

氏名 下藺 利恵子
(名黒)

非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis : NASH) は、肥満やメタボリック症候群を背景に持つ肝炎である。その病態は、肝脂肪化、肝傷害、実質の炎症、および後期における肝線維化を特徴とし、肝硬変や肝癌の発症につながる。肥満人口の増加とともに罹患率が上昇しているが、2016年2月現在、適応承認薬は存在しない。

NASHの発症や病態進行において重要な因子が Reactive oxygen species (ROS) である。例えば、肝臓に蓄積した遊離脂肪酸の β 酸化によって ROS が発生し、肝実質細胞の細胞死 (肝細胞死) を誘導する。さらに、肝細胞死を感知してマクロファージが活性化し、炎症反応が惹起される。また ROS は、線維を産生する肝星細胞 (Hepatic stellate cell : HSC) の活性化因子であり、肝臓の線維化を進展させる。

「非アルコール性脂肪性肝炎の治療に向けた、酸化ストレスに關与する創薬標的の検証」と題する本論文では、ROS が引き起こす酸化ストレスに關与する生体内分子である Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) および NF-E2-related factor 2 (Nrf2) の NASH 病態への関わりを解析し、創薬標的としての有用性を実証している。

1. ASK1 阻害による ROS 誘導性肝細胞死の抑制効果

ASK1 はストレス応答性 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の上流分子である。ROS によって活性化され、下流の MAPK を介して細胞死等の応答を引き起こすことが明らかになっている。本論文では、ROS が誘導する肝細胞死への ASK1 の関与について検討を行っている。

1.1. ASK1 の発現と酸化ストレス感受性との関連性

試験系として用いたヒト肝がん由来細胞株、HuH-7 と HepG2 において ASK1 の発現を確認した結果、発現レベルに大きな差 (HuH-7 > HepG2) を見出した。これらの細胞を用い、ROS の一種である過酸化水素 (H_2O_2) によって誘導される細胞死を検討した結果、HuH-7 に細胞死が認められる H_2O_2 処置濃度において、HepG2 には細胞死がほとんど認められなかった。また、 H_2O_2 処置による ASK1-MAPK 経路の活性化に関しては、HuH-7 において ASK1 および下流の MAPK とともに活性化の指標であるリン酸化が認められたが、ASK1 の発現が検出されない HepG2 においては MAPK のリン酸化は認められなかった。これらの結果から、細胞の ASK1 発現レベルと ROS 感受性との関連が示唆された。

1.2. ASK1 遺伝子ノックダウンによる ROS 耐性の獲得

次に、マウス肝実質細胞由来の細胞株を用い、遺伝子ノックダウン (KD) 法による検証に進めた。結果、ASK1 shRNA の導入によって ASK1 の発現が抑制された細胞は、ROS 誘導性細胞死に耐性を示すことが明らかになった。したがって、ROS が引き起こす肝細胞死において、ASK1 は主要な制御分子であることが実証された。

1.3. 生体内肝実質細胞および *in vivo* 病態モデルにおける ASK1 の機能

さらに、生体内での ASK1 の機能検証において、まず、マウスから単離した初代培養肝実質細胞に、HuH-7 と同様、ASK1 の発現、また、ROS が誘導する ASK1-MAPK 経路の活性化を確認した。さらに、NASH と同じく ROS を要因とする急性肝障害モデルであるマウスの D-galactosamine/lipopoly-saccharide (GalN/LPS) モデルにおいて、siRNA を用いた ASK1 の *in vivo* KD により、肝傷害の指標である血漿中アミノトランスフェラーゼの上昇が抑制されることを見出した。

以上より、ASK1 の阻害が ROS 誘導性の肝細胞死を抑制し、NASH における肝傷害に対して有効性を持つ可能性を示した。

2. Nrf2 活性化による NASH 病態進行抑制効果

Nrf2 は転写因子として抗酸化分子を発現誘導し、酸化ストレスを抑制する。定常状態では、Nrf2 は Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) との相互作用によりプロテアソーム分解を受けるが、酸化ストレスが発生すると Nrf2 が Keap1 と解離して安定化し、転写活性を発揮する。本論文では、まず、新規作用メカニズムを持つ Nrf2 活性化薬を着想し、化合物探索研究によって新規 Nrf2 活性化薬を見出している。さらに、Nrf2 の NASH への関与について、新規 Nrf2 活性化薬を用いた薬理的な解析を行っている。

2.1. 新規 Nrf2 活性化薬 (ビアリールウレア骨格化合物) の探索研究

薬理的な解析のツールとなる既存の Nrf2 活性化薬として、臨床開発品である Oltipraz (OPZ) がある。OPZ は Cys 残基に対する求電子作用によって Keap1 の構造変化を引き起こし、Nrf2 を解離させると言われている。しかしながら、Keap1 以外の作用標的が報告されているため、Nrf2 の機能検証ツールとして不十分であり、将来的な治療薬としても、より特異的な Nrf2 活性化薬の創製が必要であった。そこで本論文では、Keap1 上の Nrf2 結合部位に着目し、タンパク質-タンパク質間の相互作用の阻害によって Nrf2 を活性化する、新規作用メカニズムを持つ化合物の探索に取り組んでいる。

