

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860176

研究課題名(和文)キマーゼの非アルコール性脂肪肝炎における作用メカニズムの解析

研究課題名(英文)Mechanisms of Chymase on the Non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

田代 圭太郎 (Tashiro, Keitaro)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20645527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中高血圧ラット(SHRSP5/Dmcrラット)に高脂質高コレステロール(HFC)食を与え非アルコール性脂肪肝炎(NASH)動物モデルを作成した。NASHにおけるキマーゼ阻害薬の効果を見ると、肝体重比・脂肪沈着・線維化ともHFC食NASH群に比べキマーゼ阻害薬投薬群は有意に改善を認め、肝線維化に関連するTGF- β ・MMP-9・collagen I/IIIの改善を認めた。また脂肪酸合成にかかわるSREBP1cがキマーゼ阻害薬投薬群で有意に低下していた。以上より、NASHラットモデルにおいてキマーゼ阻害薬の投与により肝線維化の予防および脂肪沈着の予防・治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：The effect of the chymase inhibitor TY-51469 on the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) was evaluated in rats fed a high-fat and high-cholesterol (HFC) diet. To evaluate the preventive effect of TY-51469 on the development of NASH, stroke-prone spontaneously hypertensive rat 5 (SHRSP5)/Dmcr rats were fed either a normal or HFC diet for 8 weeks, and concurrently administered either placebo or TY-51469. Eight weeks after HFC diet, significant increases of steatosis, fibrosis and chymase-positive cells were observed in liver from the placebo-treated rats. Significant increases of myeloperoxidase, transforming growth factor- β , matrix metalloproteinase-9, and collagen I mRNA levels were also observed. However, all parameters were significantly attenuated in the TY-51469-treated group. Chymase inhibitor may be applicable to preventing the development and progression of NASH.

研究分野：消化器外科

キーワード：キマーゼ NASH 非アルコール性脂肪肝炎 SHRSP5/Dmcrラット HFC食

1. 研究開始当初の背景

Non-alcoholic state hepatitis (NASH) は飲酒歴が少ないにも関わらず肝細胞に著明な中性脂肪を主とする脂肪の蓄積が起こり、アルコール性肝障害に特徴とされる病理所見が認められることを特徴とする疾患である。従来、過剰飲酒を伴わない脂肪肝は可逆性変化として未治療でも良いとされていたが、NASHの一部が肝硬変に進行し、さらには肝癌まで進行することが明らかになった。これらの疾患は肥満や糖尿病、脂質異常症などを背景に持つことが多く、Metabolic Syndromeによる合併症の一つとして注目されている。

NASH の治療は現在、インスリン抵抗性改善薬や抗酸化療法、脂質異常症治療薬などが投与されているが、NASH に対する有効な治療法は未だ確立されていない。NASH の発症機序として肥満、脂質異常症、糖尿病などの生活習慣病を 1st hit として正常肝から単純性脂肪肝となり、高インスリン血症、サイトカイン、酸化ストレス、エンドトキシンなどが 2nd hit として働くことで単純性脂肪肝から NASH へと進行するといういわゆる 'two hit theory' が広く認知されている (Gastroenterology 1998;114:842-845)。

キマーゼは肥満細胞顆粒中に存在している酵素であり、刺激時に脱顆粒をして活性化され酵素機能を発揮する。キマーゼはアンジオテンシン II (Ang II) を産生する酵素として知られていたが、最近になり組織線維化と密接に関連する transforming growth factor (TGF) β 1 や matrix metalloproteinase (MMP)-9 の活性化酵素としても機能することが明らかになってきた (Exp Biol Med 2007;232:1213-1221, J Hypertens 2002;20:2047-2055)。我々は NASH 動物モデルにおいてキマーゼ阻害薬による肝脂肪滴の沈着の改善に加え、MMP-9 の活性化により線維化を有意に抑制することを示した (Hepato

Res. 2010;40:514-23)。しかし、その機序については未だ不明点が多く、分子生物学的見地から NASH のメカニズムおよびキマーゼ阻害薬の薬剤機序を解明することは今後の NASH 治療において大変重要である。

2. 研究の目的

ラットおよびハムスター NASH 動物モデルを作成し、キマーゼ阻害薬に対する効果を検証すると共に、そのメカニズムを解析することで NASH におけるキマーゼの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

NASH に対するキマーゼ阻害薬の予防効果を評価するため、10 週齢の雄性脳卒中易発性自然発症高血圧ラット (SHRSP5/Dmcr) に正常食または高脂肪高コレステロール (HFC) 食負荷と同時にプラセボ (n=8) またはキマーゼ阻害薬 (TY-51469, 1 mg/kg /日 : n=8) の皮下投与を浸透圧ポンプにて開始した。正常食を与えたラットを対照群 (n=6) とした。HFC 食負荷後、継時的に体重と血圧を測定し、8 週間後に血漿と肝臓を生化学的、組織学的な検討を行った。

