創薬に向けた新たな NASH 動物モデルの開発 肝代謝疾患である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の 創薬アプローチ

須藤 正幸¹⁾, 松本 雅彦²⁾

要約: 肝疾患の原因として肝炎ウイルス, アルコール, 自己免疫, 原発性胆汁性肝硬変やその他の代謝異常などがあげられる。最近, 生活習慣に由来する非アルコール性の肝疾患 (NAFLD/NASH) の増加が注目されている。本邦においては, 生活習慣の欧米化に伴い, 脂肪肝が成人男性の 3 割ともいわれ, 内臓脂肪型肥満やメタボリックシンドロームの表現型として NAFLD が増加している。NAFLD の中でも進行性線維化病態を示す NASH の頻度は 1% と推定され, 抜本的な治療薬のニーズが議論されている。そこで, 我々はこのような疾患に対する創薬アプローチとして, ヒト疾患を反映した動物モデルを作製することを試みた。既存の動物モデルを改良する方法で創薬に適した新しい動物モデルを構築した。

1. NAFLD/NASH という疾患

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) とは飲酒量がエタノール換算で, 1 日 20 g 以下で脂肪肝を呈するものである。NAFLD は単純性脂肪肝 (simple steatosis) と非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) の二つの疾患概念からなるが, 臨床的に重要な疾患は肝硬変や肝がんに行進する NASH である。NASH は 1980 年に Ludwig により提唱された疾患概念(1)で, 明らかな飲酒歴が乏しいにもかかわらずアルコール性に似た肝組織像を示す慢性進行性の肝疾患であり, 肥満, 糖尿病やインスリン抵抗性などメタボリックシンドロームが背景にあると考えられている。実際, B 型あるいは C 型慢性肝炎由来でない (非 B 非 C, NBNC) がんと発症した肝硬変ではアルコール性肝障害が約半分を占めるが, その中で肝がん合併例におけ

る NASH の頻度はアルコール性のそれよりも高く, NASH は NBNC 肝がんの重要な発がんリスクと考えられる。NBNC 肝硬変の頻度は全肝硬変の 26% で漸増傾向にある。また, NBNC 肝硬変の成因別頻度はアルコール性が約 55% でほとんど変化しないが, NASH は 14.5% と増加している(2)。近年, 本邦においても食生活の欧米化やライフスタイルの変化に伴い患者数は増加しており, NASH の頻度は成人の 1% であると推計され, 今後さらに増加すると予想されている。したがって, 早急な対策が必要であると考えられているが, 有効性のある特異的な治療法は見出されていない。中でも NASH における肝線維化の進展は予後との相関が報告されており, 線維化機序の詳細な解析は治療法確立のために有用な情報を与えるものと期待される。NASH の成因としては, 最初にメタボリックシンドロームに伴う肥満, 高脂血症, 2 型糖尿病, インスリン抵抗性などによって肝臓内に脂肪が蓄積して脂肪肝 (first hit) が起こり, その脂肪肝が脂質代謝異常となり炎症性のサイトカインや酸化ストレスなどの second hit によって脂肪肝炎 (steatohepatitis) へと移行する (second hit) という, Day らの提唱した two-hit theory(3) がもっとも有名である。しかしながら, 最近ではより複雑な multiple parallel hits 仮説(4)も提唱されている。すなわち, これまでの two-hit に加えて腸管での腸内細菌叢の影響, 腸管や脂肪組織から放出される多数の因子の影響など複数の障害が並行して起きることで肝臓に炎症が生じるという説である。詳細についてはそれぞれの文献に記載されており, ここでは割愛する。

キーワード: NAFLD/NASH, 肝線維化, 高脂肪食, 動物モデル

¹⁾ 中外製薬株式会社 (〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1-135)

²⁾ 株式会社中外医学研究所 (〒412-8513 静岡県御殿場市駒門 1-135)

E-mail: sudomasy@chugai-pharm.co.jp 原稿受領日: 2014 年 4 月 25 日, 依頼原稿

Title: An approach for anti-fibrotic drug discovery in NASH Author: Masayuki Sudoh, Masahiko Matsumoto

