

氏名	やまうち りょう 山内 涼		
学位の種類	博士 (医学)		
報告番号	甲第 1876 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (課程博士)		
学位論文題目	Elobixibat, an Ileal Bile Acid Transporter Inhibitor, Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis in Mice (胆汁酸トランスポーター阻害剤であるエロビキシバットは非アルコール性脂肪肝炎を改善する)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	植木 敏晴
	(副査) 福岡大学	教授	竹下 盛重
	福岡大学	准教授	今泉 聡

内容の要旨

【目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、中心性肥満、インスリン抵抗性、脂質異常症などのメタボリックシンドロームと密接に関連している。NAFLD は、軽度の脂肪蓄積から重度の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) まで様々な病理組織学的グレードがあり、NAFLD 患者の約 10% が NASH に進行し、さらに NASH 患者では 2.6%~12.8% に肝細胞癌 (HCC) が発症すると推定されている。最近の研究報告では、NASH 患者において血清胆汁酸の濃度は高値であり、この過剰な血清胆汁酸により炎症、酸化ストレス、壊死細胞死経路が活性化され、肝障害が発症すると考えられている。

胆汁酸は肝臓でコレステロールから合成され、胆汁の主要成分として分泌される。胆汁酸の 95% は、回腸胆汁酸トランスポーター (IBAT) を介して回腸で再吸収され、門脈から肝臓に送達される。2018 年、日本において IBAT 阻害薬であるエロビキシバットが慢性特発性便秘症の治療薬として承認された。このエロビキシバットは回腸での胆汁酸の再吸収を阻害し、胆汁酸の排便量を増加させ、この胆汁酸濃度の上昇により、腸管内腔への水分・電解質の分泌の促進と腸の運動性を向上させ、排便を促す薬剤である。エロビキシバットは、胆汁酸に含まれているコレステロールの再吸収を抑制することにより、血清低密度リポタンパク質 (LDL) -コレステロール濃度を低下させることが報告されている。

本研究では、血清胆汁酸を減少させることができるエロビキシバットが NASH モデルマウスの肝組織、腸管組織、腸内細菌叢、腸管タイトジャンクションを含め、どのような効果をもたらすか検討を行った。

【対象と方法】

NASH モデルマウスとして 5-6 週齢 C57BL/6N マウスにメチオニン及びコリン欠乏 (MCD) 食を 8 週間投与した。標準食を 8 週間与えた対照群と、血清 AST および血清胆汁酸そして糞便胆汁酸濃度を比較検討した。肝臓の障害の程度については NAFLD 活性スコア (NAS) を用いて病理組織学的に評価した。肝臓における TNF- α 、IL-6、TGF- β の発現についてリアルタイム PCR を用いて比較検討し、さらに腸間膜リンパ節における TNF- α 、IL-6 の発現についても検討を行った。また回腸のタイトジャンクションであるクラウディン-1 mRNA の発現、さらにタンパクレベルでの発現についてその変化を確認した。また回腸におけるクラウディン-1 の発現について免疫染色にて確認を行った。

引き続き標準食を 8 週間与えた対照群、MCD 食を 8 週間投与した NASH 群、MCD 食を 8 週間投与し、この期間の後半 4 週間にエロビキシバット (1.2mg/kg/日) を投与したエロビキシバット群の 3 群に分けて、エロビキシバットの効果について肝組織の変化、肝臓・腸間膜リンパ節のサイトカインの発現、回腸のタイトジャンクションの発現について比較検討を行った。また投与終了時に糞便を採取し、16S rRNA 遺伝子解析を用いて腸内細菌叢の変化を確認した。

統計解析は、血液検査結果、PCR、脂肪滴数については t 検定、ANOVA を用いて行い、Score の統計評価は Mann-Whitney U 検定、Kruskal-Mallis 検定を用いて行った。p 値 < 0.05 を統計学的有意と考えた。

【結果】

MCD 食を 8 週間摂取すると、NASH が誘導された。肝組織において NASH 群では進行した線維化、炎症性細胞浸潤、脂肪変性が認められたが、対照群では認められなかった。血清 AST、胆汁酸濃度ともに NASH 群では対照群に比べて有意に高かった。また、肝臓の炎症を誘導する炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 および肝線維化を促進する TGF- β mRNA 発現、腸間膜リンパ節における TNF- α および IL-6 の発現についても、対照群に比べて NASH 群では有意に高い発現を認めた。回腸における腸管タイトジャンクションタンパク質であるクラウディン-1 の発現について検討したところ、NASH 群の方が対照群よりも高かった。実際に免疫組織化学染色では、腸管上皮の細胞間空間に絨毛の萎縮とクラウディン-1 の高発現が認められた。その結果、MCD 食は NASH を誘発するだけでなく、腸管上皮にも影響を与えることが示唆された。

