

論文の内容の要旨

論文題目 胆汁酸代謝に着目した脂肪性肝疾患の
病態進行メカニズムの検討

氏名 奥新 和也

本邦ではライフスタイルの欧米化によりメタボリックシンドロームが蔓延し、それと関連性がある脂肪肝も急増している。特に非飲酒者での脂肪肝、NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)はアジアを含む世界中で増加しており、単純性脂肪肝から NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis)まで幅広い病期を包含した疾患群である。その中で NASH は進行性で、肝硬変や肝発がんといった肝病変の進行に加え、糖尿病や大血管イベントの発症にも関与が報告されている。しかしながら、その病態は未だに不明な点が多く残されている。また、予後良好な単純性脂肪肝と進行性の NASH の鑑別には侵襲的な肝生検がゴールドスタンダードとなっている。そのため NASH の非侵襲的な鑑別法や NASH 発症メカニズムの解明、そして治療法の開発は急務である。

そのような中、胆汁酸は従来考えられてきた脂肪吸収の乳化剤としての作用に加え、脂質代謝や糖質代謝を中心とした全身の代謝中枢機構への関与が示されてきている。胆汁酸は肝臓と腸管の間で非常に効率的な腸管循環を行っており、胆汁流は肝臓と腸管、そして全身の血流とを繋ぐ役割を果たしている。近年では、腸肝軸“Gut-Liver Axis”と腸内細菌叢 “gut microbiota”は肝疾患に中心的な役割を果たすことが示されてきている。また、マウスモデルにおいては腸内細菌の代謝産物である二次胆汁酸が肝発がんの誘因であることも明らかとされてきた。さらには、NASH 患者において胆汁酸濃度が肝細胞内そして血清において上昇していることが報告されている。これらの知見から胆汁酸代謝は NAFLD の病態進行に関与していることが示唆される。実際、胆汁酸代謝の中心的な役割を果たしている核内受容体 farnesoid X receptor (FXR)のリガンドは、欧米で phase II b、本邦でも phase II a まで進行するなど NAFLD の治療薬として有望視されている。

そこで、本研究では最初に NAFLD 患者での胆汁酸代謝に関わる肝内遺伝子発現の変化を解析し、その病態進行との相関を検討した。尚、本研究の臨床研究の部分は東京大学医学部倫理委員会の承認を受け（承認番号 1302、3955）、ヘルシンキ宣言に則り参加者からは文書同意を取得している。本研究の動物実験に関する部分は東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会に承認されている（承認番号 医-P15-084）。

当科で2011年11月から2014年6月の間に、既知の背景肝疾患がなく臨床的に NAFLD

を疑われ経皮的肝生検を施行した症例のうち病理学的に **Matteoni** 分類に従って **NAFLD** と診断された症例、男性 49 名、女性 29 名（年齢の中央値は男性 46.2 才、女性 62.2 才）について検討を行った。アルコール換算で男性 30 g 未満、女性 20 g 未満を 1 日飲酒量の基準とした。組織学的進行度については **The Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network** の基準に従いスコアリングし、肝脂肪化 (**steatosis**)、小葉炎症 (**lobular inflammation**)、肝細胞の風船様腫大 (**hepatocellular ballooning**) のスコアを合算した **NAFLD activity score (NAS)** で評価し、肝内の胆汁酸代謝に関連する遺伝子発現については定量的 PCR と免疫染色で評価した。

胆汁酸の核内受容体 **FXR** やその下流で作用する **small heterodimer partner(SHP)** や **liver receptor homolog 1 (LRH1)**、そして胆汁酸合成の律速酵素 **cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1)** といった胆汁酸合成に関連する因子の肝内遺伝子発現について定量的 PCR で評価した。その結果、**FXR** と **LRH1** は女性で、**SHP** は男性で **NAS** と有意な負の相関を認めた。しかしながら、律速酵素である **CYP7A1** は男女共に **NAS** との間に明らかな傾向を示さなかった。

次に、胆汁酸の毛細胆管への排出を行う **bile salt export pump (BSEP、ABCB11)** と **multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2、ABCC2)**、そして胆汁酸の細胞内への取り込みを行う **Na⁺/taurocholate cotransporter (NTCP、SLC10A1)** の肝内遺伝子発現について定量的 PCR で評価した。その結果、**BSEP** と **NTCP** の遺伝子発現は男女ともに **NAS** と有意な負の相関を示し、**MRP2** も女性で有意な負の相関を認めた。特に胆汁酸排出のメイントランスポーターである **BSEP** は **NAS** の各要素 (**steatosis**、**lobular inflammation**、**hepatocellular ballooning**) とも有意な負の相関を示していた。一方で、細胞傷害の結果とも言える肝線維化の進行度とは明らかな相関を示さなかった。そこで、タンパクレベルでの発現変化についても免疫染色で評価し、**NAS** が高い症例において **BSEP** の発現が特に脂肪化の強い領域で低下していることが確認できた。