2. 肝脂質代謝におけるリポトロープの役割

これまで数多くのNASH動物モデルが作製されてきた(5-7). 遺伝的変異のあるもの, 飼料を工夫したもの, さらにそれらの組合せなどである. 動物モデルを作製するにあたり, 我々はこれまで報告されている飼料成分を参考に, よりヒトのNASH病態を模倣し, かつ実験的に使いやすいモデルの作製をおこなったので, ここに紹介する. 我々は脂質代謝におけるリポトロープの役割に着目した(図1). リポトロープにはコリン, メチオニン, イノシトール, ビタミンB₁₂などが含まれるが, 単に栄養素としての役割だけでなく, 肝臓から脂肪を血液循環に放出する上で重要な役割を担っている. 疎水性のトリグリセリド(TG, 中性脂肪)を豊富に含むvery low density lipoproteins (VLDL)の肝臓からの分泌にはホスファチジルコリン(PtC)が重要な役割を担っており(8,9), そのPtCの供給源がメチオニンやコリンである. リポトロープは, メチル基転移経路(transmethylation pathway)の構成成分としても重要であり, メチオニンのメチル基をS-adenosyl-methionine (S-Ade-Met)を介してホスファチジルエタノールアミン(PtE)に供与し, PtCが合成される. 一方, メチオニンはエタノールアミン(EA)にメチル基を供与してコリンが合成される. また, コリンはホスホリルコリン(P-C)を経由してPtCに変換され, 一方でPtCが代謝されてコリンが作られる. したがって, 飼料や食事のメチオニンやコリンが減るとPtCの合成量が減り, TGの排泄が抑制され, 肝臓内の脂肪が増えるという仕組みである. また, 肝臓内のTG代謝に関するmicrosomal triglyceride transfer protein

(MTTP) や phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) の single nucleotide polymorphism (SNPs) が見出されており, それらがNAFLDの感受性を高めるという報告もある(10). このように肝臓内に脂肪を蓄積させるメカニズムとして, 肝臓内のTG代謝が重要であり, その代表的な障害モデルとしてメチオニン/コリン欠乏(MCD)飼料モデルがある. メチオニンとコリンの2つのリポトロープを共に欠乏するMCD飼料モデルは, 肝臓中の脂質代謝に留まらず, 筋肉量の減少も含め全身的な影響が強く極度の体重減少を招くモデルで, 継続的な線維化過程の観察や薬効評価系としては使い難い点がある. メチオニンは, コリン生合成の前駆体であり, コリン欠乏食にこのアミノ酸を補給すると, メチオニン量に応じて極度の体重減少を改善することができる. また, Nakaeら(11)により報告されたコリン欠乏アミノ酸(CDAA)飼料モデルは, 脂肪としてhydrogenated vegetable oil (Primex)とコーンオイルを含み, 31%脂肪含量のコリン欠乏状態に1.7 g/kgのメチオニンを含む飼料である. このCDAA給餌は, 6~7週齢のFischer 344またはWistarラットに強力かつ迅速に肝細胞がんを誘発するモデルとして開発され, 種差(ラット>マウス), 性差(オス>メス)があることが報告されている. 本モデルの肝細胞がんの進展過程で, 脂肪肝・肝細胞障害・肝線維化過程が観察され, NAFLD/NASHモデルとしての利用も広がっている. 上記のように種差, すなわち, マウスとラットにおける食餌性脂肪含量がリポトロープの量によって違いがあることは, 我々もラットの肝細胞がん研究で最適化されたCDAAをC57BL/6Jマウスに3週間給餌した際, 肝細胞障害が弱い, あるいはほとんど生じないことで経験している. 一方で, マウスに超高脂肪食を長期間(20週間以上)給餌させると脂肪肝から肝細胞障害を誘導するNAFLDの進展は観察できるものの, 線維化過程は誘導できなかった. つまり, NAFLD/NASHの線維化過程を迅速に研究するモデルの作製には, リポトロープ成分のバランスが重要な因子であることが再認識された. 我々はこの仕組みを利用して臨床を模倣する動物モデルの作製を行った.

3. コリン欠乏高脂肪食飼料(CDAHFD)を用いたマウスNASHモデル

ここでは我々の研究結果を紹介する. まず, C57BL/6Jマウスに標準食(SD, 日本クレア#CE-2), 高脂肪食(HFD, リサーチダイエット#D12492), 低脂肪食(LFD, リサーチダイエット#D12450B)を24

図1 ホスファチジルコリンの合成

週間給餌したところ、HFD は他に比べて体重増加が認められ (図 2A), 18 週までに血漿 ALT が有意に増加した (図 2B). したがって, 高脂肪食だけでも肝障害は誘導された. しかしながら, 24 週間まで給餌したマウスの肝臓では肝細胞の steatosis は惹起されたが線維化は観察されなかった (図 2C). 次に, HFD と MCD 飼料モデルを組み合わせた検討をおこなった. MCD 飼料モデルで報告されているように, メチオニンとコリンを欠乏した HFD, すなわち MCDHFD を給餌されたマウスでは, 高いレベルの ALT の遊離を伴い, 精巣上体周囲脂肪重量 (epididymal fat mass) の消失と著しい体重減少を示した. しかしながら, 3 週間の給餌期間において, C57BL/6J マウスは, 摂取カロリーが約 10 kcal/day であり, 活動性が維持されていた. 飲

