

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08251

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームによる臓器障害発症および進行におけるキマーゼの役割

研究課題名(英文)Role of chymase on development and progression of organ damage induced by metabolic syndrome

研究代表者

高井 真司 (TAKAI, Shinji)

大阪医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：80288703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの臓器障害におけるキマーゼの役割を解明するため、高血圧ラットに高脂肪・高コレステロール食を負荷して高血圧と高脂血症を伴った新規非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルを作製した。本NASHモデルの肝臓ではキマーゼが著明に増加し、キマーゼ阻害薬はNASHの発症および進行を予防し、生存率を有意に増加させた。ハムスターでも高脂肪・高コレステロール食を負荷して高血圧、高脂血症、糖尿病を伴う新規のNASHモデルを作製した。本モデルにおいても肝臓でキマーゼが増加した。メタボリックシンドロームによる合併症であるNASHの発症および進展にキマーゼが必要な役割を果たしていた。

研究成果の概要(英文)：A novel non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model was developed to clarify the role of chymase on metabolic syndrome-derived NASH in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. In the NASH model, hepatic chymase level was significantly increased, but chymase inhibitor attenuated the development and progression of NASH, resulted in a significant increase of survival rate. A novel hamster metabolic syndrome-derived NASH model was also developed in hamsters fed a high-fat and high-cholesterol diet. In this model, a significant increase of hepatic chymase was also observed. Chymase played an important role in the development and progression of metabolic syndrome-derived NASH.

研究分野：医歯薬学

キーワード：キマーゼ メタボリックシンドローム 合併症 阻害薬 高血圧 NASH 糖尿病 高脂血症

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームとは、肥満により高血圧、高脂血症、糖尿病を併発し、様々な臓器障害が惹起される疾患である。具体的な臓器障害としては、動脈硬化、心臓、腎臓などの機能障害、脂肪肝などの合併症を認める。一方、これらの障害が見られる臓器ではキマーゼが活性化することで知られるアンジオテンシン II、Matrix metalloproteinase (MMP)-9、Transforming growth factor (TGF)- β 1 が増加してくることが指摘されてきた。しかし、臓器障害におけるアンジオテンシン、MMP-9、TGF- β 1 の増加とキマーゼとの関連性は不明であった。

(2) メタボリックシンドロームの合併症の一つとして非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) がある。この NASH の病態を解析するモデルとして、メチオニン コリン欠乏 (MCD) 食を与えて作製する NASH モデルが従来使用されてきた。我々もハムスターの MCD 食を負荷する NASH モデルを用いて、肝機能障害、脂肪肝、肝臓線維化および炎症細胞の浸潤と肝臓内のキマーゼ発現とが関連性することを示し、キマーゼ阻害薬がこの NASH モデルに対して予防および治療効果を発揮することを示した。しかし、本 NASH モデルは極度の体重減少と血中脂質低下を伴う NASH であり、臨床で見られるメタボリックシンドロームを背景とした NASH の病態機序とは大きく異なっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メタボリックシンドロームの症状である高脂血症、高血圧、糖尿病によって惹起される NASH とキマーゼとの関連性を経時的に解析し、そして、キマーゼ阻害薬の効果を解析することで、メタボリックシンドロームにより誘発される NASH の発症および進展におけるキマーゼの病態生理学的役割を解明することであった。

3. 研究の方法

(1) 高血圧ラットを用いた NASH モデル

(雑誌論文 参照)

動物モデル

高血圧を自然発症するラット (SHR) として知られる SHR 亜種の SHRSP5/Dmcr (10 週齢、雄性) に高脂肪+高コレステロール (HFC) 食を負荷した。本試験は、大阪医科大学動物実験委員会にて実験計画が承認されたのち (No.27093、No.28012、No.29006) 実験計画および倫理基準に従って実験を実施した。

薬物投与時期

SHRSP5/Dmcr に HFC 食負荷と同時にキマーゼ阻害薬 (キマーゼ阻害薬群) または偽薬 (偽薬群) の投与を 8 週間行った。正常食で飼育した SHRSP5/Dmcr をコントロール群とした。

