

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20897

研究課題名（和文）真菌由来天然物を用いた非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の新たな治療戦略の構築

研究課題名（英文）Evaluation of the effects of a natural products derived from fungi in the non-alcoholic steatohepatitis (NASH) mouce model

研究代表者

山口 智亮（Yamaguchi, Tomoaki）

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：20966197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の死亡率は肝線維化と相関していると言われており、現在NASH患者において線維化抑制薬の開発が望まれている。真菌由来化合物#27は可溶性エポキシヒドラーゼのホスファターゼ活性の阻害を介し、肝臓における線維化を抑制することが期待される。そこで、NASHモデルマウスを作製し、肝臓組織のSirius red染色にて、化合物#27の抗線維化効果を検討した。Control群と比較して、NASH群における肝臓の線維化領域は有意な増加を示し、化合物#27投与することにより有意な抑制を認めた。既存の治療薬とは違う治療メカニズムの新規NASH治療薬として将来性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、NASH患者は増加をたどり、NASHを原因とする肝細胞癌の増加も社会問題となりつつある。現状、NASHから肝線維化および肝細胞癌の抑制効果を示した治療薬はなく、日本においてNASHに対する保険適応をもった治療薬はない。真菌由来化合物 #27 は NASH モデルマウスにおいて線維化を抑制することにより、新規 NASH 治療薬となる可能性を秘めている。新規 NASH 治療薬の候補化合物を見出せたことは、臨床的に非常に意義深いことである。

研究成果の概要（英文）：Mortality in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is purportedly associated with hepatic fibrosis, driving the quest for pharmacological interventions targeting fibrosis inhibition in NASH patients. In recent years, there has been anticipation surrounding the potential of nitric oxide synthase activation to attenuate hepatic fibrosis. Fungal compound #27 is hypothesized to activate nitric oxide synthase by impeding the phosphatase activity of soluble epoxyhydrolase. Our investigation unveiled that fungal compound #27 attenuated fibrosis in NASH model mice. This compound holds promise as an innovative NASH therapeutic agent with a distinct therapeutic mechanism compared to existing agents.

研究分野：薬理学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 線維化 可溶性エポキシヒドラーゼ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の有病率は世界的に 3~5 % と推定されており、今後も増加すると考えられている (Chris Estes et al., J Hepatol, 2018)。NASH を発症すると、肝硬変を経て末期肝疾患 または肝細胞癌を引き起こす可能性が高まるが、現在のところ肝硬変や肝細胞癌への進展抑制効果を示した治療薬はなく、NASH の進行を抑制する新規薬剤の開発が強く求められている。NASH の主要な危険因子としては糖尿病および脂質異常症が挙げられる。脂肪肝の主因は耐糖能の低下にともなう脂肪新生の増加であるが、肝臓内で増加する炎症性サイトカインや酸化ストレスがこれを助長し、線維化に代表される器質的変化を惹起することで病態が難治化する。現状で対症療法としては脂質異常症やインスリン抵抗性の改善が挙げられるが、基本的に肝硬変に移行した場合病変を逆行させることができない。興味深いことに、NASH を発症した肝臓においては一酸化窒素 (NO) の肝保護作用が消失しており、結果として NASH の発症進展に寄与する可能性が示されている (Rory P Cunningham et al., Front Physiol, 2020)。同疾患における NO 低下の原因は諸説あるが、増加した活性酸素が NO の生物学的利用能を直接的に低下させる可能性、ならびに活性酸素の増加により NO 合成酵素のアンカップリングが起こり、同酵素が活性酸素の増幅にシフトする可能性が挙げられる (Lundberg JO et al., Cell Metab, 2018)。また、肝臓では血管内皮以外に肝細胞にも eNOS が発現しており、その活性低下が NASH に寄与するとの報告もある (Cunningham RP et al., Diabetes, 2021)。

これまで我々は真菌 *Stachybotrys microspora* の培養上清に検出される化合物群の持つ血栓溶解作用について、分子薬理学的アプローチで検討を続けてきた。検討の途上で、上記化合物が強い抗酸化作用を有することが判明した (Keita Shibata et al., Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2010)。可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) のホスファターゼ活性阻害はコレステロールの合成を抑制し、eNOS 活性を増加させる活性を併せ持っている。すなわち、上記真菌由来天然物は NO の生物学的利用能と eNOS アンカップリングを改善しつつ、合併症として頻発する脂質異常症にも介入できる、NASH 治療において理想的な薬物である可能性が高い。