生存率に対するキマーゼ阻害薬の影響を評価するため、HFC 食負荷と同時にプラセボ (n=8) またはキマーゼ阻害薬を投与する群 (前処置群 : n=8)、HFC 食 8 週間負荷後にキマーゼ阻害薬を投与する群 (後処置群 : n=8) の 3 群に分け、いずれかの群における死亡率が 100% になる時点をエンドポイントとした。

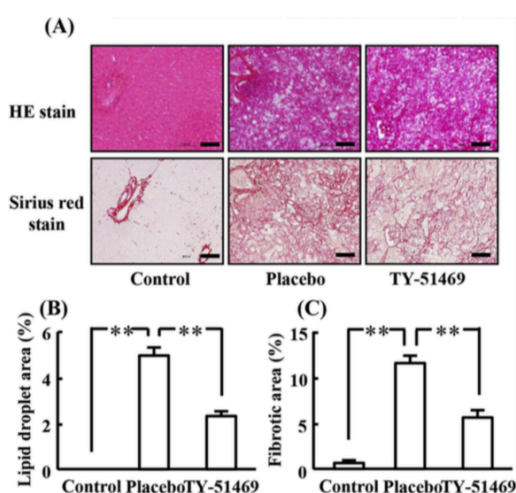
生化学的な指標として血漿中のアラニントランスアミナーゼ (ALT)・アスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)・トリグリセリド (TG) および総コレステロール (Tcho) の濃度を測定した。

組織学的検討として、カルノア固定された肝臓組織をパラフィンに包埋し、4 μ m の厚さに薄切した。肝臓の病理学的変化を解析す

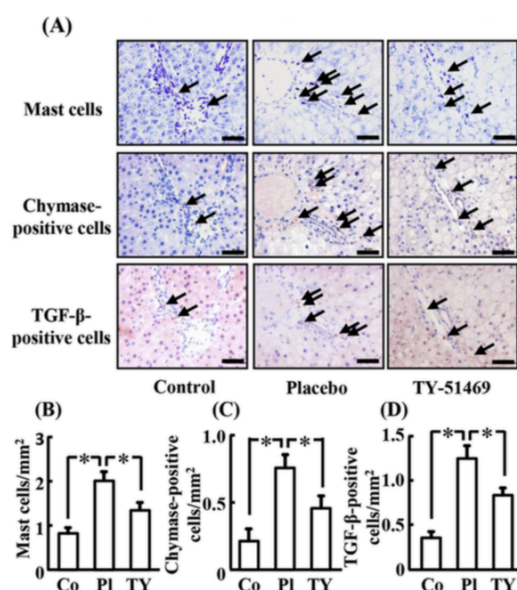
るため、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色標本で脂肪滴面積を測定し、シリウスレッド染色標本で線維化面積を測定して全肝臓面積から各面積の割合を定量化した。肥満細胞数をトルイジンブルー染色にて定量化した。キマーゼ陽性細胞および TGF- β 陽性細胞の分布を解析するために免疫組織化学的染色を行った。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用い肝臓中のミエロペルオキシダーゼ (MPO)、MMP-9、TGF- β 、コラーゲン I、18S rRNA の遺伝子発現レベルを測定し、18S rRNA で mRNA レベルを標準化した。

4. 研究成果

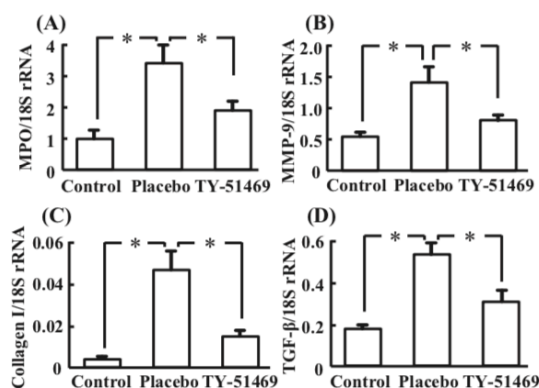
血漿中のASTおよびALTは、対照群と比較してプラセボ群で有意に高かったが、プラセボ群と投薬群との間には有意差を認めなかった。血漿Tchoはプラセボ群では対照群よりも有意に高かったが、キマーゼ阻害薬群ではプラセボ群より有意に低かった。3群間で体重に有意差は認めなかったが、肝臓重量は対照群よりもプラセボ群で有意に重く、肝臓重量/体重比もプラセボ群が高かった。しかし、肝重量および肝臓重量/体重比は、キマーゼ阻害薬によって有意に抑制された。脂肪滴面積の割合と線維化面積の割合はプラセボ群では対照群よりも有意に高かったが、キマーゼ阻害薬群ではプラセボ投与群よりも有意に低かった。