水へのメチオニンの添加は, その濃度に応じてメチオニンが摂取され, 体重減少が軽減され, 0.1% メチオニンにおいて, epididymal fat mass の蓄積と SD と同様の体重増加を示した. 0.03% メチオニンの飲水群において, 給餌開始時期と比べ 3 週間の給餌により, 体重は減少していたが, epididymal fat mass は維持された. この群は, 高いレベルの ALT (449 ± 38 U/L) の遊離を伴い, 他の群には見られない相対肝重量の増大が観察された. この 3 週間の給餌期間において, 平均の摂餌量は, 2.1 ± 0.1 g/day, 飲水からのメチオニン摂取量は, 2.4 ± 0.1 mg/day であった.

次に, メチオニン飲水の検討に基づき, C57BL/6J マウスに対して, MCD 飼料 (ダイエット #518810) および MCDHFD (リサーチダイエット #A06071301B)

図 2 脂肪含量の異なる飼料による肝障害の程度

表 1 MCD および MCDHF 飼料給餌におけるメチオニン添加の影響

飼料	SD	MCDD		MCDHFD	
メチオニン (%)	—	0.03	0.1	0.03	0.1
体重 (g)					
給餌前	20.9 ± 0.5	20.9 ± 0.6	21.0 ± 0.5	20.8 ± 0.4	21.2 ± 0.8
給餌後	25.1 ± 0.8 ^{##}	16.5 ± 0.6 ^{*,##}	22.3 ± 0.7 [*]	15.1 ± 0.4 ^{*,##}	20.1 ± 0.7 ^{**}
肝重/体重 (%)	5.48 ± 0.11	4.21 ± 0.15 ^{**}	5.53 ± 0.41	5.62 ± 0.14	6.66 ± 0.05 ^{**}
精巣上体脂肪/体重 (%)	1.42 ± 0.16	0.98 ± 0.13 [*]	1.46 ± 0.09	0.35 ± 0.04 ^{**}	1.25 ± 0.07
ALT (U/L)	29 ± 5.5	333 ± 51 ^{**}	124 ± 5.8	556 ± 86 ^{**}	360 ± 23 ^{**}
AST (U/L)	65 ± 7.7	289 ± 8.4 ^{**}	171 ± 16	489 ± 82 ^{**}	309 ± 9.3 ^{**}
トリグリセリド (mg/dL)	83 ± 13	21 ± 3.1 ^{**}	29 ± 3.2 [*]	45 ± 21	56 ± 4.3
総コレステロール (mg/dL)	82 ± 5.3	31 ± 7.6 ^{**}	54 ± 3.2 ^{**}	46 ± 9.0 ^{**}	48 ± 3.7 ^{**}

ALT: アラニンアミノ基転移酵素, AST: アスパラギン酸アミノ基転移酵素, SD: 標準飼料, MCDD: メチオニンコリン欠乏食, MCDHFD: メチオニンコリン欠乏高脂肪食. 数値は平均値 ± S.E.M. で示した (N=3). 標準飼料給餌のマウスとの有意差検定, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01. 給餌開始前の体重との有意差検定, ^{##}P<0.01.

へ0.03%および0.1%メチオニン添加飼料の3週間給餌の影響を検討した。0.03%メチオニン添加群は、両者の飼料で、epididymal fat massの減少と20%以上の体重減少を示した。体重減少に加え、0.03%メチオニン添加MCD群では、相対肝重量の有意な減少が観察された。相対肝重量や脂肪重量は、MCDおよびMCDHFDの餌中のメチオニン添加の増量と共に、増加した。両方の餌でメチオニン添加量の増加は、これらの肝障害マーカー（ALTとAST）の増大と体重減少を抑制した。MCDおよびMCDHFDへ0.1%のメチオニンを添加すると、体重変化は±10%に納まり、相対脂肪重量はSDを給餌されたマウスと同程度であった。MCDHFDに0.1%メチオニンを添加した餌（CDAHFD、リサーチダイエット#A06071302）を給餌されたマウスは、高いレベルのALTとAST値を示し、0.1%メチオニン添加MCDでは観察されない、明らかな肝肥大が観察された（表1）。