化合物スクリーニングは、*in silico* ドッキングシミュレーションと *in vitro* 活性評価との組み合わせによって約 800 万の化合物から絞り込みを行った。まず、Nrf2 ペプチドと、Keap1 の Nrf2 結合ドメイン (Keap1-Kelch) との複合体の立体構造情報を用い、ドッキングシミュレーションによって Keap1-Kelch との相互作用が推定される化合物を選定した。次に、Fluorescence resonance energy transfer (FRET) アッセイによって、Nrf2 ペプチドと Keap1-Kelch との結合に対する選定化合物の阻害活性を評価し、IC₅₀ (50% 抑制濃度) を指標に化合物を絞り込んだ。その結果、ヒット化合物 NK-1 (IC₅₀: 68.8 μM) を取得し、さらに、NK-1 の最小活性単位であるビアリールウレア骨格を持ち、より強い活性を示す NK-252 (IC₅₀: 17.0 μM) および NK-257 (IC₅₀: 0.753 μM) を合成展開によって見出した。

2.2. X 線結晶構造解析によるビアリールウレア骨格化合物の Keap1 結合様式の特定

Keap1-Kelch 単体の結晶に NK-257 の飽和溶液を添加すること (Soaking 法) で複合体結晶を得、高分解能 (2.1 Å) での X 線結晶構造解析に成功した。解析の結果、NK-257 は Keap1 上の Nrf2 結合部位に近接し、共通骨格であるビアリールウレアは、Nrf2 と共通する 5 つのアミノ酸残基と相互作用することを明らかにした。この結果は、ビアリールウレア骨格化合物が Nrf2 と Keap1 との結合を阻害する明確な根拠と考えられる。

2.3. Nrf2 活性化薬の NASH 病態モデルに対する薬効

薬理解析には優れた体内動態特性を有する NK-252 を用い、Choline-deficient L-amino acid-defined (CDAA) 食の給餌により肝臓に脂肪を蓄積させる NASH 病態モデル、CDAA 食モデルに対する薬効を検討した。CDAA 食をラットに 1 週間事前給餌した時点から、NK-252 を 9 週間経口投与し、NASH の各病態を評価した。結果、NK-252 は血漿中アミノトランスフェラーゼの上昇を抑え、肝傷害に対する抑制作用を示した。また、炎症および肝線維化に対する作用に関して病理組織学的な検討を行った。CDAA 食モデルの肝臓に多く観察される小葉辺縁部への炎症性細胞の浸潤は NK-252 の投与によって抑制され、抗炎症作用が認められた。さらに、コラーゲンおよび α-smooth muscle actin (活性化 HSC マーカー) の、CDAA 食モデルにおける強い染色は、NK-252 の投与によって顕著に低減したことから、NK-252 は HSC によるコラーゲン産生を抑制し、抗線維化作用を示すことが実証された。以上より、NK-252 は NASH に特徴的な肝傷害、炎症および肝線維化に対して薬効を発揮することが明らかになった。なお、OPZ にも同様の薬効が認められ、2 つの異なる Nrf2 活性化薬を用いた検証によって、Nrf2 の NASH 創薬標的としての信憑性が強く示唆された。

2.4. 抗線維化作用メカニズム解析～TGF-β シグナルへの影響～

NK-252 が難治性である肝線維化に著効したことから、本論文では、代表的な HSC の活性化因

子である Transforming growth factor- β (TGF- β) シグナルへの影響を想定した。肝臓中の TGF- β 遺伝子発現を解析した結果、NK-252 による発現抑制が認められた。さらに、TGF- β シグナル下流の線維化促進分子に関しても、NK-252 による肝臓中遺伝子発現の抑制が認められたことから、NK-252 による肝線維化抑制は TGF- β シグナルの制御を介している可能性が示された。

2.5. NASH 発症後に対する有効性

NK-252 が予防用途でなく、治療薬として有用であるか検証するため、CDAA 食を 6 週間事前給餌し、肝線維化が成立した状態から NK-252 を 4 週間経口投与して薬効を評価した。結果、肝傷害に対しては改善作用が、炎症や肝線維化に対してはほぼ完全な進行抑制作用が認められた。したがって、NK-252 は NASH 発症後も薬効を発揮し、NASH 治療薬としての有用性が実証された。

以上を要するに、本論文では、NASH 病態における悪性因子である ROS が引き起こす肝細胞死において、ASK1 は主要な制御因子であり、ASK1 の発現抑制によって肝傷害が軽減されることを明らかにしている。また、新規作用メカニズムとして Keap1 と Nrf2 との相互作用に対する直接的な阻害活性を持つ Nrf2 活性化薬であるピアリールウレア骨格化合物の創製に成功している。さらに、Nrf2 の活性化によって NASH 病態モデルの酸化ストレス状態が緩和され、肝傷害・炎症・線維化すべての病態が抑制されることを明らかにしている。以上より、本論文の研究コンセプトであった「ROS に着目した NASH 治療薬の創製」の妥当性と有用性が実証されたと評価できる。これまで、ROS を直接消去する外因性抗酸化剤は NASH 治療薬として開発が進められてきたが、有効性や安全性が十分でなく上市に至っていない。本論文の研究成果は、生体内分子を標的とし、生体内のメカニズムを利用して ROS の働きを抑制するという、NASH 治療薬の創製へ向けた新たなアプローチの根拠を示したものであり、よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。