正常の状態では、胆汁酸に活性化される **FXR** は直接的に **BSEP** や **MRP2** を活性化し、**SHP** を介して **NTCP** を抑制する。これまでに **NASH** 症例で肝細胞内の胆汁酸濃度上昇が示されている。ここから導かれることとしては、本研究での胆汁酸取り込みを行う **NTCP** の発現低下は、胆汁酸の細胞傷害から細胞を保護するという点で合目的的である。しかしながら、胆汁酸排出を司る **BSEP** や **MRP2**、特にメイントランスポーターである **BSEP** の発現低下は細胞内胆汁酸のさらなる過剰をもたらし、**NASH** での細胞傷害、**NAFLD** から **NASH** への病態進行に直接的に関与している可能性が示唆された。

そこで、野生型マウス **C57BL/6J** のオス 16 週齢を用いて生体内で **BSEP** の発現を一週間抑制するモデルを確立し、高脂肪食負荷と併せて、胆汁酸代謝そしてその上流にあるコレステロール代謝に及ぼす影響を検討した。生体内 **BSEP** 発現抑制にはげっ歯類の **Bsep** に特異的な **small interfering RNA (siRNA)** を使用し、高脂肪食としては動物性脂肪由来栄養が 14.4 % 含有される飼料を自由摂取させた。その結果、通常食摂取下では、

BSEP 発現抑制により Mrp2 の発現上昇、Cyp7a1 の発現低下が認められた。これらは BSEP 発現抑制による胆汁酸の排出障害を代償する機構が正常に作用していることを示している。コレステロール輸送については、排出を司る ATP-binding cassette sub-family G member 5・ATP-binding cassette sub-family G member 8 の発現が BSEP 発現抑制により上昇していた。しかし、コレステロールの細胞内への取り込みを行う low-density lipoprotein receptor も発現上昇していた。この変化はコレステロールから胆汁酸へと変換する経路が停滞し肝内コレステロール過剰が予想される中で奇異な変化と考えられた。

一方で、高脂肪食摂取下では、通常食摂取下と同様の変化は確認できず negative control 群と siRNA 群で Cyp7a1 を除いて明らかな変化がなかった。これは高脂肪食摂取という代謝系への負荷がかかっている状況下では、BSEP の発現低下に対する正常な代償機構が機能できなくなっている可能性を示唆している。これらの結果から高脂肪食負荷と BSEP 発現低下という両因子の合併が肝細胞内での恒常性の破綻を引き起こすことが確認できた。

近年、FXR を中心とする胆汁酸代謝関連分子を標的とした新規薬剤は開発途上にある。肝内の FXR の発現は NAFLD 患者において低下していることが報告されている。本研究で認められた女性での NAS 上昇に伴う FXR の有意な発現低下はこれらの既報にも一致し、The Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic Acid in NASH Treatment (FLINT) トライアルにて示された FXR のリガンドが NASH 患者に有用であるという知見を支持するものである。

本研究の結果に基づいて考えると、BSEP は FXR リガンドに続く、新規の NASH 治療標的と成り得る可能性が期待される。例えば、尿素サイクル異常症の治療薬である 4-phenylbutyrate (4PB) は、毛細胆管側膜の BSEP の半減期を延長し、全体での BSEP 発現を上昇することも示されている。実際に、BSEP の先天的な異常に起因する肝内胆汁うっ滞症である progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) 患者での 4PB の治療効果は既に報告されている。このような既存の薬剤をはじめ新規薬剤の創出によりその発現を回復することが、肝内胆汁酸濃度の正常化を介して NASH の発症・進行に抑制的に作用することが期待され、それは FXR リガンドとも相補的に作用できると考えられる。

本研究で示された知見は、BSEP をはじめとする胆汁酸トランスポーターが肝疾患そして全身疾患としての重要性を増している脂肪性肝疾患の直接的な病因の一つである可能性を示唆し、さらにはその新規治療標的の一選択肢と成り得ることも指し示すものであると考え、今後さらなる検討を続けていきたい。