

# NASH 発症におけるダイオキシン受容体 AhR の役割の解明と肝線維化治療への応用

和田 平

日本大学薬学部 健康衛生学研究室

## 【研究目的】

我が国では生活習慣病の罹患率の増加と共に、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)患者数が急増している。NASH 患者の一部は線維化の進展により、予後不良な肝硬変及び肝がんへと病態が悪化する。NASH 線維化は脂肪毒性に伴う細胞損傷、炎症などの様々な要因によって肝星細胞が活性化され、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを産生することで進行する。しかしながら、NASH 線維化機構に未解明な部分が多く、現在までに NASH 治療薬は確立されていない。

疫学研究により、ダイオキシンに対して職業及び事故曝露などが無い一般住民においても血中ダイオキシン類量と糖尿病などの代謝性疾患の発症率との間に正の相関が示されている。生体内に取り込まれたダイオキシン類は、細胞内に存在するダイオキシン受容体 AhR と結合して毒性を発現する。また近年、変性 LDL などの生体内代謝産物が AhR の内因性リガンドとして同定されていることに加え、AhR が脂質代謝制御に密接に関与することが示唆されている。申請者は予備的検討において、AhR が NASH 発症の促進因子であることを見出した。そこで本研究では、AhR による NASH 線維化メカニズムを明らかにすると共に、AhR を分子標的とした NASH 発症予防及び治療薬の開発のための分子基盤を構築する。

## 【研究結果および研究経過】

NASH 線維化は、脂肪沈着、炎症などの複合的な要因によって肝星細胞が活性化され、細胞外マトリックスを産生することで進行する。NASH 誘導食(CDAHFD)を給餌した肝細胞特異的 AhR 欠損(HKO)マウスにおける線維化抑制のメカニズムを明らかにするため、ま

ず初めに、脂肪沈着について肝臓トリグリセリド含量を測定した。HKO マウスと AhR<sup>flx/flx</sup>(Control)マウスとの間に違いは見られなかった。肝臓病理切片をヘマトキシリンエオジン染色し、組織学的に観察した。NASH 発症に伴う大滴性の脂肪沈着は、HKO マウスにおいて抑制されていた。次に、免疫担当細胞に関連した炎症及び酸化ストレスについて検討した。HKO マウスの肝臓において、ケモカインである *Mcp1*, マクロファージマーカーである F4/80, 炎症性サイトカイン *Tnfa*, の遺伝子発現量の減少及び減少傾向が見られた。NASH 線維化が抑制された HKO マウスにおいて線維化シグナルである TGF $\beta$ /SMAD 経路の関連タンパク質に関して Western blot 法により解析した結果、HKO マウスにおいて TGF $\beta$ /SMAD シグナル活性の低下していた。大滴性の脂肪沈着は、小胞体で合成されたトリグリセリドが脂肪滴として細胞質に放出され、融合及び成長を繰り返して大滴性化することで脂肪変性する。そこで、脂肪変性関連遺伝子の発現量を測定したところ、HKO マウスにおいて *Fat specific protein 27 $\beta$*  (*Fsp27 $\beta$* )の発現量の減少が認められた。そこで、AhR による *Fsp27 $\beta$* 遺伝子の発現制御機構を明らかにするため、プロモーター活性を解析した。*Fsp27 $\beta$* 遺伝子のプロモーター活性は、AhR の過剰発現及びリガンドによる活性化によって増加した。このことから、AhR による直接的な転写制御の可能性が示唆された。以上の結果より、AhR は FSP27 $\beta$ の発現調節による脂肪変性制御を介して NASH 発症及び進展に関与していることが示唆された。

肝細胞 AhR の不活性化が NASH 線維化の抑制を招くのであれば、AhR アンタゴニストは NASH 発症の予防薬として利用が可能になる。そこで、既に動物モデルで AhR アンタゴニスト作用が立証されている CH223191 を用いて、CDAHFD 誘発性の NASH 発症に対する抑制作用を検証した。CH223191 を投与したマウスの体重量及び肝臓重量は Vehicle 投与マウスと比較して違いは見られなかった。次に、NASH 発症に伴う線維化への CH223191 の作用を検討したところ、コラーゲンの蓄積、TGF $\beta$ /SMAD シグナル活性の抑制が認められた。また、CH223191 を投与したマウスにおいて、肝臓トリグリセリド含量は Vehicle 投与群とほぼ同程度であった。CH223191 投与マウスの肝臓において脂肪変性

が抑制され、さらに *Fsp27*β 遺伝子発現量の減少も認められた。これらのことから、AhR が NASH 発症抑制の新たな分子標的となりうる可能性が示された。

#### 【本研究の今後の発展性，期待される点】

本研究より、肝細胞 AhR 遺伝子の欠損マウス及びアンタゴニストによる AhR 不活性化により、NASH 発症抑制が認められたことから、肝臓 AhR が代謝性疾患発症の新たな分子標的になる可能性が示された。今後、NASH 発症マウスへの AhR アンタゴニスト処理あるいは時期特異的な AhR 遺伝子欠損を誘導させたマウスを解析することで、NASH 線維化の治療標的としての AhR の重要性を検証する。

本研究で得られた研究成果を基に立案した研究計画で、令和 4 年 一般財団法人 濱口生化学振興財団、令和 4・6 年度 公益財団法人 喫煙科学研究財団 若手研究及び令和 6 年度 科学研究費助成事業 基盤研究(C)に採択されている。また、本研究より得られる知見は、アンメットメディカルニーズ高い線維化に対する新たな分子標的の可能性を示唆するものであり、肝線維化のみならず他の線維化疾患への応用が期待できる。外部資金に関しては新たに、公益財団法人 小野医学研究助成財団、公益財団法人 細胞科学研究財団などの研究助成に申請する予定である。

#### 【本研究の外部発信予定について】

本研究成果の一部は、昨年度に既に下記に示す学会で口頭発表を行い高い評価を受けるとともに、多くの研究者と意見交換を行っている。また、本研究の進展については、日本肥満学会年会、日本分子生物学会年会、日本生化学会、日本薬学会年会及び日本大学薬学部 学術講演会において発表し、積極的に外部発信して行く予定である。現在、得られた知見をまとめ、学術論文の投稿の準備を進めている。さらに、AhR アンタゴニストによる NASH 線維化への治療効果が示されたならば、特許申請についても行う。

## 学会発表

- 1.竹島幸亮, 和田平, 榛葉繁紀 芳香族炭化水素ベンゾ[a]ピレンによる NASH 発症抑制機構の解明 第 67 回日本薬学会関東支部大会 (口頭発表)
- 2.和田平, 坂井晶紀, 竹島幸亮, 宮内俊幸, 高杉幸子, 榛葉繁紀 ダイオキシン受容体 Ah レセプターによる NASH 発症メカニズムの解明 第 44 回日本肥満学会 (口頭発表)
- 3.和田平, 竹島幸亮, 高杉幸子, 榛葉繁紀 芳香族炭化水受容体(AhR) を介した NASH の増悪化とその機序の解明 第 27 回アディポサイエンス・シンポジウム (口頭発表)