また、系統差による線維化感受性の検討をおこなった。C57BL/6JとA/Jマウスに6週間、CDAHFDを給餌したところ、体重減少はC57BL/6Jの方が軽微で、3～5%であった（図3A）。血漿中ALT値は、両系統共に、給餌1週間より高値を示した（図3B）。病理組織化学的な検討では、両系統共に強いsteatosisを示し、A/Jに比し、C57BL/6Jマウスでは炎症細胞の浸潤が強く、6週間給餌で線維化の進展が示唆された（図3C）。

C57BL/6Jマウスにおいて、CDAHFDの3および6週間給餌で、コラーゲン遺伝子の発現（図4A）とウェスタンブロットによる α -smooth muscle actin（ α -SMA）を測定した（図4B）ところ、共に顕著な上昇が観察された。さらに、CDAHFD給餌により14週間飼育したところ、マウスの体重は給餌3週間以降、緩やかな体重増加を示した（図5A）。肝臓中のTG（図5C）、炎症性サイトカイン（図5D）は3週間給餌から上昇し、線

図4 CDAHFD 給餌マウスの線維化マーカーの発現

図3 CDAHFD 給餌マウスの肝障害の系統差の違い

図5 CDAHFD 給餌マウスの特徴

図6 CDAHFD 給餌マウスの病理組織学的評価

維化の指標であるヒドロキシプロリン (OH-Pro) 含量は、6 週間給餌から上昇が始まり、10 週間にかけて 3~4 倍に上昇した (図 5E)。経時的な病理組織学的な観察においても steatosis および炎症細胞浸潤が確認され (図 6A)、線維化についてはマッソン・トリクローム染色により、6 週間給餌以降に観察された (図 6B)。その他、NASH 動物モデルについては他の文献にも特徴がまとめられている (5)。

本研究で、我々は 60% 脂肪を含む超高脂肪食をベー

スにコリン欠損、0.1% メチオニンを含む CDAHFD を調合し、C57BL/6J マウスにおいて、6 週間というより短期間の給餌で肝肥大を伴う脂肪性肝炎から線維化が始まることを示した。現在、より詳細な病理組織学的な観察や、肝臓中の遺伝子発現に基づく線維化シグナルを中心とした解析および、より線維化のリモデリングに関する評価系の構築を目指して更なる検討が進行中である。

4. おわりに

我々はマウスにおいて迅速に, しかも持続的に線維化過程を検討するためのNASHモデル用餌としてリポトロープ成分のバランスを考慮したCDAHFDを新たに調合した。CDAHFD 給餌は1週間で肝臓への過剰な脂肪蓄積により肝障害マーカーが上昇し, 引き続き炎症細胞の浸潤, 肝線維化シグナルの亢進を伴い, 6週間程度で肝線維化が顕在化し, 以降線維化過程が進展・持続することを示した。それらはヒトのNASHの典型的な病態進展を模倣するものであった。本モデルは, 長期飼育においてもマウスの体重は維持および緩やかな増加を示し, 肝臓への脂肪蓄積を誘因とし, 線維化過程を研究する上で, 迅速かつ安定的に評価可能な成績を得ている。したがって, CDAHFD モデルは, NASH の線維化過程の病因や薬剤による病態の修飾を

評価する上で有用なモデルとして活用されることが期待される。

著者の利益相反: 須藤正幸 (中外製薬株式会社), 松本雅彦 (株式会社中外医科学研究所)。

文 献

- 1) Ludwig J, et al. Mayo Clin Pro. 1980;55:434-438.
- 2) 高後裕 監修. 我が国における非B 非C 肝硬変の実態調査 2011. 響文社; 2012.
- 3) Day CP, et al. Gastroenterol. 1998;114:842-845.
- 4) Tilg H, et al. Hepatology. 2010;52:1836-1846.
- 5) Takahashi Y, et al. World J Gastroenterol. 2012;18:2300-2108.
- 6) London RM, et al. Clin Liver Dis. 2007;11:55-74.
- 7) Fan JG, et al. Hepatobiliary Pancreat Dis Ins. 2009;8:233-240.
- 8) Noga AA, et al. J Lipid Res. 2003;44:1998-2005.
- 9) Sha W, et al. FASEB J. 2010;24:2962-2975.
- 10) Gambino R, et al. Hepatology. 2007;45:1097-1107.
- 11) Nakae D. Jpn J Cancer Res. 1990;81:1081-1084.
- 12) Matsumoto M, et al. Int J Exp Pathol. 2013;94:93-103.