2. 研究の目的

上記背景から、NASH モデルマウスを用い、化合物 #27 の抗炎症効果および抗線維化効果を検討し、作用メカニズムを解明し、将来的な医薬品としての可能性を示すことを目的としている。

3. 研究の方法

生後 2 日目の C57BL/6J マウスに STZ (200 µg) を皮下注射し、生後 4 週間後に雄性マウスのみを残し、High Fat Diet を自由に摂取させることにより、NASH を誘発させた。Control 群には、生後 2 日目に生理食塩液 (0.1 mL) を皮下注射し、通常食を自由に摂取させた。生後 8 週齢から 24 週齢において、化合物 #27 (30 mg/kg) および生理食塩液 (10 mL/kg) を隔日腹腔内投与した。各群 24 週齢において、体重 (BW) 測定、採血、肝臓摘出を行った。採取した血清を用いて、肝酵素 (AST、ALT、ALP)、脂質 (TG、TC) を測定した。摘出した肝臓を用いて、肝重量 (LW) を測定した。その後、肝臓組織はホルマリン固定し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色および Sirius red/Fast green 染色を行った。HE 染色にて、肝細胞の脂質化、炎症細胞の浸潤、風船様変性および肝細胞癌を評価し、NAFLD activity score (NAS) を算出した。Sirius red/Fast green 染色にて肝組織の線維化領域を測定した。また、NASH モデルマウスに対して、同疾患の第一選択薬であるロスバスタチン (30 mg/kg) を投与した群を別途設け、化合物 #27 と同様の解析を行うことで、両者の作用の違いを明確化した。

4. 研究成果

体重および血糖に対する化合物 #27 の効果の検討

化合物 #27 の効果を評価するために、NASH モデルマウスの BW および LW の変化を評価した。化合物 #27 は NASH モデルマウスの BW に影響を与えなかった。一方、化合物 #27 は NASH モデルマウスの LW に影響を与えた。NASH 群における BW (24.9 ± 1.0 g) は Control 群における BW (28.0 ± 0.5 g) よりも有意に低かった。化合物 #27 を投与したマウスの BW は 24.4 ± 0.6 g であり、有意な改善は認められなかった。ロスバスタチンを投与したマウスの BW は 25.1 ± 0.8 g であり、有意な改善は認められなかった。NASH 群の LW (158.7 ± 16.6 mg/g) は Control 群 (41.5 ± 0.9 mg/g) より有意に高かった。一方、化合物 #27 は LW を減少させた。LW の値は化合物 #27 群で 125.4 ± 4.4 mg/g であった。ロスバスタチンを投与したマウスの LW は 139.7 ± 8.7 mg/g であり、有意な改善は認められなかった。

肝機能に対する化合物 #27 の効果の検討

肝機能に対する化合物 #27 の効果を評価するために、NASH モデルマウスの AST、ALT および ALP の変化を評価した。AST および ALT の上昇は、化合物 #27 で治療した NASH モデルマウスで改善が見られなかった。ALP の上昇は、化合物 #27 で治療した NASH モデルマウスで改善が見られた。NASH 群の AST、ALT、ALP (252.1 ± 44.8 U/L, 191.1 ± 38.5 U/L, 1078.0

± 209.6 U/L) は、Control 群 (44.4 ± 6.1 U/L、34.0 ± 3.4 U/L、267.4 ± 11.8 U/L) に比べて有意に高かった。化合物 #27 は AST、ALT (200.4 ± 27.7 U/L、135.0 ± 28.6 U/L) を改善せず、ALP (716.4 ± 103.0 U/L) のみを減少させた。ロスバスタチンにおいても AST、ALT (184.3 ± 15.4 U/L、117.5 ± 17.5 U/L) を改善せず、ALP (513.0.4 ± 54.9 U/L) のみを減少させた。

