

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591999

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎におけるキマーゼの役割

研究課題名(英文)The role of chymase in the disease process of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

研究代表者

林 道廣 (Hayashi, Michihiro)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90314179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：メチオニン・コリン欠損(MCD)食誘発性のハムスターNASHモデルを作製、キマーゼ阻害薬の効果を検討。12週MCD食で、血漿ASTとALT上昇、肝内脂肪滴や線維化、酸化ストレス・線維化マーカー、トリグリセリド関連因子の上昇を認めNASHを確認。更に12週MCD食を続け、偽薬・キマーゼ阻害薬を投与、後者の効果を検討。24週モデルの偽薬群は12週のMCD群と比し、ASTやALTは増加、脂肪滴や線維化の面積が増加し、より進行したNASHとなった。阻害薬群は、脂肪滴や線維化、AST等を有意に減少させ、阻害薬投与前の12週のMCD群と比しても正常まで改善し、NASHの治療薬として臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chymase plays a role in the augmentation of angiotensin II formation, which is involved in liver fibrosis. The effects of a chymase inhibitor (TY), were investigated in MCDD-induced Hamsters (H) NASH model. Treatment with TY or placebo was initiated, and continued with MCDD for other 12 weeks. At 12 weeks after, hepatic steatosis and fibrosis were observed in MCDD-fed H. MDA and gene expression of collagen I, III, alpha-SMA and Rac-1 in liver were increased. At 24 weeks, steatosis and fibrosis were more in the placebo-treated H fed MCDD for 24 weeks vs. 12 weeks. H treated with TY for 12 weeks after being on a 12-week MCDD had ameliorations in steatosis and fibrosis, with no differences compared to normal diet-fed H. There were augmentations in AT II and MDA, and expression of collagen-I, III, alpha-SMA and Rac-1 in the placebo-treated H at 24 weeks; these were reduced to normal in TY-treated H. TY not only prevented the progression of hepatic steatosis and fibrosis, also ameliorated them.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：キマーゼ 非アルコール性脂肪性肝炎

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) は、飲酒歴が無いにも関わらずアルコール性肝障害に類似した病理所見を認める疾患である。従来、過剰飲酒を伴わない脂肪肝は可逆性変化として軽視されてきたが、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り、認識が一変した。NASH は肥満や糖尿病、高脂血症などの生活習慣をベースとした単純性脂肪肝に肝細胞の変性や線維化、炎症などが加わる病態であり、そのメカニズムとして炎症や酸化ストレスなどの関与が指摘されているが、有効な治療法は未だ確立されていない。これまでにアンジオテンシン と肝臓の線維化や脂肪化の関連性を示唆する報告があり、アンジオテンシン 受容体拮抗薬が NASH を改善させるという報告も散見される。一方、肥満細胞と NASH の関連も報告されており、今回、我々はアンジオテンシン や肥満細胞に関連するキマーゼと NASH との関連性に着目した。キマーゼは肥満細胞顆粒中に存在する酵素で、アンジオテンシン を産生する酵素として知られている。一方、これまでにヒト肝硬変症例において線維化に伴い肝組織中のキマーゼ活性の増加が確認され、肝線維化とキマーゼ含有肥満細胞との関連性が報告されている。また、動物モデルにおいてキマーゼ阻害薬が NASH への予防効果を認めたという報告がある。

2. 研究の目的

キマーゼと非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の脂肪肝および肝線維化との関連性を明らかにし、キマーゼ阻害薬の NASH の進行予防効果または治療効果を検討する。

3. 研究の方法

8 週齢の雄性 F1B ハムスター 27 匹を 5 群にわけて、12 週間と 24 週間のモデルを作製した。12 週間のモデルはコントロール群として標準固形飼料を、NASH モデル作製群として MCD 食を与え、12 週間の時点で NASH モデルの完成を確認した。24 週間のモデルは、コントロール群、MCD 食+偽薬(蒸留水)群、MCD 食+キマーゼ阻害薬群の 3 群に分けた。偽薬およびキマーゼ阻害薬の投与は NASH モデルが形成された 12 週目の時点から投与を開始し、治療効果を検討した。

