

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 非アルコール性脂肪性肝疾患の病期進展によるシトクロム
P450 分子種発現変動に関する研究

指導教員 樋口 敏幸



学位申請者 川嶋 梓



1. 緒言

経口投与された医薬品は、小腸で吸収され、門脈を經由し、肝臓において代謝（初回通過効果）を受ける。そのため、医薬品の薬効は肝臓を主とする薬物代謝能（初回通過効果能）に大きく左右される。肝臓における主な薬物代謝酵素としてシトクロム P450 (CYP) がある。CYP は複数の分子種から成るスーパーファミリーとして存在しており、様々な医薬品、外来異物および内因性物質の代謝を担っている。肝臓における薬物代謝活性は、年齢、性別、各種疾患などにより変動するが、これらの主要因として CYP 分子種発現レベルの多様な変動が挙げられる。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は組織学的に肝細胞に脂肪の蓄積が認められる状態であり、病態がほとんど進行しない単純性脂肪肝である非アルコール性脂肪肝 (Nonalcoholic fatty liver; NAFL) と、脂肪変性、炎症および肝障害を合併して肝硬変や肝がんに行進する可能性のある非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis; NASH) に大別される。NAFLD は肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型であり、その発症・進展には肥満、耐糖能異常、脂質異常症や高血圧症が関連している。それゆえ、NAFLD 患者は複数の医薬品を服用する 경우가多く、薬物相互作用の観点から、NAFL/NASH における薬物代謝能の変化を考慮する必要がある。しかしながら、肝硬変などの重度の肝疾患時の薬物代謝・体内動態の変動については多くの情報が提供されている一方で、NAFLD、特に肝疾患症状が顕在化する前（未病段階）の NAFLD 初期段階である NAFL における薬物代謝活性の変動に関する知見は少なく、CYP 分子種の発現/活性の変動について NAFL および NASH を同時に比較検討した研究知見も乏しい。それ

ゆえ、NAFLD (NAFL および NASH) における薬物代謝能の変化を解明することは「薬物治療の最適化」および「医薬品の適正使用」を実行する上で必要であると考えられる。

これまでに、NAFLD 動物モデルを用いた CYP 分子種の発現/活性の変動に関する研究報告がいくつかあるが、NAFLD 初期の炎症/組織損傷を伴わない NAFL に着目した薬物代謝酵素 CYP 分子種の発現変動に関する報告は少ない。さらに、NAFL と NASH を同時に比較した報告は、ヒト NAFLD 患者を対象とした Fisher らによる報告のみであり、NAFLD 初期の NAFL から病期進展型である NASH における CYP 分子種の発現および代謝活性を同時に、かつ詳細に比較検討した報告も少ない。

そこで本研究は、肝疾患症状が顕在化する前（未病段階）の炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) モデルと炎症/組織損傷を伴う脂肪肝 (NASH) モデルを同時に作製し、両モデル間における CYP 発現調節に関する差異を明確にすることを目的とした。NAFL モデルおよび NASH モデルは、ラットに高脂肪食およびメチオニン・コリン欠乏食をそれぞれ摂餌させることにより作製し、各 CYP 分子種の発現/活性の変化を比較検討した。本研究では、CYP1A1、1A2 および 4A1 が特徴的な挙動を示すことを見出した。さらに、ラット NAFL/NASH モデル (*in vivo* 実験系) における CYP1A2 の発現挙動がラット肝初代培養細胞の脂肪酸負荷によって作製された NAFL 様および NASH 様細胞 (*in vitro* 実験系) においても再現されることを実証した。

2. ラットにおける NAFL および NASH モデルの確立

NAFLD は、病期によって病理組織学的あるいは病態生理学的に異なる特徴を示すことから、表現型や病態の異なる様々な動物モデルが開発されている。本章では、NAFL および NASH における CYP 分子種の発現変動を同時に解析することを目的とし、炎症/組織損傷のない単純性脂肪肝モデル (NAFL モデル) と炎症/組織損傷のある脂肪肝モデル (NASH モデル) の同時作製を試みた。

