

氏名	山田直也
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 604 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	アセトアミノフェン急性肝不全の病態解明と新規治療開発
論文審査委員	(委員長) 教授 礒田 憲夫 (委員) 教授 熊谷 秀規 講師 早川 盛禎

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

解熱鎮痛薬のアセトアミノフェン (APAP) は日常臨床で頻用される薬剤であるが、過剰摂取した場合に肝障害を引き起こし、欧米諸国では長年にわたり急性肝不全の原因で最多である。過剰摂取した APAP は肝細胞内でシトクロム P450 2E1 によって *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) へ代謝される。NAPQI は反応性が高く、グルタチオン (GSH) 存在下で無毒化されるが、GSH の低下をきたした場合に、細胞障害を引き起こす。APAP 急性肝不全の病態形成には発生初期の肝細胞死が重要と考えられているが、そのメカニズムは未だに不明瞭である。

新規細胞死であるフェロトーシスが報告され、近年、神経、腎、肺、心血管など様々な疾患への関与が報告され、注目されている。フェロトーシスは、細胞内のグルタチオンペルオキシダーゼ 4 (GPX4) が直接、もしくは GSH 低下によって間接的に阻害された場合、鉄依存的な脂質過酸化物の蓄積によってもたらされる細胞死である。フェロトーシスは特異的阻害剤である Ferrostatin-1 (Fer-1) や、鉄キレート剤、ビタミン E の主成分である  $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc) によって抑制されることが知られている。

今回、APAP 肝障害の発生に GSH 低下が起点になることから、この病態にフェロトーシスが重要な役割を果たすのではないかと仮説を立て、フェロトーシスの関与とその分子機構の解明、そして臨床応用を目的に研究を行った。

### 2 研究方法

C57BL/6 マウス、雄、8-10 週齢を用いて、16 時間の絶食後に APAP を腹腔内投与し、急性肝不全モデルを作成した。この病態モデルで肝障害 (血清 AST、ALT 値、病理学的組織障害)、及びフェロトーシスに特徴的な脂質過酸化マーカー (PTGS2 mRNA、肝組織中 MDA 量、4-HNE 染色)、肝組織中 GSH 量について、Fer-1、鉄キレート剤: Deferoxamine (DFO)、 $\alpha$ -Toc の効果を検討した。さらに、long-chain acyl-CoA synthetase-4 (ACSL4) 遺伝子欠損の影響を全身ノックアウトマウスと、ハイドロダイナミクス法によって肝特異的 ACSL4 ノックダウンマウスを作成し、検討した。また、肝組織中の脂質メディエーターと血清中の 6 種類のホスファチジルコリン過酸化物 (PCOOH) の構造異性体 (PCOOH; 9-10*E*,12*Z*-HPODE PC, 9-10*E*,12*E*-HPODE PC, 10-8*E*,12*Z*-HPODE PC, 12-9*Z*,13*E*-HPODE PC, 13-9*Z*,11*E*-HPODE PC, and 13-9*E*,11*E*-HPODE PC) を、それぞれ LC/MS、

LC/MS/MS で解析した。

### 3 研究成果

APAP 急性肝不全モデルで生じる肝障害とフェロトーシスに特徴的な脂質過酸化マーカーは、Fer-1 や DFO で顕著に抑制された。また、APAP 投与によって肝組織中 GSH 量の低下を認め、これらの薬剤でその低下は抑制された。

脂質メディエーターに着目した質量分析では、測定した 158 種類うち、n-6 系多価不飽和脂肪酸由来の 29 種類の代謝産物（うち 23 種類はアラキドン酸由来）で APAP 投与による上昇を認め、Fer-1 で抑制された。また、有意な上昇を認めたアラキドン酸由来代謝産物では、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ、シトクロム P450 のいずれの経路からの生成物も含まれており、さらにラジカル酸化によって生成する 8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  もアセトアミノフェン投与で上昇し、Fer-1 で抑制された。

APAP 肝障害と脂質過酸化は ACSL4 全身ノックアウトマウス、及び肝特異的ノックダウンマウスでは抑制された。測定した 6 種類の血清中の PCOOH 構造異性体のうち、ラジカル酸化で生じる 4 種類の構造異性体 (9-10E,12Z-HPODE PC, 9-10E,12E-HPODE PC, 13-9Z,11E-HPODE PC, and 13-9E,11E-HPODE PC) は、APAP の投与によって明瞭な増加を認め、かつ Fer-1 で抑制された。