引き続き NASH モデルマウスにおけるエロビキシバットの効果について検討を行った。エロビキシバットの投与により NASH 群で認められていた肝組織の線維化は軽度であり、炎症性細胞はほとんど見られず、NAS および線維化スコアはエロビキシバット群で有意に

改善を認めた。また、エロビキシバットの胆汁酸再吸収抑制効果により血清胆汁酸は低下、糞便胆汁酸は高値を示していた。エロビキシバット群では NASH 群に比べて肝臓における炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 mRNA 発現が有意に抑制され、肝臓の線維化の主要な制御因子である TGF- β の発現も抑制された。またエロビキシバットの投与は、腸間膜リンパ節における TNF- α 、IL-6 の発現をも改善した。

腸管内におけるエロビキシバットの効果を評価するため腸管のクラウディン-1 の発現について検討したところ、エロビキシバット群は NASH 群と比較し、RNA レベル、タンパクレベル共に改善していることが確認された。さらにエロビキシバットの腸内微生物組成に及ぼす影響を調べたところ、NASH モデルマウスで認められていた糞便中の Lachnospiraceae および Ruminococcaeae の低下、そして Enterobacteriaceae の増加という腸内細菌叢の異常が、エロビキシバット投与により正常化していることが明らかとなった。

【結論】

エロビキシバット投与により、NASH の原因となっている高血清胆汁酸および腸内細菌を含めた環境異常が改善され、このことにより肝臓および腸間膜リンパ節における TNF- α および IL-6 などの炎症性サイトカインの発現を低下させ、その結果として肝組織の炎症や脂肪化の改善させることを明らかとした。この研究により、実臨床にて使用されているエロビキシバットは、将来的に NASH の新規治療薬として応用されることが期待される。

審査の結果の要旨

本論文は、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスに胆汁酸トランスポーター (IBAT) 阻害薬であるエロビキシバットを投与することでの肝組織、腸管組織、腸内細菌叢、腸管タイトジャンクションの変化を見た基礎研究である。正常モデル、NASH モデル、エロビキシバットモデル (NASH モデルの後半 4 週間にエロビキシバット 1.2mg/kg/day を投与) の 3 群間で血清 AST、血清胆汁酸、糞便中胆汁酸、肝組織、PCR による肝臓・腸間膜リンパ節の IL-6、TNF- α 発現、PCR・ウエスタンブロット・免疫染色による回盲部の Claudin-1 発現および腸内細菌叢変化について比較検討を行った。NASH モデルにエロビキシバットを投与することで、肝線維化ならびに小葉内炎症細胞浸潤の改善、各種炎症性サイトカインの低下、血清 AST の低下および腸内細菌叢異常の改善を認めた。エロビキシバットを用いたメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食による NASH モデルマウスの研究はこれまで初めてであり、今後の NASH 治療発展の一助となる可能性のある重要な研究であると考えられる。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

1. 斬新さ

本邦ではメタボリックシンドロームの増加に伴い、それと関連した脂肪肝、特に非飲酒者での非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) が増加している。その中でも、NASH は肝硬変や肝発癌をなどの肝臓の状態悪化をきたすことから、その病態の解明ならびに治療に対する多くの研究が行われている。

NASH 患者では、血清ならびに肝組織での胆汁酸濃度が上昇していることが報告され、胆汁酸代謝と NASH の病態進展の関与に注目が集まっている。

本論文においては、そのことに着目し本邦で初めて開発された慢性便秘症である IABT 阻害薬 (エロビキシバット) を用いた MCD 食による NASH モデルマウスによる NASH 進展抑制・改善ならびに腸内細菌叢の変化を検討しており、これまでにない斬新な研究である。

2. 重要性

NASH は進行性であり、肝硬変や肝発癌などの肝病変の悪化がある。しかし、その病態は未だに不明な点が多い。その一方で、本邦を含め世界中で患者は著増している。

そのため、NASH の進展抑制・線維化改善をきたす治療の研究は急務である。本研究はマウスモデルではあるが IBAT 阻害薬であるエロビキシバット投与により線維化の改善・小葉内炎症細胞浸潤が確認されており、NASH 治療の今後の研究の発展に寄与すると上で、非常に重要な研究である。

3. 実験方法の正確性

MCD 食餌誘発マウス NASH モデルは確立した NASH モデルマウスであり、確立されたモデルマウスを作成し、データ解析に必要な研究数を割り出し、研究を行った。また、肝組織評価における NALFD activity score (NAS)、Sirius-Red 染色も NASH の評価において広く用いられている組織評価法である。また、腸内細菌叢解析に関しても外部委託を行っており解析結果は有用性の高いものである。