生存率に対する影響を解析するため、SHRSP5/Dmcr に HFC 食負荷と同時にキマーゼ阻害薬 (予防群) または偽薬 (偽薬群) の投与を行う群と HFC 食負荷を 8 週間行った (NASH 形成) のちにキマーゼ阻害薬の投与を行う群 (治療群) を作製した。

解析時期および解析方法

体重、血圧、血中の AST、ALT、脂質 (トリグリセリド、総コレステロール) を経時的に測定した。試験終了時 (HFC 食負荷後 8 週) に肝臓重量を測定した。

肝臓組織の解析

・組織学的解析

カルノア固定した組織ブロックより 4 μ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した切片で脂肪滴面積率を定量し、シリウスレッド染色した切片で線維化面積率を定量した。

キマーゼの産生細胞である肥満細胞数はトルイジンブルー染色を行って定量した。キマーゼおよびキマーゼにより産生される TGF- β 1 は、抗キマーゼ抗体および抗 TGF- β 1 抗体を用いて免疫染色を行ってキマーゼ陽性細胞数と TGF- β 1 陽性細胞数を定量した。

・生化学的解析

肝臓組織よりトリゾールを用いて RNA を抽出し、cDNA を作製したのち、TaqMan プローブ法にて Myeloperoxidase (MPO)、MMP-9、TGF- β 1、コラーゲン 1、18S ribosomal RNA (rRNA) のリアルタイム PCR を行った。各パラメータの mRNA レベルは 18S rRNA にて補正して定量した。

(2) ハムスターを用いた NASH モデル

(雑誌論文 参照)

動物モデル

8 週齢、雄性のハムスターに HFC 食を 12 週間負荷した HFC 群と正常食で飼育した群を事ロール群とした。本試験は、大阪医科大学動物実験委員会にて実験計画が承認されたのち (No.29098) 実験計画および倫理基準に従って実験を実施した。

解析時期および解析方法

体重、血圧、血中の脂質 (トリグリセリド、LDL-コレステロール)、血糖値を経時的に測定した。試験終了時 (HFC 食負荷後 12 週) に肝臓重量を測定した。

・組織学的解析

カルノア固定した組織ブロックより 4 μ m の切片を作製した。HE 染色した切片で脂肪滴面積率を定量し、シリウスレッド染色した切片で線維化面積率を定量した。

キマーゼの産生細胞である肥満砂防はトリジンブルー染色を行って細胞数を定量した。キマーゼを抗キマーゼ抗体にて免疫染色し、キマーゼ陽性細胞数を定量した。

・生化学的解析

肝臓組織よりトリゾールを用いて RNA を抽出し、cDNA を作製したのち、TaqMan プロブ法にて Tumor nuclear factor (TNF)-、MMP-9、TGF-、コラーゲン I、18S ribosomal RNA (rRNA) のリアルタイム PCR を行った。各パラメータの mRNA レベルは 18S rRNA にて補正して定量した。

キマーゼ酵素活性およびアンジオテンシン産生活性は、肝臓組織抽出液を用いてタンパク濃度で補正して定量した。

キマーゼおよび TGF- の蛋白量をウエスタンブロットを行ったのち、GAPDH の蛋白量で補正して定量した。

4. 研究成果

(1) 高血圧ラットを用いた NASH モデル

キマーゼ阻害薬群または偽薬 (偽薬群) の体重、肝重量、血圧および血中パラメータを以下に記す。

体重：3 群間に差を認めなかった。

肝重量：コントロール群に比して偽薬群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に減少した。

肝重量/体重比：コントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった。

血圧：3 群間に差を認めなかった。

AST：コントロール群に比して偽薬群とキマーゼ阻害薬群で有意に増加し、両群間に有意差を認めなかった。

ALT：コントロール群に比して偽薬群とキマーゼ阻害薬群で有意に増加し、両群間に有意差を認めなかった。

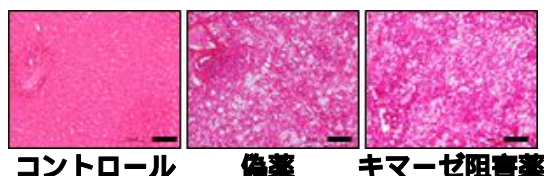
トリグリセリド：コントロール群に比して偽薬群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に減少した。