解析項目として以下を測定した。血漿中の AST と ALT を測定した。肝組織をホモジネートし、その上清液を用いて、マロンジアルデヒド (MDA) レベル、キマーゼ活性とアンジオテンシン レベルを測定した。組織学的検討としてカルノア固定した後パラフィン包埋した肝組織から厚さ 5 μ m の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて脂肪滴の面積を測定し、シリウスレッド染色にて線維化面積を測定した。肝臓内の肥

満細胞数を測定するためにトリイジンプルー染色を、キマーゼ陽性細胞数とアンジオテンシン 陽性細胞数を測定するために免疫組織学的染色を施行した。Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて肝組織内の α 型コラーゲン、 β 型コラーゲン、 α -smooth muscle actin (SMA)、Rac-1、sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1C、fatty acid synthase (FAS)、18S ribosomal RNA (18S-rRNA) の遺伝子発現レベルを測定し、18S-rRNA にて各遺伝子発現量を補正した。

4. 研究成果

H.E. 染色およびシリウスレッド染色による組織学的解析では、12 週間のモデルで MCD 食群がコントロール群と比較して脂肪滴と線維化の面積が有意に上昇しており、12 週間の MCD 食負荷で NASH の形成を確認した。また、24 週間 MCD 食を負荷した偽薬群は 12 週間の MCD 食群と比較して、脂肪滴と線維化の面積が増加しており、12 週間の時点よりより進行した病態となっていた。24 週間のモデルでは、偽薬群がコントロール群と比較して有意に上昇し、キマーゼ阻害薬群は偽薬群と比較して有意に減少していた。血漿中の AST と ALT は、12 週間のモデルでは、MCD 食群がコントロール群と比較して有意に増加した。また、24 週間 MCD 食を与えた偽薬群は 12 週間の MCD 食群と比較して AST と ALT は更に増加した。24 週間のモデルでは、偽薬群がコントロール群と比較して有意に上昇し、キマーゼ阻害薬群は偽薬群と比較して有意に減少し、コントロール群と同程度まで改善された。肥満細胞、キマーゼ陽性細胞とアンジオテンシン 陽性細胞は、肝切片において、ほぼ一致した部位に認められた。肝組織中のキマーゼ活性、アンジオテンシン レベル、肥満細胞数は、12 週間のモデルで MCD 食群がコントロール群と比較して増加した。24 週間のモデルでは、偽薬群がコントロール群と比較して有意に上昇し、キマーゼ阻害薬群では偽薬群と比較して有意に減少した。肥満細胞数は有意差を認めなかったが同様の傾向であった。酸化ストレスのマーカーである MDA レベルも同様に 12 週間のモデルでは MCD 食群がコントロール群と比較して増加し、24 週間のモデルでも偽薬群がコントロール群と比較して有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群では偽薬群と比較して有意に減少した。RT-PCR を用いた遺伝子発現レベルの測定結果では、線維化マーカーである α 型コラーゲン・ β 型コラーゲン・ α -SMA、酸化ストレスのマーカーである Rac1、トリグリセリド合成関連因子の SREBP-1C、FAS の全てが、12 週間のモデルで MCD 食群がコントロール群と比較して増加し、24 週間のモデルでは、偽薬群がコントロール群と比較して有意に増加したが、キマーゼ阻害薬群では偽薬群と比較して有意に減少した。

今回の実験では 12 週間 MCD 食をハムスターに与えることによって、血漿中の AST と ALT の上昇、肝組織での脂肪滴や線維化を確認し、肝組織内の各種活性や遺伝子解析においても酸化ストレスマーカー、トリグリセリド合成関連因子、線維化マーカーの上昇を認め、12 週間の時点で NASH モデルが作製できていることを確認した。その時点から更に 12 週間 MCD 食を与え続けながら、偽薬（生理食塩水）またはキマーゼ阻害薬を投与することによって、キマーゼ阻害薬の治療効果を検討した。24 週間のモデルの偽薬群は 12 週間モデルの MCD 食群と比較して、血漿中の AST や ALT は更に増加し、組織学的にも脂肪滴や線維化の面積が増加しており、より進行した NASH の病態になっていた。キマーゼ阻害薬群は、偽薬群よりも肝臓における脂肪滴や線維化の面積、血漿中の AST や ALT を有意に減少させたが、キマーゼ阻害薬投与前の 12 週間の MCD 食群と比較しても肝臓の脂肪化や線維化をほぼ正常化し、AST や ALT も正常レベルまで改善し、強力な治療効果を認めた。