以上により、実験方法の正確性は十分に担保されている。

4. 表現の明瞭性

既存の手法を用いて評価を行い、研究目的、方法と材料、結果、考察いずれも明瞭な英語表現での論文として完成された。

また、本論文は国際学術雑誌である *Hepatology International* (IF: 5.1) に原著論文として採用された。

以上により、本論文は明瞭性そして正確性を国際的に評価されていると考えられる。

5. 主な質疑応答

申請者と審査員により以下ものを含む多数の質疑応答があり、活発な討議が行われた。

Q1. 論文の Introduction では NASH モデルでは tight junction の発現を低下させて腸管透過性を亢進させ、leaky gut に至ると書かれているが Claudin-1 が発現亢進しているのはなぜか。

A1. 通常 Leaky gut では、tight junction の発現の低下により腸管透過性の亢進が生じるとされている。Claudin-3, 4 の発現低下は Leaky gut に関与するといわれる。本研究では、Claudin-3, 4 も評価したが、通常マウス、NASH モデル、治療（エロビキシバット）モデルいずれも発現に差は出なかった。

Claudin-1 は炎症に反応して発現が上昇すると報告があり、今回も炎症を反映して NASH モデルで発現上昇、治療モデルで発現低下したと考えられます。

Q2. 腸管膜リンパ節（MLN）の炎症を見ているが、MLN の炎症改善と肝臓の所見の改善は関係しているのか。

A2. MLN の炎症サイトカインはリンパ行性に全身に広がるため、全身炎症の指標にもなるため、全身炎症の改善が肝組織の炎症改善にも関与していると考えます。

Q3. 腸内細菌叢の解析で、N 数が少ないが評価としてどうなのか。

A3. 今回、腸内細菌叢の解析を外注で行ったため 1 検体のコストがかかるため、他の検査項目で平均的な結果の個体を各群 3 匹ずつ抽出し、検体提出をおこないました。しかし、個体でのばらつきもあるため、すべての個体を解析することが理想です。

Q4. 胆汁酸で肝障害がおこるということを証明した以前の研究はあるのか。

A4. 実臨床でも NASH 患者では健常人の 2～3 倍、NASH-LC 患者では健常人の 10 倍程度に血清胆汁酸が上昇することがわかっています。

Q5. エロビキシバット投与で炎症や線維化は改善しているが、脂肪化は変化がないがどうしてか。

A5. 今回の研究ではメチオニン・コリンを欠損させた餌を用いており、これは摂取により中性脂肪を無理やり肝臓に蓄積させます。エロビキシバット投与期間中もこの餌の投与を継続しているため、肝組織の脂肪化に変化がなかったと考えます。

Q6. 何匹の検体で検討を行ったのか。また、飼育期間を長くするとどうなるのか。

A6. 今回の研究は各 10 匹前後のマウスで検討を行い、最終的に各群 5 匹のマウスで検討を行いました。メチオニン・コリン乏食は、NASH モデルとして広く使用されているが体重減少をきたすなど、ヒト NASH を完全に反映しているモデルではなく、長期に飼育することで体重減少をきたし死亡に至ります。今回も、8 週より長期投与も検討しましたが、期間が長くなるほど死にいたる個体数がおおいため最終的に 8 週間の投与をモデルとしています。

Q7. NASH モデルでの絨毛萎縮はどうしておこったのか。

A7. NASH モデルでは、腸内細菌叢も大きく変化しており、MLN の炎症も増加しています。

何らかの腸炎が起こっている状態を反映して、腸管絨毛が萎縮していると考えます。

- Q8. MCD-NASH モデルは、体重減少や脂質低下の面で実際のヒト NASH と異なるが、これに対しても考察はどうか。
- A8. 今回は、従来から一般的に使用されてきた NASH モデルとして MCD-NASH モデルを用いたが、実臨床でのヒト NASH とは糖尿病合併や脂質異常といった面でことなるため、さらに、今後 high fat-high cholesterol 食や糖尿病食で作った NASH モデルでの検討が必要と考えます。しかし、エロビキシバット投与で炎症が変化するという報告は本研究が初めての報告であり、今後さらにモデルを変更して検討したいと考えます。
- Q9. 飼育前（マウス購入時）での腸内細菌叢の解析は行ったか。
- A9. 本研究では飼育開始前のマウスの腸内細菌叢は行っていない。今後の研究では、飼育前の評価も必要と考えます。
- Q10. 考察に、ヒト NASH では便中胆汁酸濃度は健常人と差がないと記載があるため、このような点もマウスとヒトでは差があるのではないかと考えます。
- A10. ご指摘の通り、本モデルでは便中胆汁酸にも変化がでているため、他のヒト NASH により近いモデルではどうであるかを検討する必要があると考えます。
- Q11. 今後はこの研究をどのように発展させていきたいか。
- A11. まずは、ヒト NASH に即したモデル (high fat-high cholesterol や糖尿病モデル) で同様の検討を行いたい。長期投与でも検討を行いたい。

本論文は、斬新さ、重要性、研究方法の正確さ、表現の明瞭性を示したうえで、上記のような質疑に対して申請者により適切な応答がなされ、審査委員での討議の結果、学位論文に値すると評価された。