



# Metabolomics-based search for therapeutic agents for non-alcoholic steatohepatitis

Terashima, Yoshihiko

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6260号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006260>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



# Metabolomics-based search for therapeutic agents for non-alcoholic steatohepatitis

メタボロミクスを用いた非アルコール性脂肪肝炎に対する治療薬の探索

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
消化器内科学  
(指導教員：東 健 教授)  
寺島 禎彦

---

Key words: non-alcoholic steatohepatitis, gas chromatography mass spectrometry, metabolome, hypotaurine

MCD 食負荷と平行して 2mmol/kgBW のヒポタウリン・タウリン、対照群として生理食塩水の腹腔内注射を週 2 回行った。計 5 回の投与のち解剖して血漿・肝組織を採取し、肝組織像、血漿中の逸脱酵素、肝組織中の炎症性サイトカインの mRNA 発現について評価した。ヒポタウリン・タウリン投与群のいずれも組織学的に hepatocyte ballooning や spotty necrosis・脂肪化の軽減が見られた。この変化はタウリン投与群に比してヒポタウリン投与群でより明らかな傾向があった。血漿中の肝逸脱酵素の低下や肝組織中 IL1 $\beta$  の mRNA 発現抑制がヒポタウリン・タウリン投与の両群で有意に見られた。TNF $\alpha$  の発現抑制はヒポタウリン投与群でのみ有意であった。線維化の指標として測定した肝組織中 mRNA の collagen  $\alpha 1 \cdot \alpha 2$  についてはヒポタウリン・タウリン投与で低下する傾向はあったが、有意ではなかった。

ヒポタウリンは同用量でタウリンに同等以上の脂肪化、炎症の軽減作用が見られたため、続いてヒポタウリンの用量依存性の作用について検討した。

C57BL/6J の雄マウスに対して 1 週間の MCD 食負荷のみの期間を置いたのち、3 週間の MCD 食負荷と平行して 2mmol/kgBW と 10mmol/kgBW のヒポタウリン、対照群として生理食塩水の腹腔内注射を週 2 回行った。5 回の投与のち解剖して血漿・肝組織を採取し、肝組織像、血漿中の逸脱酵素、肝組織中の炎症性サイトカインの mRNA 発現について評価した。

2mmol/kgBW、10mmol/kgBW のいずれでも組織学上の脂肪肝炎や脂肪化の軽減は同等であり、血漿中肝逸脱酵素の低下や肝組織中の TNF $\alpha$ 、IL1 $\beta$  の発現抑制も同等であった。

一方で 10mmol/kgBW のヒポタウリン投与群でのみ、肝組織の collagen $\alpha 1, \alpha 2$  もいずれも有意に発現が抑制されていた。ヒポタウリン投与で肝の脂肪沈着、炎症、線維化もいずれも有意に抑制されることが示された。

MCD 食負荷マウスではインスリン抵抗性がみられないため、よりヒトの NAFLD に類似したモデルとしてインスリン抵抗性を持つレプチン欠乏肥満モデルマウス(ob/ob マウス)の検討も行った。ob/ob マウスを 3 群に分け、1 群の C57BL/6J の雄マウスと共に通常食での給餌を行い、ob/ob マウスには 2mmol/kgBW のヒポタウリン、タウリンを投与、ob/ob マウスの 1 群と C57BL/6J マウスにはそれぞれ生理食水を投与した。

4 週間の治療のち、解剖を行い、肝組織・血漿を採取した。肝組織に対して GC/MS によるメタボローム解析を行ったところ、ob/ob マウスの肝組織において C57BL/6J マウスより有意なヒポタウリンの低下がみられた。

また、インスリン感受性の評価のため、各群の血漿中のグルコース濃度、インスリン濃度を測定したところ、ob/ob マウスの生理食水投与群では著明な高インスリン血症を認めたのに対し、ヒポタウリン投与ではインスリン血漿濃度の有意に低値であった。このことから、ヒポタウリン投与によりインスリン感受性が改善される可能性が考えられた。ヒポタウリン投与による ob/ob マウスにおける脂肪肝の治療効果については現在検討中である。ヒポタウリンは非アルコール性脂肪肝炎に対する治療薬の候補として有望と考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2 4 6 0 号	氏 名	寺 島 禎 彦
論 文 題 目 Title of Dissertation	Metabolomics-based search for therapeutic agents for non-alcoholic steatohepatitis  メタボロミクスを用いた非アルコール性脂肪肝炎に対する治療薬の探索		
審 査 委 員 Examiner	主 査 小 川 渉 Chief Examiner 副 査 伊 藤 智 雄 Vice-examiner 副 査 力 武 良 行 Vice-examiner		