6 週齢の雄性 Wistar 系ラットを普通食 (Control diet; CD)、高脂肪食 (High-fat diet; HFD)、メチオニン-コリン欠乏食 (Methionine-choline-deficient diet; MCDD) の 3 群に分けて 4 週間摂餌し

た。体重を1週間毎に測定し、飼育終了後、肝湿重量、血漿生化学検査値および肝臓脂質含量を測定した。また、脂肪滴蓄積の程度を Oil Red O および Hematoxylin-Eosin (HE) 染色により、肝組織の線維化の程度を Azan-Mallory 染色により評価した。Oil Red O 染色では、HFD 摂餌ラット (HFD 群) および MCDD 摂餌ラット (MCDD 群) の両群の肝臓において顕著な脂肪の蓄積が認められた。また、肝臓中の中性脂肪 (Triglyceride; TG) 量は、HFD 群および MCDD 群の両群において CD 摂餌ラット (CD 群) よりも有意に上昇した (Fig. 1)。HE 染色では、MCDD 群において大脂肪滴の特徴である顕著なブルーニングが観察されたのに対して、HFD 群においては明瞭なブルーニングはなく、MCDD 群よりも小さい脂肪滴に留まっていた。したがって、HFD 群は初期の単純性脂肪肝 (NAFL) を表現しているものと考えられた。肝組織の線維化を評価するために Azan-Mallory 染色にて解析したところ、MCDD 群においてのみ肝組織の顕著な線維化像が認められた。これを反映して、肝組織損傷マーカーである血漿 AST および ALT 濃度は MCDD 群でのみ有意に上昇した。これらのことから、MCDD 群では、炎症から生じる組織線維化が惹起されており、炎症/組織損傷および線維化などの病態生理学的特性からヒトにおける NASH を表現しているものと判断された。

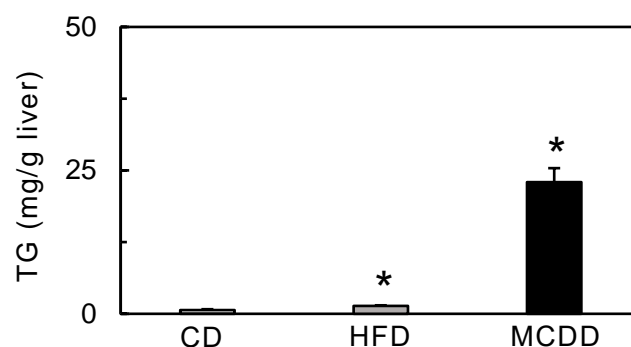


Fig. 1 Hepatic Lipid Contents in the liver of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the lipids in the livers were extracted, and the TG contents were measured using enzymatic methods. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

以上より、比較的短期間である4週間のラットへのHFD摂餌は炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) を形成させること、およびMCDDの4週間摂餌は炎症/組織損傷を伴う脂肪肝炎 (NASH) を形成させることが示唆さ

れた。従って、HFD 群および MCDD 群を、それぞれ NAFL モデルおよび NASH モデルとして、以降の研究に供した。

3. NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現変動の解析

NAFL および NASH モデルにおける各 CYP 分子種の発現変動の差異を明らかにすることを目的として、NAFL/NASH モデルにおける CYP 分子種 (*CYP1A1*, *1A2*, *2B1*, *2C6*, *2C11*, *2D1*, *2D2*, *2E1*, *3A1*, *4A1*) の mRNA 量を定量的 real-time PCR にて評価した。その結果、*CYP1A2* 以外の CYP 分子種 mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において *CYP2C6*, *2C11*, *2D1*, *2D2*, *2E1* および *3A1* の mRNA 量が有意に減少した (Fig. 2)。興味深いことに、*CYP1A2* mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した (Fig. 2)。一方、*CYP1A1* および *4A1* mRNA 量は、NAFL モデルでは変化しなかったのに対して、NASH モデルにおいて顕著に増加した (Fig. 2)。