血清脂質に対する化合物 #27 の効果の検討

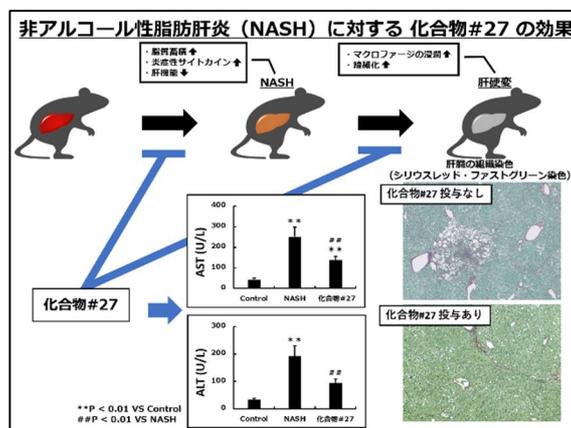
脂質代謝に対する化合物 #27 の効果を評価するために、NASH モデルマウスの TG および TC の変化を評価した。NASH 群の TG、TC (445.5 ± 142.2 mg/dL、236.1 ± 15.1 mg/dL) は、Control 群 (93.6 ± 19.9 mg/dL、69.4 ± 2.2 mg/dL) に比べて有意に高かった。化合物 #27 は TG (357.7 ± 85.0 mg/dL) を改善せず、TC (189.0 ± 20.8 mg/dL) のみを減少させた。ロスバスタチンにおいても TG (314.7 ± 136.8 mg/dL) を改善せず、TC (164.3 ± 17.8 mg/dL) のみを減少させた。

化合物 #27 による肝組織の形態学的変化

HE 染色を用いて、化合物 #27 投与による NASH モデルマウスの脂肪症、葉内炎症、風船様変性、NAS、肝細胞癌の変化を評価した。NASH 群における脂肪症、葉内炎症、NAS、肝細胞癌のスコア (1.4 ± 0.2、0.6 ± 0.3、2.1 ± 0.5、1.9 ± 0.8) は、Control 群 (0.0 ± 0.0、0.0 ± 0.0、0.0 ± 0.0、0.0 ± 0.0) に比べて有意に高かった。NASH 群の風船様変性 (0.1 ± 0.1) は、Control 群 (0.0 ± 0.0) に比べ有意な増加はみられなかった。化合物 #27 を投与した NASH 群における肝細胞癌のスコア (0.0 ± 0.0) は、NASH 群に比べ有意に低かった。化合物 #27 治療 NASH 群における脂肪症、葉内炎症、風船様変性、NAS のスコア (1.5 ± 0.2、0.3 ± 0.2、0.0 ± 0.0、1.8 ± 0.3) は、NASH 群と比較して有意な改善は認められなかった。ロスバスタチン治療 NASH 群の脂肪症および NAS のスコア (2.7 ± 0.2 および 4.0 ± 0.3) は、NASH 群と比較して有意に高かった。ロスバスタチン治療 NASH 群における小葉内炎症、風船様変性、肝細胞癌のスコア (0.9 ± 0.3、0.4 ± 0.2、1.6 ± 0.8) は、NASH 群と比較して有意な改善はみられなかった。

肝線維化に対する化合物 #27 の効果の検討

肝臓組織の線維化に対する化合物 #27 の効果を評価するために、NASH モデルマウスから摘出した肝臓のコラーゲン線維を Sirius red/Fast green 染色した。NASH 群の線維化領域 (1.0 ± 0.2 %) は Control 群 (0.5 ± 0.1 %) と比較して有意に増加した。化合物 #27 治療群 (0.5 ± 0.1 %) およびロスバスタチン治療群 (0.6 ± 0.1 %) の線維化領域は NASH 群と比較して有意に減少させた。



上記結果により、化合物 #27 が新規 NASH 治療薬として候補化合物となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Tomoaki, Shibata Keita, Hasumi Keiji, Nobe Koji	4. 巻 47
2. 論文標題 Potent Efficacy of 3-Amino-4-hydroxy Benzoic Acid, a Small Molecule Having Anti-fibrotic Activity, in a Mouse Model of Non-alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 434 ~ 442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b23-00771	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 智亮, 柴田 佳太, 蓮見 恵司, 野部 浩司
2. 発表標題 3-Amino-4-hydroxy benzoic acid は NASH モデルにおいて肝機能および線維化を改善する
3. 学会等名 第149回 日本薬理学会 関東部会
4. 発表年 2023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
研究協力者	柴田 佳太 (Shibata Keita)		
研究協力者	蓮見 恵司 (Hasumi Keiji)		
研究協力者	野部 浩司 (Nobe Koji)		

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