は炎症/組織損傷を伴う脂肪肝炎 (NASH) を形成させることが示唆された。従って、HFD 群および MCDD 群を、それぞれ NAFL モデルおよび NASH モデルとして、以降の研究に供した。

NAFL および NASH モデルにおける各 CYP 分子種の発現変動の差異を明らかにすることを目的として、本研究にて作製した NAFL/NASH モデルラットにおける各種 CYP 分子種の mRNA 量を定量的 real-time PCR、タンパク質発現レベルを Western Blotting にて評価した。CYP1A2 以外の CYP 分子種 mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において CYP2C6、2D1、および 3A1 の mRNA 量が有意に減少した。興味深いことに、CYP1A2 mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した。一方、CYP1A1 および 4A1 mRNA 量は、NAFL モデルでは変化しなかったのに対して、NASH モデルにおいて顕著に増加した。さらに、CYP1A1、1A2、2C6、2D1、3A1 および 4A1 のタンパク質発現量を Western blotting にて比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した。

NAFL および NASH モデル間で相反する発現レベルを示した CYP1A2 の発現変動が薬物代謝能 (活性) の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、CYP1A2 依存性薬物代謝活性

は、ラット肝ミクロソームにおけるカフェイン 8-水酸化活性を指標として HPLC を用いて定量的に評価した。その結果、CYP1A2 の活性は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した。この NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 活性の反転現象は、mRNA/タンパク質発現レベルの挙動とよく一致していた。このことは、NAFLD の初期段階の NAFL における CYP1A2 依存性薬物代謝能が上昇することにより血中未変化体濃度が低下する可能性、および NASH における代謝能低下による血中未変化体濃度の増加が生じる可能性を示唆している。従って、今後、CYP1A2 によって代謝を受ける薬物による「薬物治療の最適化」を図るためには、NAFL および NASH 患者における薬物代謝および薬物動態の解析が必要であると考えられた。

本研究において、ラット肝ミクロソームにおける CYP1A2 の発現/活性が NAFL モデルにおいて上昇し、NASH モデルにおいては逆に正常ラット肝よりも低下することを明らかにした。この反転変動のメカニズムを解明するには、分子細胞生物学レベルでの解析が必要である。そこで、NAFL および NASH における CYP1A2 発現調節機序解析の一步として、ラット肝初代培養細胞を用いて脂肪肝 (NAFL) 様および脂肪肝炎 (NASH) 様細胞の作製を試みた。正常ラット肝臓から常法により採取した肝細胞をオレイン酸 (Oleic acid; OA) 単独負荷により NAFL 様細胞を作製した。また、飽和脂肪酸が小胞体ストレスや酸化ストレスを介して線維化を誘導することを利用して、OA およびパルミチン酸 (Palmitic acid; PA) 共存負荷 (OA+PA 負荷) (OA:PA 組成比 = 2:1) によって NASH 様細胞を作製した。細胞への脂肪蓄積量は、OA または OA+PA 負荷したラット初代培養肝細胞を Oil Red O 染色した後、Oil Red O を分光光度計にて定量することで評価した。また、細胞への炎症の有無は、炎症性サイトカインである *IL-1 β* mRNA 量を定量的 real-time PCR にて測定し、評価した。その結果、OA 負荷肝細胞および OA+PA 負荷肝細胞のいずれにおいても細胞への顕著な脂肪蓄積が認められた。*IL-1 β* mRNA 量は、対照細胞と比較して OA+PA 負荷肝細胞でのみ有意な増加を認めた。これらの結果から、OA 負荷肝細胞は炎症のない脂肪蓄積細胞、OA+PA 負荷肝細胞は脂肪の蓄積に加えて炎症が惹起された細胞であることが示唆された。

従って、ラット OA 負荷初代培養肝細胞は炎症/組織損傷のない NAFL 様細胞、および OA+PA 負荷初代培養肝細胞は脂肪蓄積と炎症が惹起された NASH 様細胞とみなし、各モデルにおける CYP1A2 のタンパク質量を Western blotting にて比較検討した。その結果、CYP1A2 発現量は、OA 負荷肝細胞 (NAFL 様細胞) において増加したが、OA+PA 負荷肝細胞 (NASH 様細胞) では減少した。従って、NAFL において正常肝よりも上昇した CYP1A2 の発現/活性が NASH において逆に正常肝よりも低下した要因の一つとして、炎症や線維化の有無が影響している可能性が示唆された。これらのことから、NAFL および NASH モデルにおいて認められる CYP1A2 発現反転変動が初代培養肝細胞実験においても再現されることが実証された。それゆえ、本研究で作製された NAFL 様細胞および NASH 様細胞は、CYP1A2 の発現機能機序解析や阻害剤探索研究、さらには NAFLD 病期進展による各種 CYP 発現調節および薬物代謝活性変動を解析するために有用であるものと考えられた。

本研究で得られた知見は、NAFLD 病期進展と各 CYP 分子種による薬物代謝能との関係性および薬物動態変動を考慮する上で重要な基礎データになり得るとともに、NAFLD 病期進展による CYP 分子種の発現変動を考慮して「薬物治療の最適化」を図る必要があることを提唱するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uramaru Naoto, Kawashima Azusa, Osabe Makoto, Higuchi Toshiyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Rhododendrol, a reductive metabolite of raspberry ketone, suppresses the differentiation of 3T3?L1 cells into adipocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2023.12938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Hiroyuki, Uramaru Naoto, Kawashima Azusa, Higuchi Toshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Carbonic anhydrase 3 increases during liver adipogenesis even in pre obesity, and its inhibitors reduce liver adipose accumulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 827 ~ 834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Azusa, Uramaru Naoto, Mikuma Toshiyasu, Osabe Makoto, Higuchi Toshiyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Differential expression of Cytochrome P450 1A2 in simple fatty liver and steatohepatitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 265 ~ 277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/fts.10.265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川嶋梓、浦丸直人、長部誠、樋口敏幸
2. 発表標題 NAFLからNASHへの進展過程におけるシトクロム P450分子種発現変動
3. 学会等名 フォーラム2022: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦丸直人、川嶋梓、長部誠、樋口敏幸
2. 発表標題 ロドデノールの3T3-L1前駆脂肪細胞における脂肪蓄積および脂肪細胞分化制御因子発現に対する抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦丸直人、川嶋梓、長部 誠、樋口 敏幸
2. 発表標題 ロドデノールは3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化を抑制する
3. 学会等名 フォーラム2023: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoto Uramaru, Azusa Kawashima, Makoto Osabe, and Toshiyuki Higuchi
2. 発表標題 Rhododendrol, a reductive metabolite of raspberry ketone, suppresses the differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes
3. 学会等名 International Conference for Public Health, Environmental Health, and Education for Sustainable Development Goals and Lifelong Learning (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川嶋梓、浦丸直人、三熊 敏靖、長部 誠、樋口 敏幸
2. 発表標題 単純性脂肪肝および脂肪肝炎におけるシトクロムP450 1A2 発現/活性の 反転変動
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	長部 誠 (Osabe Makoto) (40700985)	日本薬科大学・薬学部・講師 (32425)	
研究 分担者	樋口 敏幸 (Higuchi Toshiyuki) (50264289)	日本薬科大学・薬学部・教授 (32425)	
研究 分担者	村橋 毅 (Murahashi Tsuyoshi) (70340445)	日本薬科大学・薬学部・教授 (32425)	

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
---------	---------