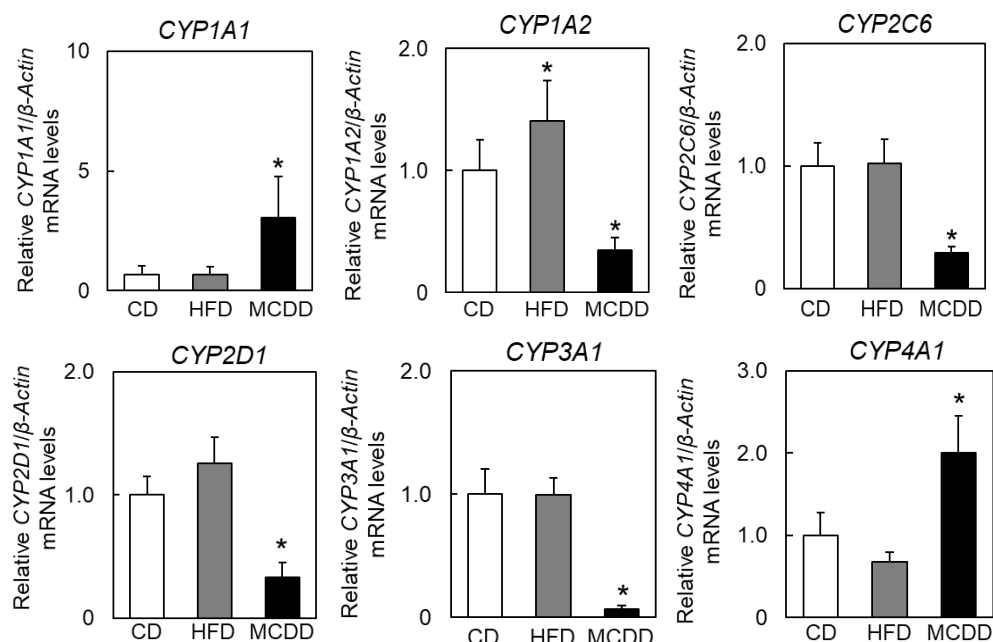


Fig. 2 Changes in mRNA levels of CYP isoforms in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of several CYP isoforms were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

さらに、CYP1A1、1A2、2C6、2D1、3A1 および 4A1 のタンパク質発現量を Western blotting にて比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した (Fig. 3)。

