

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	桑井 志麻
-------	----	----	-------

学位論文題目

Roles of the prostaglandin I₂-IP system in the development of nonalcoholic steatohepatitis

(プロスタグランジン I₂ の非アルコール性脂肪性肝炎の発症・進展における役割)

共著者名

結城幸一、小島史章、柏木 仁、奥村利勝、成宮 周、牛首文隆

未公表

研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、明らかな飲酒歴がなく、主に肥満や糖尿病等のインスリン抵抗性を基盤として生じる脂肪性肝疾患の総称である。NAFLD は、良性の単純性脂肪肝と、脂肪性肝炎を経て最終的に肝硬変・肝がんへ進展しうる非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に分類される。近年、生活習慣の欧米化による肥満人口の増加に伴い NAFLD の罹患数は増加し、現在、日本の NASH 患者は少なくとも 100 万人と推定されている。しかしながら、NASH の治療法は未だ確立しておらず、病態解明と治療法の確立が急務である(引用文献 1.)。

プロスタグランジン (PG) I₂ は、アラキドン酸に由来する生理活性脂質であり、生体の様々な場所で合成され、炎症、アレルギー、血圧調節、血栓形成などの局面において多彩な作用を示す(引用文献 2.)。肝臓において PGI₂ は、Kupffer 細胞や血管内皮細胞等で産生され、その受容体である IP も肝組織中の様々な細胞で発現が報告されている。PGI₂ の肝臓での作用は、肝細胞増殖、酸化ストレスからの肝細胞保護、肝線維化の抑制等が知られている。さらに、NASH 患者の肝臓や NASH モデルのマウス肝臓で、PG 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現上昇が報告されている。これらの報告は、NASH の病態形成に PG が関与することを示唆するが、PGI₂ がどのように NASH の病態に関与するかの検討は為されていない。そこで本研究は、NASH の病態形成における PGI₂-IP 系の役割解明を目的とした。

材料・方法

1. 動物

動物は、8-10 週齢の雄性の野生型 (WT) 及び IP 欠損 (IP-KO) マウスを用い、普通食又は、NASH 病態モデルとして確立しているメチオニン-コリン欠乏 (MCD) 食を、2、5、10 週間与えた。また、MCD 食負荷を行っている WT と IP-KO マウスに IP 作動薬であるペラプロスト (BPS) 1.0 mg/kg/day を連日経口投与した。

2. 生化学的解析

マウスの心採血により得た血清より、血清脂質、トランスアミナーゼ (AST、ALT)、フェリチン値の測定を行った。マウスの肝臓中の鉄の定量は、原子吸光分析法を用いた。肝臓の脂質評価のためには、肝臓中の中性脂肪の定量を行った。

3. 組織学的解析

肝障害の程度は、NAFLD activity score (脂肪化、炎症性細胞浸潤、バルーニング変性) により評価した。肝臓中の鉄と脂質の蓄積の評価には、それぞれベルリンブルー染色とオイルレッド O 染色を行った。また、炎症性細胞浸潤の評価のためにはマクロファージのマーカーである F4/80 抗体、酸化ストレスの評価のためにはヒドロキシノネナールに対する抗体をそれぞれ用いて、免疫組織染色を行った。

4. RT-PCR

摘出した肝臓から total RNA を抽出し、逆転写により cDNA を合成した。COX-1、COX-2、IP、PGI 合成酵素 (PGIS) の mRNA 発現を real-time PCR 法にて解析した。

成 績

1. WT マウスに MCD 食負荷を行うと、負荷 10 週後には、肝組織が明らかな脂肪性肝炎の所見を呈した。また、肝臓における COX-2 及び PGIS の mRNA 発現は、MCD 食負荷 2 週後より上昇し、5 週及び 10 週後において有意に上昇した。一方、IP の mRNA 発現は、MCD 食負荷 2 週後より有意な上昇を示した。
2. IP-KO マウスは、5 週間の MCD 食負荷により肝細胞内の中性脂肪の蓄積、マクロファージの浸潤が WT マウスに比べ有意に亢進して、高率に NASH を発症した。さらに、IP-KO マウスでは、WT マウスと比較して血清トランスアミナーゼが有意に高値を示した。

3. IP-KO マウスは、10 週間の MCD 食負荷により WT マウスに比べ主に肝細胞中の鉄の蓄積が亢進し、同時に酸化ストレスが増悪した。
4. WT マウスへの BPS 投与は、MCD 食負荷により引き起こされる肝障害を有意に抑制した。しかし、この効果は IP-KO マウスへでは消失した。