キマーゼはキモトリプシン様セリンプロテアーゼで、正常組織中では肥満細胞内に存在し、組織障害時のみ肥満細胞から脱顆粒して酵素機能を発揮する。キマーゼは組織内のアンジオテンシン の生成に重要な役割を果たしている。アンジオテンシン は組織において炎症や線維化に関与しており、一般的にはアンジオテンシン の生成にはアンジオテンシン変換酵素（ACE）がよく知られている。キマーゼ阻害薬は様々な組織においてアンジオテンシン の生成を抑制するが、ACE 阻害薬とは異なり、降圧作用を有さないことが報告されてきた。本研究でもデータを示さなかったが、血漿中の ACE 活性とアンジオテンシン レベルは、キマーゼ阻害薬による影響がなく、血圧にも影響がなかった。アンジオテンシン は肝星細胞に作用して線維化を促すが、本実験でもキマーゼ阻害薬は肝組織でのアンジオテンシン レベルを減少させ、星細胞の活性に関わる α -SMA の抑制を介して肝の線維化が改善したと推測される。また、キマーゼ阻害薬は ACE 阻害や ARB と異なり、全身性のアンジオテンシン II 抑制を介した降圧作用を有さずに組織アンジオテンシン II を抑制するという特徴を持つことより、NASH の治療において安全性が高いと考える。

一方、NASH において脂肪酸酸化に関連する活性酸素は重要な役割を果たしている。アンジオテンシン も肝星細胞において NADPH オキシダーゼを介して superoxide や hydrogen peroxide などの活性酸素の産生を促す。今回の実験ではキマーゼ阻害薬が肝組織においてアンジオテンシン レベルを抑制することによって、NADPH オキシダーゼの構成因子である Rac1 の遺伝子発現レベルや酸化ストレスのマーカーである MDA レベルを減少させ、脂肪化を改善させたと推測される。SREBP-1c

や FAS の様な脂質合成関連遺伝子を介して、トリグリセリド合成に重要な役割を果たしている。アンジオテンシン の増加は活性酸素を増加させ、SREBP-1c や FAS の遺伝子発現を促すことが確認されている。アンジオテンシン 受容体抗薬 (ARB) が活性酸素を抑制し、SREBP-1c や FAS を減少させ、マウス NASH モデルで脂肪肝を改善したという報告がある。本実験でもキマーゼ阻害薬群で SREBP-1c や FAS の遺伝子発現レベルが低下しており、肝におけるアンジオテンシン を減少させ、活性酸素を抑制し、脂肪化の抑制につながったと考えられる。

以上より、キマーゼ阻害薬は MCD 誘発性ハムスター-NASH モデルに対し、線維化や脂肪化を抑制し、NASH の治療薬として有用であった。キマーゼ阻害薬による臨床応用が期待される。

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 1 件)

Chymase inhibitor ameliorates hepatic steatosis and fibrosis on established non-alcoholic steatohepatitis in hamsters fed a methionine- and choline-deficient diet.

Masubuchi S, Takai S, Jin D, Tashiro K, Komeda K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K.

Hepatol Res. 2012 Dec 10. doi: 10.1111

〔学会発表〕(計 2 件)

1)

A chymase inhibitor, TY-51469, ameliorates already formed hepatic steatosis and fibrosis in a hamster nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model.

Shinsuke Masubuchi, Shinji Takai, Denan Jin, Keitaro Tashiro, Koji Komeda, Michihiro Hayashi, Kazuhisa Uchiyama

63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases.

2012.11.12 Boston (U.S.A.)

2)

ハムスター-NASH モデルに対するキマーゼ阻害薬の治療効果の検討.

鱒淵真介、高井真司、金徳男、米田浩二、林道麿、内山和久

第 17 回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会

2012.08.10 浜松市

〔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
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

林 道廣 （Michihiro Hayashi）
大阪医科大学 医学部 准教授
研究者番号：90314179

(2)研究分担者

高井真司 （Shinji Takai）
大阪医科大学 医学部 准教授
研究者番号：80288703