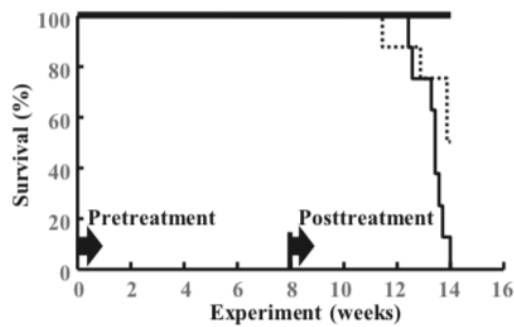
肥満細胞数、キマーゼ陽性および TGF- β 陽性細胞数は、プラセボ群で対照群よりも有意に高かったが、キマーゼ阻害薬群ではプラセボ投与群よりも有意に低かった。



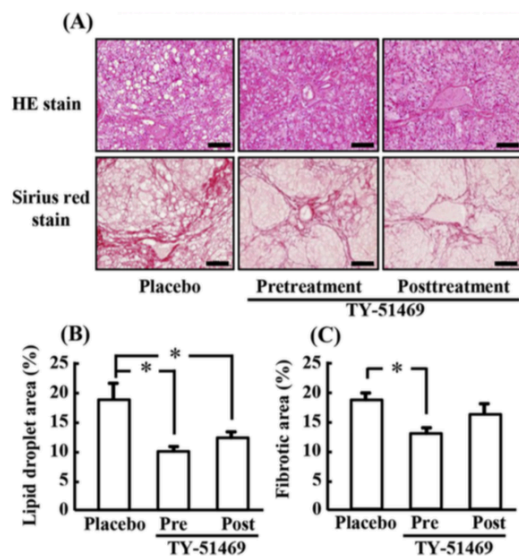
プラセボ群において MPO、MMP-9、TGF- β およびコラーゲン I の肝臓 mRNA レベルは有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群で有意に低下した。



HFC 食を負荷したプラセボ群は 14 週間で生存率が 0% になったが、キマーゼ阻害薬前処置群およびキマーゼ阻害薬後処置群の生存率は、それぞれ 100% ($p < 0.05$) および 50% ($p < 0.05$) であった。キマーゼ阻害薬により前処置群および後処置群ともに有意に生存率を改善した。



死亡直後のラットおよびHFC食の開始後14週間で生存したラットを用いて肝組織を評価した。脂肪滴面積の割合は、プラセボ群と比較して前処置群および後処置群で有意に減少した。線維化面積の割合の有意な減弱を前処置群で観察されたが、後処置群では有意な改善効果が得られなかった。



以上より、本研究において、キマーゼ阻害薬がNASHの発症および進行の防止に有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yuta Miyaoka, Denan Jin, Keitaro Tashiro, Shinsuke Masubuchi, Maiko Ozeki, Fumitoshi Hirokawa, Michihiro Hayashi, Shinji Takai, and Kazuhisa

Uchiyama, A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet, *Exp. Anim.* 査読有 67(2), 2018;239-247.

DOI:10.1538/expanim.17-0126

- ② Yuta Miyaoka, Denan Jin, Keitaro Tashiro, Koji Komeda, Shinsuke Masubuchi, Fumitoshi Hirokawa, Michihiro Hayashi, Shinji Takai, Kazuhisa Uchiyama, Chymase inhibitor prevents the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *J Pharmacol Sci.* 査読有 134(3):2017;139-146. DOI:10.1016/j.jpshs.2017.04.005

[学会発表] (計 3 件)

- ① Miyaoka Yuta, JIn Denan, Tashiro Keitaro, Komeda Koji, Masubuchi Shinsuke, Hirokawa Fumitoshi, Hayashi Michihiro, Takai Shinji, Uchiyama Kazuhisa, Chymase inhibitor prevents the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats, DDW2017, 2017
- ② 宮岡雄太、金徳男、田代圭太郎、米田浩二、廣川文鋭、林道廣 「非アルコール性脂肪肝炎に対するキマーゼ阻害薬の有用性」 第130回日本薬理学会近畿部会 2016
- ③ 宮岡雄太、田代圭太郎、米田浩二、廣川文鋭、金徳男、林道廣、高井真司、内山和久 「非アルコール性脂肪肝炎における

キマーゼ阻害薬の重要性」日本病態プロ
テアーゼ学会 2016

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.osaka-
med.ac.jp/~sur000/html/laboratory.html](https://www.osaka-med.ac.jp/~sur000/html/laboratory.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 圭太郎 (TASHIRO, Keitaro)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20645527