

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域消化器内科学教育研究分野 氏名 澤田 直也
<p>(論文題目)</p> <p>Beneficial effect of 4-Methylumbelliferone against bile duct ligation-induced hepatic fibrosis in rats (ラット胆管結紮肝線維化モデルにおける 4 メチルウンベリフェロンの抗線維化効果)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>背景：慢性肝障害は肝臓の線維化を促進し、肝硬変へと至らしめる。線維化の病態形成には肝星細胞が中心的役割を担っており、星細胞の活性化により細胞外マトリックスが産生される。クマリンの誘導体である 4-methylumbelliferone(4-MU)は胆道疾患の治療のためこれまで実臨床でも使用されてきた薬剤である。近年 4-MU は肝線維化の際、細胞外マトリックスに沈着する主たる物質として知られているヒアルロン酸の合成を抑制する効果があるとの報告がある。我々はラットの肝線維化に対する 4-MU の抗線維化効果について検討した。</p> <p>方法：肝線維化は胆管結紮 (bile duct ligation : BDL) を行うことによって誘発した。6 週齢のラットを開腹術のみを行った群 (sham 群、n=4)、通常の飼料を投与し BDL を行った群 (BDL 群、n=4)、1%の 4-MU を含む飼料を投与し BDL を行った群 (1% 4-MU 群、n=5)、5%の 4-MU を含む飼料を投与し BDL を行った群 (5% 4-MU 群、n=5) の 4 群に分けた。それぞれの群に合わせた飼料を 1 週間投与後に開腹術あるいは胆管結紮術を行い、3 週間後に血液および肝臓、脾臓を採取し、体重、肝臓重量、脾臓重量、血中 4-MU 濃度、血中ヒアルロン酸濃度、血中 alanine transaminase (ALT)、血中 alkaline phosphatase (ALP)、血中 total bilirubin (T.Bil)、血中 IV 型コラーゲン 7S (IV-c-7S)、肝臓の Hematoxylin and eosin (HE) 染色、Azan 染色、alpha-smooth muscle actin (α-SMA)を免疫染色と Western blotting で検討した。</p> <p>結果：通常の飼料、4-MU を含む飼料に関わらず BDL を行った群は sham 群に比較して体重が軽量であった。特に 5% 4-MU 投与群の体重は BDL を行った群の中で最も軽量であった (sham 群 : 392.7 ± 16.8 g、BDL 群 : 330.8 ± 14.3 g、1% 4-MU 群 : 334.4 ± 25.0 g、5% 4-MU 群 : 214.1 ± 9.2 g)。BDL を行った群の肝臓重量、脾臓重量は sham 群に比較して有意に増加していた。5% 4-MU 群の脾臓重量は BDL 群と比較してわずかに軽かったが統計学的には有意な差はみられなかった。</p> <p>4-MU を経口投与すると濃度依存性に血中 4-MU 濃度の上昇がみられた。(1% 4-MU 群 : 43.3 ± 8.0 ng/ml、5% 4-MU 群 : 119.0 ± 23.4 ng/ml) 逆に 4-MU 濃度が増すとともに血中のヒアルロン酸濃度は抑制された。(BDL 群 : 30.9 ± 12.1 μ g/ml、1% 4-MU 群 : 18.3 ± 3.5 μ g/ml、5% 4-MU 群 : 9.0 ± 1.9 μ g/ml)</p> <p>血中 T.Bil、ALP、ALT、IV-c-7S は BDL を行った群において sham 群よりもいずれも優位に上昇していた。5% 4-MU 投与群ではいずれの検査値も BDL 群に比較してやや低値であったが統計学的有意差は認めなかった。</p> <p>肝臓の HE 染色では BDL 群においても 4-MU 投与群においても門脈域の著明な細胆管増生や肝細胞の炎症、壊死を認めた。また線維化については Azan 染色で評価を行っ</p>	

たが、BDL 群に比較して 4-MU 投与群では小葉間の線維架橋形成が抑制されている所見がみられた。また α -SMA の免疫染色を行うことによって、portal myofibroblast と活性化星細胞による肝線維化の活動性の評価を行った。BDL 群においては門脈域を中心に小葉間領域、中心静脈周囲にかけて α -SMA 陽性の染色域がみられた。5% 4-MU 群では小葉間や中心静脈域で α -SMA 陽性の領域はやや減少している所見が観察された。しかし α -SMA の Western blotting では BDL 群と 4-MU 投与群において有意な差は認められなかった。

考察：ヒアルロン酸は肝線維化に重要な役割を果たしており、線維化が悪化すると血中ヒアルロン酸は増加する。本研究において我々はヒアルロン酸合成阻害薬である 4-MU をラットの BDL モデルに投与することで、小葉間および中心静脈域の肝線維化を抑制することを見いだした。今回、BDL ラットに 4-MU を経口投与したところ血中 4-MU 濃度の上昇がみられた。BDL モデルでは胆管を結紮後切離しているため、胆汁酸が小腸内に排出されない。4-MU は胆汁酸の有無にかかわらず生体内に取り込まれることが示唆された。また 4-MU は濃度依存性に血中ヒアルロン酸を低下させるが、BDL を行い 4-MU を投与されたラットは通常の飼料を与えられたラットより体重が軽い傾向がみられた。4-MU の器官形成や成長に与える影響については確立していないためさらなる研究が必要である。BDL モデルにおいて線維化は胆管拡張や細胆管増生に伴って門脈域からはじまるため、今回の実験でも門脈域は線維化が著明であり、小葉間や中心静脈域の方が抗線維化効果を比較するには適しているものと考えられた。血中の肝胆道系検査所見や組織学的所見では 4-MU による有意な改善は認められなかった。これは 4-MU がウルソデオキシコール酸と同様に利胆作用を有しているため、胆管結紮切離により胆道内圧上昇や肝細胞壊死をきたす BDL モデルでは害となる方向にも働いている影響も考えられた。BDL モデル自体の不均一性の問題も考えられるため、四塩化炭素等による肝細胞障害型の線維化モデルなどでの評価や、サンプリングエラーによる影響を防ぐために MRI を用いた線維化の評価などが考慮される。

結論：4-MU は BDL モデルでも経口投与で吸収され、ヒアルロン酸を抑制することで小葉間や中心静脈域の肝線維化を抑制した。4-MU は肝線維化における治療薬として活用される可能性がある。