総コレステロール：コントロール群に比して偽薬群で有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に減少した。

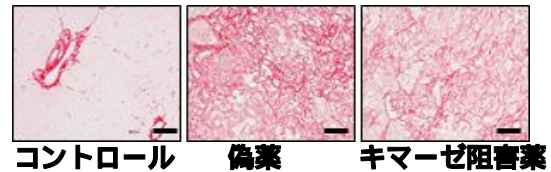
肝臓組織の解析

・組織学的解析

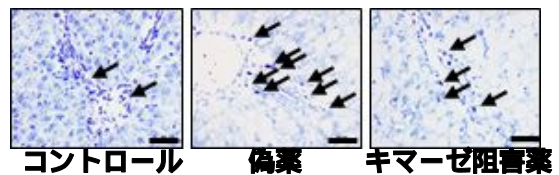
HE 染色：脂肪滴面積/全面積比はコントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった (下図)。



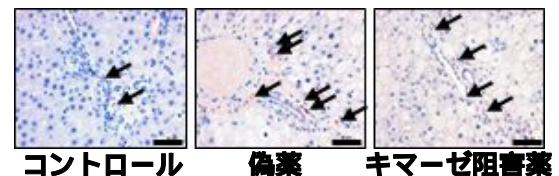
シリウスレッド染色：線維化面積/全面積比はコントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった (下図)。



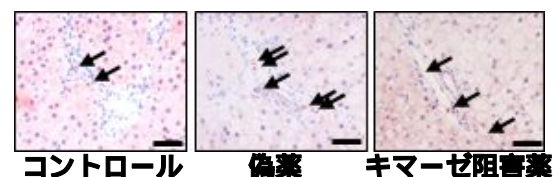
トリジンブルー染色：肥満細胞数/全面積比はコントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった (下図)。



キマーゼ陽性細胞：キマーゼ陽性細胞数/全面積比はコントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった (下図)。



TGF- 陽性細胞：TGF- 陽性細胞数/全面積比はコントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった (下図)。



・生化学的解析

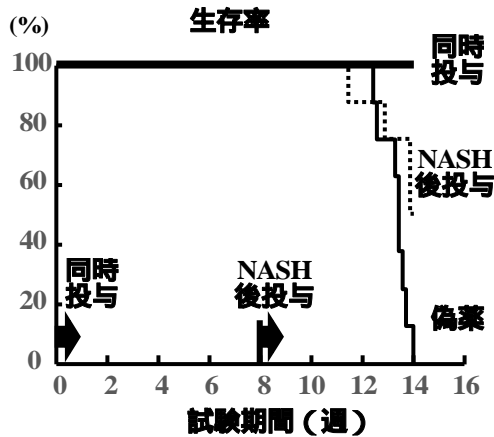
MPO、MMP-9、TGF-、コラーゲン I のすべての mRNA 発現量がコントロール群に比して偽薬群で有意に高値であったが、キマーゼ阻害薬群は偽薬群に比して有意に低値であった

生存率に対する影響

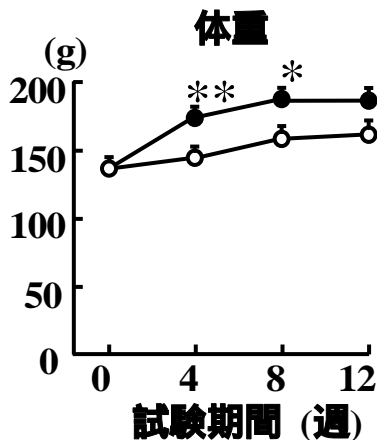
キマーゼ阻害薬を HFC 食負荷と同時に投与開始した群 (阻害薬の投与を開始した群 (治療群：破線) は、試験開始後 14 週の時点で 50% の生存率であった (下図)。

予防群および治療群の両群ともに偽薬群

に比して有意に生存率を上昇させた(下図)。予防群:太線)は、偽薬群(実線)の生存率が0%になった試験開始14週後において100%であった(次頁)。また、NASHが形成される試験開始8週後からのキマーゼ