考 案

本研究により、 PGI_2 -IP シグナルの刺激が NASH の病態形成を抑制することが示され、 PGI_2 -IP 系は、NASH の発症・進展に深く関与していることが明らかとなった。IP-KO マウスにおける NASH の早期発症には、肝実質への炎症性細胞浸潤が関与し、その後の病態進展においては、鉄の蓄積とそれによる酸化ストレスの亢進が関与していると考えられた。実際に、MCD 食を含めた複数の食餌性 NASH モデルにおいて、Kupffer 細胞及び血中より浸潤してきたマクロファージなどの炎症性細胞が病態の悪化に関与している報告がある(引用文献 3.)。また、NASH を含めた慢性肝疾患における肝臓への鉄の蓄積は肝障害を悪化させ、瀉血により肝機能が回復することが報告されている。これらのことから、 PGI_2 -IP シグナルは、炎症性細胞の動員と鉄代謝の制御を介して NASH の病態形成に対して保護的に作用していることが示唆された。

結 論

本研究により、 PGI_2 -IP 系が、NASH の病態の進行に深く関与することが明らかとなった。また、MCD 食負荷 NASH モデルに対する IP 選択的アゴニストの保護作用が明らかとなり、IP 選択的アゴニストの NASH 治療薬としての可能性が示唆された。

引 用 文 献

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
2. Yuhki K, Kojima F, Kashiwagi H, Kawabe J, Fujino T, Narumiya S, Ushikubi F. Roles of prostanoids in

the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther* 2011;129:195–205.

3. Tosello-Tramont AC, Landes SG, Nguyen V, Novobrantseva TI, Hahn, YS. Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor- α production. *J Biol Chem* 2012;287:40161–72.

参 考 論 文

1. Tsuchiya Y, Nozu T, Kumei S, Ohhira M, Okumura T. IL-1 receptor antagonist blocks the lipopolysaccharide-induced inhibition of gastric motility in freely moving conscious rats. *Dig Dis Sci* 2012;57:2555–61.
2. Nozu T, Kumei S, Takakusaki K, Ataka K, Fujimiya M, Okumura T. Central orexin-A increases colonic motility in conscious rats. *Neurosci Lett* 2011;498:143–6.
3. Yoshizaki T, Motomura W, Tanno S, Kumei S, Yoshizaki Y, Tanno S, Okumura T. Thiazolidinediones enhance vascular endothelial growth factor expression and induce cell growth inhibition in non-small-cell lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:22.
4. Kumei S, Motomura W, Yoshizaki T, Takakusaki K, Okumura T. Troglitazone increases expression of E-cadherin and claudin 4 in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:614–9.
5. Ohhira M, Motomura W, Fukuda M, Yoshizaki T, Takahashi N, Tanno S, Wakamiya N, Kohgo Y, Kumei S, Okumura T. Lipopolysaccharide induces adipose differentiation-related protein expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J Gastroenterol* 2007;42:969–78.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	糸井 志麻
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> 審査委員長 西川 祐司 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> 審査委員 古川 博之 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> 審査委員 奥村 利勝 </div>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Roles of the prostaglandin I₂-IP system in the development of nonalcoholic steatohepatitis (プロスタグランジン I₂ の非アルコール性脂肪肝炎の発症・進展における役割)</p>			
<p>非アルコール性脂肪性肝疾患，特に肝硬変や肝癌に移行しうる非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は，きわめて重要な健康問題となっており，その病態の解明と治療法の開発が望まれている．NASH の病態発生には炎症が深く関わっており，プロスタグランジンが重要な役割を持つことが推定される．申請者らは，NASH の病態にプロスタグランジン I₂（PGI₂）が関与するとの仮説をもとに，PGI₂ の受容体である IP を欠損するマウス（IP-KO）を用い，研究を行った．</p> <p>NASH と類似した脂肪肝炎を作製できるメチオニン-コリン欠乏（MCD）食を野生型マウス（WT）に 2，5，10 週間与える基礎実験を行ったところ，プロスタグランジン産生に関わる COX-2 や PGIS の mRNA 発現が MCD 投与後経時的に増加し，IP mRNA 発現も早期から著明に増加することが判明し，脂肪肝炎の成立における PGI₂ の重要性が示唆された．次に，MCD 食による脂肪肝炎の発症と進行に IP のノックアウトがどのような影響を与えるかを検討したところ，IP-KO では発症期(5 w)における脂肪蓄積，炎症の程度，肝細胞の傷害のいずれもが WT に比べ高度となることが明らかになった．</p>			

また、NASHの進行期(10 w)ではIP-KOにおいて、より強い鉄沈着と酸化ストレスが起こっていた。これらの結果は、PGI₂-IPシグナル刺激はNASHの発症と進展を抑制する作用を持つことを示唆している。これを検証するため、申請者らはIPの選択的アゴニスト(BPS)をWTに投与し、実際にMCDによるNASHの病態が改善されることを明らかにした。

本研究は膨大で緻密な実験データに基づき、これまでほとんど調べられていなかったPGI₂-IPシグナルとNASH病態の関わりについて、明解な結論を導き出しており、高く評価される。また、本研究の結果はIPアゴニストがNASHの治療に応用できる可能性を示しており、臨床医学への貢献度も高い。申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者の長期間にわたる努力が結実したものであり、肝臓病学分野において学術的にも十分に貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。