APAP 肝障害と脂質過酸化、GSH 低下は  $\alpha$ -Toc でも抑制された。

### 4 考察

APAP 急性肝不全モデルにおける肝障害とフェロトーシスに特徴的な脂質過酸化、及び GSH 低下は、Fer-1 や鉄キレート剤で顕著に抑制され、同病態におけるフェロトーシスの関与が示された。さらに、その際の脂質過酸化は ACSL4 依存的な、アラキドン酸をはじめとする n-6 系多価不飽和脂肪酸の非特異的な脂質過酸化によってもたらされることが明らかになった。また、フェロトーシスを引き起こす脂質過酸化はラジカル酸化によって生じるか、リポキシゲナーゼによる酵素酸化によって生じるか、それぞれの病態によって異なると考えられているが、本病態では前者を支持する結果となった。一方で、フェロトーシスに至る細胞膜脂質過酸化の発生部位は未だに不明瞭であり、NAPQI は強いミトコンドリア酸化ストレスを発生し、APAP 肝障害ではミトコンドリア障害が顕著であることから、ミトコンドリア細胞膜における脂質過酸化がフェロトーシスの起点となると推察されるが、その解明にはさらなる詳細な検討が必要である。

$\alpha$ -Toc は実臨床において安全に使用可能であり、本研究では APAP 急性肝不全の予防効果が明らかになった。臨床的な予防・治療手段としての応用が期待されるが、投与方法やタイミング、投与量などの検討が必要である。

### 5 結論

アセトアミノフェン急性肝不全の病態形成にフェロトーシスが重要な役割を果たすことが生体レベルで示された。さらに、その際のフェロトーシスは ACSL4 依存的なアラキドン酸をはじめとする n-6 多価不飽和脂肪酸の非特異的なラジカル酸化によって発生することが明らかになった。フェロトーシスを標的とした治療が、アセトアミノフェン急性肝不全の予防・治療に有効であり、臨床応用への発展が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

学位論文表題：アセトアミノフェン急性肝不全の病態解明と新規治療開発

本論文ではアセトアミノフェン急性肝不全とフェロトーシスの関連について、病態モデルマウスを用いて解析を行い、生体内でのフェロトーシスの関与とその分子機構、フェロトーシス制御を標的とした臨床応用の可能性を検討したものである。実験の結果、アセトアミノフェン急性肝不全の発生初期にフェロトーシスによる肝細胞死が重要な役割を果たし、さらにそのフェロトーシスが多価不飽和脂肪酸のラジカル酸化で発生することを明らかにした。フェロトーシス阻害作用のある Ferrostatin-1 や Deferoxamine、 $\alpha$ -tocopherol がアセトアミノフェン急性肝不全の予防に有効であり、特に  $\alpha$ -tocopherol は臨床応用が期待できると報告している。

これらの内容は主要論文として Cell Death & Disease にアクセプト済みであり、日本語論文としてまとめたものが本学位論文である。その内容、結果、考察は独創的であり、十分学位に値するものと審査委員全員一致で評価された。学位論文の一部に誤字が見られたが、速やかに修正され提出された。以上のことから、本申請論文は学位論文として合格であると判定した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は学位論文「アセトアミノフェン急性肝不全の病態解明と新規治療開発」に沿った研究内容の発表を行った。アセトアミノフェン急性肝不全の発生初期にフェロトーシスによる肝細胞死が重要な役割を果たし、さらにそのフェロトーシスが多価不飽和脂肪酸のラジカル酸化で発生することを明らかにした。フェロトーシス阻害作用のある Ferrostatin-1 や Deferoxamine、 $\alpha$ -tocopherol がアセトアミノフェン急性肝不全の予防に有効であり、特に  $\alpha$ -tocopherol は臨床応用が期待できると報告した。論文内容をさらに詳細に説明するものであり、研究内容に対する理解が一層深まる発表であった。発表時間もほぼ予定通りであった。その後、各審査委員から質疑応答があり、申請者は誠意をもって適切に回答した。研究内容・成果そのものに対する問題点の指摘はなかった。最後に審査員から学位論文の誤字についての指摘があった。学位論文の誤字については審査後に速やかに修正され提出された。申請者が研究者として十分な知識と研究遂行能力を有すると評価し、審査員全員一致で最終試験に合格と判定した。