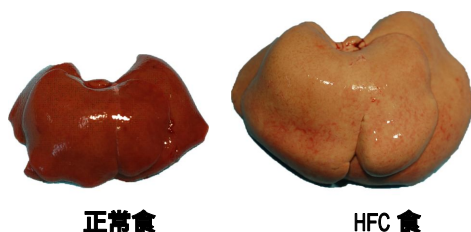


(2) ハムスターを用いた NASH モデル
体重は、HFC 食負荷した 4 週後より HFC 負荷群でコントロール群に比して有意な増加が見られた。



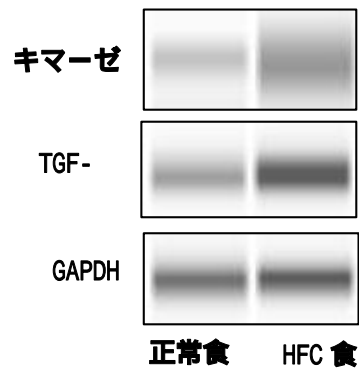
血圧: HFC 群でコントロール群より高値であったが、有意差はなかった。
トリグリセリド: HFC 群でコントロール群に比して有意に高値であった。
LDL-コレステロール: HFC 群でコントロール群に比して有意に高値であった。
血糖値: HFC 群でコントロール群に比して有意に高値であった。

肝臓組織の解析
試験終了時の肝臓のマクロの写真を下図に示す。コントロール群に比して HFC 群は明らかに全体的に白色を帯び、増大していた。



・組織学的解析
HE 染色: 脂肪滴面積/全面積比はコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった。
シリウスレッド染色: 線維化面積/全面積比はコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった。
トリジンブルー染色: 肥満細胞数/全面積比はコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった。
キマーゼ陽性細胞: キマーゼ陽性細胞数/全面積比はコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった。

・生化学的解析
TNF- α 、MMP-9、TGF- β 、コラーゲン I のすべての mRNA 発現量がコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった。
キマーゼ活性およびアンジオテンシン 産生活性は共にコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった。
キマーゼおよび TGF- β の蛋白量は共にコントロール群に比して HFC 群で有意に高値であった(下図)。



5. 主な発表論文等

- [雑誌論文](計12件)
 Miyaoka Y, Jin D, Tashiro K, Masubuchi S, Ozeki M, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. A novel hamster nonalcoholic steatohepatitis model induced by a high-fat and high-cholesterol diet. *Exp Anim*. 査読有. 67 (2018) 239-247. DOI: 10.1538/expanim.17-0126.
 Takai S, Jin D. Chymase inhibitor as a novel therapeutic agent for non-alcoholic steatohepatitis. *Front Pharmacol*. 査読有. 9 (2018) 144. DOI: 10.3389/fphar.2018.00144.
 Miyaoka Y, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Masubuchi S, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. 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 (2017) 139-146.

DOI: 10.1016/j.jphs.2017.04.005.

Takai S, Jin D. Improvement of cardiovascular remodelling by chymase inhibitor. Clin Exp Pharmacol Physiol. 査読有.43 (2016) 387-393.

DOI: 10.1111/1440-1681.12549.

〔学会発表〕(計 14 件)

Miyaoka Y, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Masubuchi S, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. Chymase inhibitor prevents the development and progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. Digestive Disease Week 2017 (2017)

宮岡雄太、金徳男、田代圭太郎、米田浩二、廣川文鋭、林道廣、高井真司、内山和久. アルコール性脂肪性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)

宮岡雄太、金徳男、廣川文鋭、林道廣、米田浩二、高井真司、内山和久. 非アルコール性脂肪性肝炎におけるキマーゼ阻害薬の重要性. 第 21 回日本病態プロテアーゼ学会 (2016)

〔その他〕

ホームページ

<https://www.osaka-med.ac.jp/class/grd.html>

<https://www.osaka-med.ac.jp/deps/grd/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 真司 (TAKAI Shinji)
大阪医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 80288703

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

金 徳男 (KIN Tokunan)
大阪医科大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 90319533