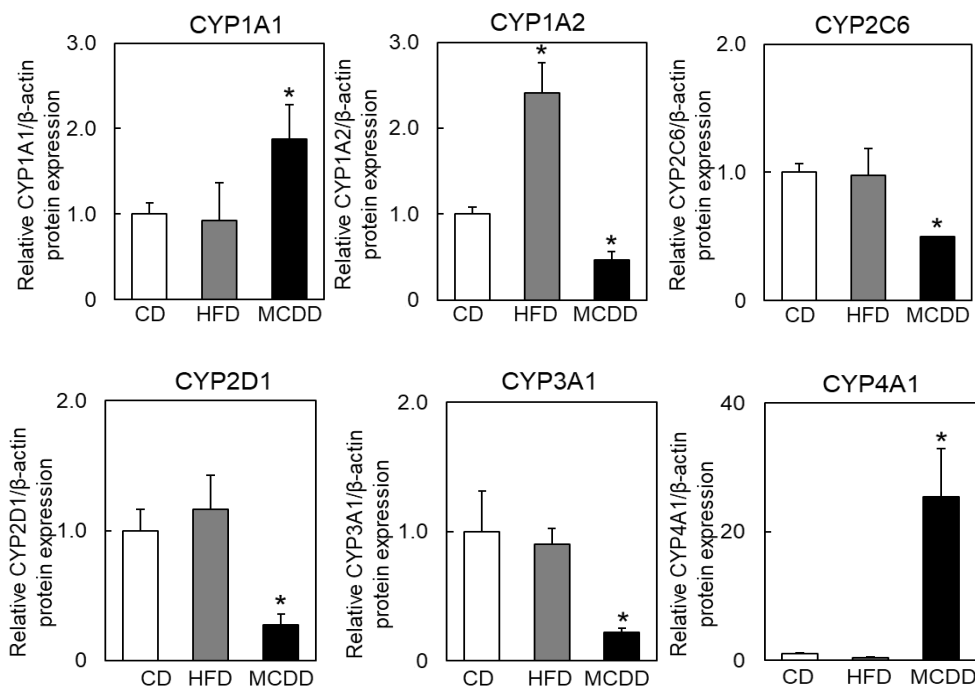


Fig. 3 Changes in expression levels of CYP isoforms in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the rats were sacrificed, and liver microsomes were prepared from CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers. The protein levels of CYP isoforms in rat liver microsomes were measured using western blot analysis. (A) Typical image obtained via blotting. (B) Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control

従来から、ヒトにおける炎症/組織損傷を伴う肝疾患では、CYP 分子種の発現低下によって薬物代謝能が低下すると考えられている。しかし、興味深いことに、本研究において CYP1A2 の発現は炎症/組織損傷および線維化を伴う NASH 期において正常肝よりも低下する一方で、NAFLD 病期初期にあたる NAFL 期で誘導されることを初めて明らかにした (Fig. 2, 3)。さらに、CYP1A1 および 4A1 の発現は、既報と同様に、NAFL では変化しないが NASH において上昇することが示唆された (Fig. 2, 3)。これらの知見は、NAFLD 病期進展と各 CYP 分子種による薬物代謝能との関係性および薬物動態変動を考慮する上で重要な基礎データになり得るものと考えられた。

4. CYP1A2 依存性薬物代謝活性の NAFL および NASH 間における反転変動

NAFL および NASH モデル間で相反する発現レベルを示した CYP1A2 は、気管支拡張薬テオフィリンや抗精神薬クロザピンなどの薬物血中濃度モニタリング (TDM) の対象となる薬物の代謝に関与する。そこで、CYP1A2 の発現変動が薬物代謝能 (活性) の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、CYP1A2 依存性薬物代謝活性は、ラット肝ミクロソームにおけるカフェイン 8-水酸化活性を指標として HPLC を用いて定量的に評価した。その結果、CYP1A2 の活性は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した (Fig.4)。この NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 活性の反転現象は、mRNA/タンパク質発現レベルの挙動とよく一致していた。このことは、NAFLD の初期段階の NAFL における CYP1A2 依存性薬物代謝能が上昇することにより血中未変化体濃度が低下する可能性、および NASH における代謝能低下による血中未変化体濃度の増加が生じる可能性を示唆している。従って、今後、CYP1A2 によって代謝を受ける薬物による「薬物治療の最適化」を図るためには、NAFL および NASH 患者における薬物代謝および薬物動態の解析が必要であると考えられた。

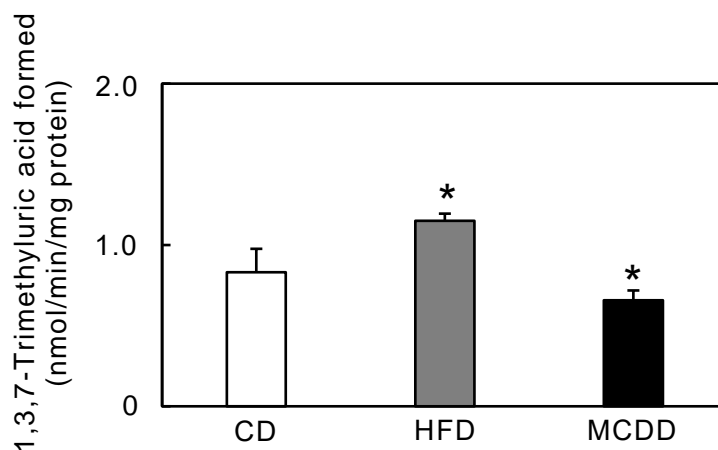


Fig. 4 Changes in CYP 1A2 activities in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

