

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	木村 淳史
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 1044 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Effects of a Novel Selective PPAR α Modulator, Statin, Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor, and Combinatorial Therapy on the Liver and Vasculature of Medaka Nonalcoholic Steatohepatitis Model (非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) メダカモデルの肝臓および血管系に対する新規選択的 PPAR α モジュレーター、スタチン)
論文審査委員	主査 教授 曾根 博仁 副査 教授 佐藤 昇 副査 准教授 小林 隆

博士論文の要旨

【目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧、インスリン抵抗性などの代謝調節不全と密接に関連しており、心血管イベントや慢性腎臓病などの様々な合併症を引き起こす。肝臓の脂肪化に伴い炎症を起こし線維化が進行する病態である非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、いくつかの代謝経路が複雑に関連した疾患であり、生活習慣病の増加と共に近年急激に増加している。しかし現在標準的な治療法はなく、その開発は急務であると考えられている。

本研究は、NASH の薬物効果を調査するため高脂肪食 (HFD) によって作成された NASH メダカモデルを用いて、異なる代謝経路を持つ各々の薬剤とそれらの組み合わせの NASH に対する効果について検証することを目的としている。

【方法】 血管に対する薬物の影響を調べるため fli-GFP トランスジェニックメダカを使用し、1 匹当たり 20mg/日となるよう HFD を水槽に投入し、HFD メダカモデルを作成した。メダカは脊椎動物で哺乳類と同様の糖代謝機能を持ち、ゲノムプロジェクトも完了しており、ヒトの遺伝子配列と 8 割程度の相同性があると言われている。世代サイクルも早く、水槽内の濃度を一定に保つことができる点からも薬効評価のモデルとしてはふさわしいと考えた。使用した薬剤は、核内受容体である PPAR α の立体構造を変化させ、肝臓の脂質代謝に関わる遺伝子群の発現を選択的に調節することによって、脂質代謝を改善する選択的ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α モジュレーター (SPPARM α) であるペマフィブラート、RhoA および Ras シグナル伝達の阻害を通じて肝臓の炎症を減少させることが知られているピタバスタチン、血糖降下や心血管イベントを軽減するナトリウム-グルコース共輸送体 2 阻害剤 (SGLT2 阻害剤) でトホグリフロジンの 3 剤を使用した。単剤またはそれらの組み合わせを用いて、NASH メダカモデルの生理学的変化、肝臓の組織学的変化、尾ヒレの血管構造、および血清生化学的マーカーを評価した。さらに、効果のメカニズムを明らかにするため、メ

ダカの肝臓を使用して全トランスクリプトームシーケンスを実施した。

【結果】組織学的分析により、単剤およびそれらの組み合わせによる治療後の肝臓に脂肪化および線維化の有意な抑制が明らかとなった。ピタバスタチンおよびピタバスタチンとトホグリフロジン混合は、HFD 給餌 4 週間後および 8 週間後の肝脂肪化を抑制した。また、ペマフィブラートは HFD 給餌 12 週間後に肝脂肪化の抑制をもたらした ($p < 0.05$)、その効果はトホグリフロジンと組み合わせるとさらに高まった ($p < 0.001$)。肝線維化において、ペマフィブラートは HFD 給餌 12 週間後、トホグリフロジンは HFD 給餌 8-12 週間後に効果を示した。HFD 給餌 12 週間後において、ペマフィブラートとトホグリフロジンおよびピタバスタチンとトホグリフロジンの組み合わせは、各々の単剤投与よりもさらに線維化抑制効果を示した。これらの結果は、ペマフィブラートが肝脂肪化と線維化を抑制するのに効果的であり、トホグリフロジンと組み合わせるとその効果が增加することを示唆している。また、薬剤投与による遺伝子発現について検証すると、HFD 給餌 12 週間後において、ペマフィブラートとトホグリフロジン、ペマフィブラートとトホグリフロジンの併用薬は、線維症関連遺伝子発現を継続的に抑制した。

さらに、HFD 給餌の fli-GFP トランスジェニックメダカは、アテローム性動脈硬化症により血管径が狭くなり、HFD 給餌 12 週後にヒレの GFP 陽性領域が減少した。ペマフィブラートを投与されたグループでは、HFD 給餌 12 週後で血管領域は維持されていた。

【結論】

メダカ NASH モデルの肝臓および血管構造に対する SPPARM α 、スタチン、および SGLT2 阻害剤の単剤や組み合わせの効果を証明した。HFD によって誘発された fli-GFP トランスジェニックメダカ NASH モデルは、肝臓の脂肪化、線維化に関わる遺伝子発現の影響や血管構造に対して薬物作用の分子メカニズムを明らかにするのに有用であった。

本研究はメダカ肝臓の全ゲノム配列と遺伝子発現評価を報告した最初のものであり、今後薬物の分子メカニズムを明らかにするのに役立つと考える。

審査結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、生活習慣病の増加と共に近年増加しているが標準治療法はない。申請者は NASH の薬物効果を調べるため NASH メダカモデルを作成し、異なる代謝経路を持つ薬剤とそれらの組み合わせの NASH に対する効果について検証した。血管に対する効果を調べるため fli-GFP トランスジェニックメダカを使用し NASH 病態を評価した。野生型メダカを用い両者に NASH モデルとして差がないことを確認した。薬剤はペマフィブラート (PEMA)、ピタバスタチン (PITA)、トホグリフロジン (TOFO) の 3 剤を使用した。単剤または組み合わせを用いて、NASH モデルの肝組織学的変化、血管構造を評価した。メカニズムを明らかにするため、肝臓を用いて全トランスクリプトームシーケンスを実施した。

結果として PEMA は HFD 給餌 12 週間後に肝脂肪化の抑制をもたらした ($p < 0.05$)、その効果は TOFO と組み合わせるとさらに高まった ($p < 0.001$)。HFD 給餌 12 週間後において、PEMA と TOFO および PITA と TOFO の組み合わせは、各々の単剤投与よりもさらに線維化抑制効果を示した。これらの結果は、PEMA が肝脂肪化と線維化を抑制するのに効果的であり、TOFO と組み合わせるとその効果が增加することを示唆した。HFD 給餌の fli-GFP トランスジェニックメダカは、アテローム性動脈硬化症により血管径が狭くなり、HFD 給餌 12 週後にヒレの GFP 陽性領域が減少した。PEMA 投与群では、HFD 給餌 12 週後で血管領域は維持された。

本研究は、メダカ NASH モデルを用いて肝臓および血管構造に対する PEMA、PITA、TOFO の効果が証明したものである。NASH は全身疾患であり、その治療は異なる作用機序を有した薬剤の組み合わせが有効であることを示した。これらの点に博士論文としての価値を認める。