

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 茂木 聡子
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1047 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 A novel prostaglandin I2 agonist, ONO-1301, attenuates liver inflammation and suppresses fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model mice.
(新規プロスタグランジン I2 アゴニストである ONO-1301 は非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスにおいて肝臓の炎症と線維化を改善する)

論文審査委員 主査 教授 芝田 晋介
副査 教授 阿部 理一郎
副査 准教授 小林 隆

博士論文の要旨

【目的と背景】

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は慢性肝疾患と肝硬変の最も重要な原因の 1 つである。大半は生活習慣や肥満に関連しており、これらの改善が重要となる。一方で炎症や線維化の進行を防ぐ新薬の並行開発が不可欠だが、未だ確立された治療がないのが現状である。

NASH モデルマウスとしてメラノコルチン 4 受容体欠損 (MC4R-KO) マウスが知られている。MC4R は視床下部の核で発現する食欲抑制作用を媒介する受容体分子であり、その欠損により過食による肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝などヒト NASH と共通の表現型を示すことが知られている。

この研究で NASH の新規治療薬として検討する ONO-1301 は、トロンボキササン (TX) A2 合成酵素阻害作用を併せもつ長期作用型プロスタサイクリンアナログ (IP 受容体作動薬) である。非プロスタグランジン (PG) 骨格であるため科学的に非常に安定である点、TXA2 合成酵素阻害作用により IP 作動薬反復投与における耐性発現が抑制される点、内因性 PGI2 や PGE2 を誘発しうる点で新規性を持つ。さらに ONO-1301 は線維芽細胞、内皮細胞などの IP 受容体に作用し cAMP 上昇を介して肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF) などの再生因子の発現を誘導する。既に肺高血圧症、肺線維症、心臓梗塞、腎間質性線維症、そして急性肝障害などのさまざまな疾患で抗炎症や抗線維化効果が報告されている。本研究では NASH に対する ONO-1301 の治療効果と作用機序を評価する。

【方法および結果】

申請者は in vivo での薬物効果の検証を①②のように行った。また in vitro での作用機序の検討を③のように行った。

①MC4R-KO マウスでの ONO-1301 の効果検証

MC4R-KO マウス (8 週齢) に WD 負荷を 20 週行い、対照群 (Ct1) とした。ONO-1301 投与群 (ONO) は WD 負荷開始時より同薬剤を混餌した。いずれも 28 週齢時点で生化学的解析、組織学的解析および RT-PCR 法によ

る遺伝子学的解析を行った。

その結果 ONO 群は Ct1 群と比較し、生化学的所見において ALT, ALP, T-Bil, T-cho を低下させ、肝体重比を改善した。Sirius red 染色域や Hydroxyproline 量の測定により線維化の抑制を確認し、F4/80 染色で NASH の特徴であり線維化の起点となることが示されているマクロファージの Crown-like structures の形成を検討するとその出現が抑制されていた。また、肝組織内の cAMP 量を測定すると、ONO 群で高い傾向があった。以上の結果より ONO-1301 は肝障害軽減と線維化抑制効果があることを示した。

② ONO-1301 の中途投与群、長期投与群での効果検証、腫瘍形成の評価

MC4R-KO マウス (8 週齢) に WD 負荷を 28 週行い、Ct1 群とした。ONO-1301 中途投与群 (mid-ONO) は WD 負荷 20 週時点より、ONO-1301 長期投与群 (long-ONO) は WD 負荷開始時より同薬剤を混餌した。いずれも 36 週齢時点で生化学的解析、組織学的解析、RT-PCR 法による遺伝子学的解析および肝腫瘍の発生について評価した。

その結果 mid-ONO 群も Ct1 群と比較し、ALT, ALP, T-Bil を低下させ、肝体重比の改善、線維化の抑制を認めた。また、long-ONO 群は上記に加え、T-cho, TG の脂質系の改善も認めた。また Ct1 群で 6/10 (60.0%)、mid-ONO 群で 1/8 (12.5%)、long-ONO 群で 0/6 (0.0%) の割合で肝腫瘍を認めた。以上の結果より ONO-1301 は NASH の程度に関わらず肝障害軽減と線維化抑制効果があり、さらに肝腫瘍の発生を低下させる可能性があることが明らかになった。

③ ONO-1301 のマクロファージ、肝星細胞 (HSC)、内皮細胞への効果検証

マクロファージはマウス骨髄由来のものを使用、大腸菌 O-111 由来のリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) 刺激により炎症を誘発し、ONO-1301 による抗炎症効果を RT-PCR 法を用い検討した。ONO-1301 は LPS により増加した M1 マーカーを抑制し、抗炎症性に働いた。

肝星細胞はマウス肝臓から採取・分離したものを使用し、自然活性化に対する ONO-1301 の抑制効果や再生因子の発現変化を RT-PCR 法を用い検討した。ONO-1301 は HSC の線維化マーカーを抑制、抗線維化マーカーを上昇させ、静止型 HSC の維持に寄与することを示した。また、VEGF の発現を上昇させた。

内皮細胞についての評価は、ヒト臍帯静脈内皮細胞株を使用し、再生因子の発現変化を RT-PCR 法を用い検討した。ONO-1301 は VEGF および HGF の発現を上昇させた。

【考察と結論】

申請者らの研究の結果は、ONO-1301 が NASH における肝障害や線維化を改善させ、肝腫瘍の発生を防ぐ可能性を示唆した。その機序として 1) 炎症性マクロファージを抑制することで肝障害を軽減し、2) 星細胞の活性化を抑制することで肝線維化を抑制し、3) VEGF, HGF の発現亢進により肝再生を促すという異なる作用点が全体として NASH モデルの肝障害および肝線維化を効果的に改善させたと考えている。以上の結果より抗炎症、抗線維症および再生誘導因子の誘導等の機能を有する ONO-1301 が、心臓や腎臓など他臓器疾患を伴うことが多い NASH に対する新たな治療戦略になりうる薬剤であると考えられる。

審査結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の治療法開発のため、高脂肪負荷を行ったメラノコルチン 4 受容体欠損 (MC4R-KO) マウスを NASH モデルマウスとして用い、新規候補薬剤 ONO-1301 の治療効果の中長期的に検証した。その結果、対照群に比較して各種肝臓生化学的検査値の低下や肝体重比を改善し、線維化の抑制効果が認められた。長期投与群と投与期間を短縮した群間での比較では、生化学マーカーの改善や線維化の抑制だけでなく、腫瘍化リスクの軽減にも役立つことが示され、NASH の進行の程度によらず肝障害を軽減する作用があることを証明した。治療効果のメカニズムについても、マクロファージに対する抗炎症効果や、肝星細胞に対する抗線維化効果、血管内皮細胞に対する各種栄養因子の分泌促進効果などを捉えた。

以上の研究により、ONO-1301 が有する抗炎症作用、抗線維化作用などを明確に示し、肝臓の再生を誘導する因子の放出を促すことを示した点で、NASH への新規薬剤候補として有用であることを示した非常に画期的で有意義な研究成果を残されたことから、学位論文としての価値を認める。