The caffeine 8-oxidase activities catalyzed by CYP1A2 in rat liver microsomes from CD-, HFD-, or MCDD-fed rats were determined by measuring the formed 8-hydroxy caffeine using HPLC. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

5. NASH における CYP4A1 依存性脂肪酸 ω 水酸化反応の亢進

CYP4A ファミリーは脂肪酸 ω 水酸化反応を触媒する酵素である。そこで、ラット肝ミクロソームにおける CYP4A1 活性をラウリン酸の 12-水酸化体 (ω 水酸化体) である 12-Hydroxy lauric acid (12-OH LA) の生成量を指標として LC/MS/MS にて測定した。その結果、CYP4A1 の活性は、その mRNA/タンパク質発現変動と同様に NAFL では変化せず、NASH において有意に増加した (Fig. 5)。興味深いことに、最近、ヒト CYP4A11 (ラット CYP4A1 に相当する) は、アラキドン酸の ω 水酸化反応を触媒することによって生理活性脂質である 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) に変換し、この 20-HETE は TGF- β 1/Smad3 シグナル伝達を介して肝線維化を誘導することが報告されている。それゆえ、NASH における CYP4A1 発現/活性の誘導は脂肪肝における持続的炎症とそれに続く組織線維化に関与するものと推察された。このことは、CYP4A ファミリーの阻害や発現抑制が NAFL から NASH への病期進展防止のための新たな治療標的となり得ることを示唆している。

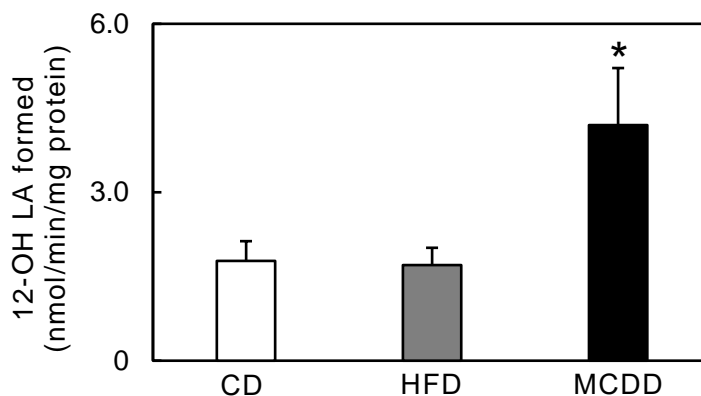


Fig. 5 Changes in CYP 4A1 activities in the liver of CD-, HFD- or MCDD-fed to rats for 4 weeks.

CYP4A1 activities in rat liver microsomes from CD-, HFD-, or MCDD-fed rats toward lauric acid. CYP4A1 activity was determined by measuring ω hydroxylation activity toward lauric acid. 12-Hydroxy lauric acid (12-OH LA) was measured using LC/MS/MS. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