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease)は先進国において高頻度に見られる慢性肝疾患である。NAFLD の進行例・重症例である非アルコール性脂肪肝炎(NASH; nonalcoholic steatohepatitis)は長期の経過で肝硬変から肝不全、肝細胞癌への進展がみられる重篤な疾患である。NAFLD から NASH への進展の機序は不明な点が多く、NASH に対する有効な薬物療法は確立されていない。そこで、本研究では NASH の動物モデルであるメチオニン・コリン欠乏食負荷マウス(MCD 食負荷マウス)に対してメタボローム解析による治療薬探索が行われた。

まず MCD 食負荷マウスモデルにおける低分子代謝物の変動が検討された。C57BL/6J 雄性マウスを通常食または MCD 食で給餌し、2 週、4 週の時点での解析が行われた。MCD 食負荷では、2 週、4 週のいずれも脂肪肝炎に特徴的な hepatocyte ballooning, spotty necrosis が見られ、オイルレッド O 染色にて著明な脂肪沈着が見られた。MCD 食負荷群では血漿中の肝逸脱酵素は上昇しており、4 週で有意であった。また、MCD 食負荷群で肝組織中 TNF $\alpha$  の発現亢進が見られ、4 週で有意であった。これらの結果より MCD 食負荷で脂肪肝炎モデルが作成されることが示された。

次に各群から得られた肝組織に対して、ガスクロマトグラフィ質量分析(GC/MS ; gas chromatography mass spectrometry )によるメタボローム解析が行われ、99 成分の低分子代謝物が同定された。2 週の MCD 食負荷マウスでは 4 成分の有意な増加、4 成分の有意な減少が見られ、4 週の負荷では 4 成分の有意な増加、18 成分の有意な減少が見られた。2 週、4 週いずれでも、MCD 食負荷マウスの肝組織において、ヒポタウリンが対照群に比して最も著明な濃度低下を示した。

そこで MCD 食負荷マウスに対してタウリンとヒポタウリンの腹腔内投与を行い、その治療効果が比較された。ヒポタウリン、タウリン投与群のいずれも組織学的に hepatocyte ballooning や spotty necrosis・脂肪化の軽減が見られ、この変化はタウリン投与群に比してヒポタウリン投与群でより明らかな傾向があった。血漿中の肝逸脱酵素の低下や肝組織中 IL1 $\beta$  の mRNA 発現抑制もヒポタウリン、タウリン投与の両群で認めた。TNF  $\alpha$  の発現抑制はヒポタウリン投与群でのみ有意であった。線維化の指標である肝組織中 mRNA の collagen  $\alpha$  1、 $\alpha$  2 についてはヒポタウリン、タウリン投与で低下する傾向があった。

次にヒポタウリンの治療効果の用量依存性が検討された。2mmol/kgBW、10mmol/kgBW のヒポタウリン投与のいずれにおいても組織学上の改善は同等であり、血漿中肝逸脱酵素の低下や肝組織中の TNF  $\alpha$ 、IL1 $\beta$  の発現抑制も同等であった。一方で 10mmo/kgBW のヒポタウリン投与群でのみ、肝組織の collagen $\alpha$ 1 及び  $\alpha$ 2 の発現が有意に抑制された。

ヒトの NAFLD に類似したモデルとされる遺伝的肥満モデルマウス(ob/ob マウス)での検討も行われた。肝組織に対してメタボローム解析により、ob/ob マウスの肝組織において C57BL/6J マウスに比べ有意なヒポタウリンの低下がみられ、ヒポタウリン投与によって ob/ob マウスのインスリン抵抗性が改善した。

本研究は、NASH モデル動物である MCD 食負荷マウスのメタボローム解析を通じて、NASH 治療薬候補としてヒポタウリンを同定し、その有用性を MCD 食負荷マウス及び遺伝的肥満モデルマウスにて明らかにしたものである。本研究は従来ほとんど知られていなかったヒポタウリンの NASH 治療薬としての有用性について重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士(医学)の学位を取る資格があると認める。