6. 脂肪酸負荷誘発 NAFL 様および NASH 様細胞における CYP1A2 発現変動

本研究において、ラット肝ミクロソームにおける CYP1A2 の発現/活性が NAFL モデルにおいて上昇し、NASH モデルにおいては逆に正常ラット肝より

も低下することを明らかにした。この反転変動のメカニズムを解明するには、分子細胞生物学レベルでの解析が必要である。そこで、NAFL および NASH における CYP1A2 発現調節機序解析の一步として、ラット肝初代培養細胞を用いて脂肪肝 (NAFL) 様および脂肪肝炎 (NASH) 様細胞の作製を試みた。正常ラット肝臓から常法により採取した肝細胞をオレイン酸 (Oleic acid; OA) 単独負荷により NAFL 様細胞を作製した。また、飽和脂肪酸が小胞体ストレスや酸化ストレスを介して線維化を誘導することを利用して、OA およびパルミチン酸 (Palmitic acid; PA) 共存負荷 (OA+PA 負荷) (OA:PA 組成比 = 2:1) によって NASH 様細胞を作製した。細胞への脂肪蓄積量は、OA または OA+PA 負荷したラット初代培養肝細胞を Oil Red O 染色した後、Oil Red O を分光光度計にて定量することで評価した。また、細胞への炎症の有無は、炎症性サイトカインである *IL-1 β* mRNA 量を定量的 real-time PCR にて測定し、評価した。その結果、OA 負荷肝細胞および OA+PA 負荷肝細胞のいずれにおいても細胞への顕著な脂肪蓄積が認められた (Fig. 6)。

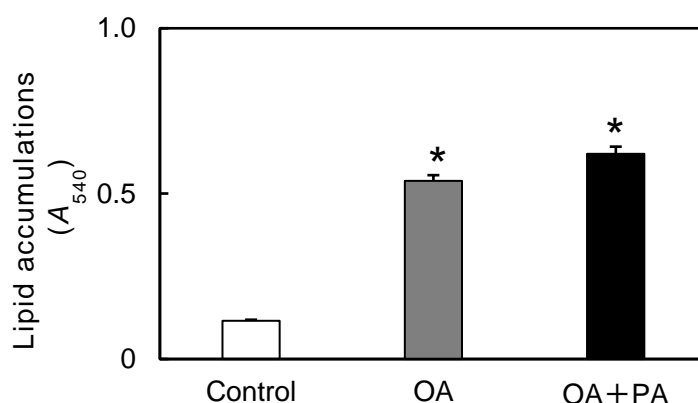


Fig. 6 Lipid accumulations in primary rat hepatocytes treated with OA or a combination of OA and PA

The primary rat hepatocytes were treated with or without OA or a combination of OA (0.5 mM) and PA (0.25 mM) for 24 h. The lipid accumulation in the primary cultured hepatocytes was examined using Oil Red O staining. The amounts of stained lipid droplets dissolved in isopropanol were quantified using spectrophotometry at 540 nm. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$ vs. 10% FBS-Williams' medium E alone. OA, oleic acid ; OA+PA, combination of oleic acid and palmitic acid.

IL-1 β mRNA 量は、対照細胞と比較して OA+PA 負荷肝細胞でのみ有意な増加を認めた (Fig. 7)。これらの結果から、OA 負荷肝細胞は炎症のない脂肪蓄

積細胞、OA+PA 負荷肝細胞は脂肪の蓄積に加えて炎症が惹起された細胞であることが示唆された。従って、ラット OA 負荷初代培養肝細胞は炎症/組織損傷のない NAFL 様細胞、および OA+PA 負荷初代培養肝細胞は脂肪蓄積と炎症が惹起された NASH 様細胞とみなし、各モデルにおける CYP1A2 のタンパク質量を Western blotting にて比較検討した。その結果、CYP1A2 発現量は、OA 負荷肝細胞 (NAFL 様細胞) において増加したが、OA+PA 負荷肝細胞 (NASH 様細胞) では減少した (Fig. 8)。

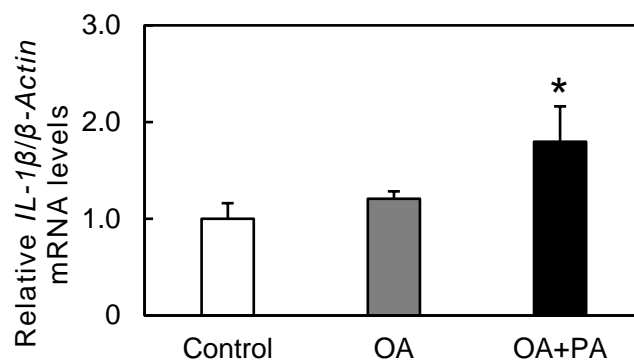


Fig. 7 IL-1 β mRNA levels in primary rat hepatocytes treated with OA or a combination of OA and PA

The primary rat hepatocytes were treated with or without OA or a combination of OA (0.5 mM) and PA (0.25 mM) for 12 h. *IL-1 β* mRNA levels were examined via quantitative PCR. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$ vs. 10% FBS-Williams' medium E alone. OA, oleic acid; OA+PA, combination of oleic acid and palmitic acid.

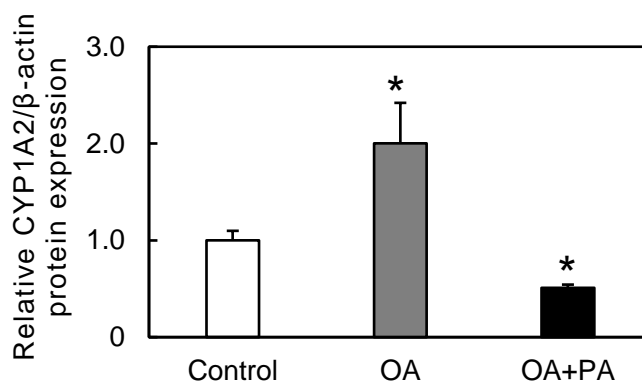


Fig. 8 Changes in expression levels of CYP 1A2 in primary rat hepatocytes treated with OA or a combination of OA and PA

Primary rat hepatocytes were treated with OA or a combination of OA (0.5 mM) and PA (0.25 mM) for 24 h. The protein levels of CYP1A2 in hepatocytes were measured using western blot analysis. Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$, vs. 10% FBS-William's medium E alone. OA, oleic acid; OA+PA, combination of oleic acid and palmitic acid.

従って、NAFLにおいて正常肝よりも上昇した CYP1A2 の発現/活性が NASH において逆に正常肝よりも低下した要因の一つとして、炎症や線維化の有無が影響している可能性が示唆された。これらのことから、NAFL および NASH モデルにおいて認められる CYP1A2 発現反転変動が初代培養肝細胞実験においても再現されることが実証された。ラット初代培養肝細胞におけるこれらの結果は、Moravcová らが作製したものとよく類似していた。それゆえ、本研究で作製された NAFL 様細胞および NASH 様細胞は、CYP1A2 のみならず、CYP4A1 ファミリーの発現機能機序解析や阻害剤探索研究、さらには NAFLD 病期進展による各種 CYP 発現調節および薬物代謝活性変動を解析するために有用であるものと考えられた。

7. 総括

比較的短期間の 4 週間 HFD または MCDD 摂餌ラットにより、炎症/組織損傷のない単純性脂肪肝 NAFL モデルおよび炎症/組織損傷ならびに線維化を伴う脂肪肝 NASH モデルがそれぞれ作製された。

CYP 分子種のうち、CYP1A2 の発現/活性は NAFLD 病期初期にあたる NAFL 期において正常ラット肝よりも誘導され、炎症/組織損傷および線維化を伴う NASH 期においては逆に正常肝よりも低下することを初めて明らかにした。また、NASH における CYP4A1 発現/活性の上昇は NAFL から NASH への病期進展に関与するものと推察された。

ラット NAFL 様および NASH 様細胞を用いた *in vitro* 細胞実験系において、*in vivo* の NAFL および NASH モデル間で認められた CYP1A2 発現の反転変動が再現されることが実証された。

CYP 分子種の発現変動がヒトでも同様であると想定すると、本研究で得られた知見は、NAFLD 病期進展と各 CYP 分子種による薬物代謝能との関係性および薬物動態変動を考慮する上で重要な基礎データになり得るとともに、NAFLD 病期進展による CYP 分子種の発現変動を考慮して「薬物治療の最適化」を図る必要があることを提唱するものである。