Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2010-10-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 川田, 一仁 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1933

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第５５７号	学位授与年月日	平成 22 年 3 月 9 日
氏　　名	川　田　一　仁		
論文題目	Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis （原発性胆汁性肝硬変症においてウルソデオキシコール酸は肝 Nrf2 を活性化する）		

博士（医学） 川 田 一 仁

論文題目

Enhanced hepatic Nrf2 activation after ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis

（原発性胆汁性肝硬変症においてウルソデオキシコール酸は肝 Nrf2 を活性化する）

論文の内容の要旨

［はじめに］

原発性胆汁性肝硬変症 (PBC) は慢性に経過する肝内胆汁うっ滞症であり、肝硬変、肝不全へ進行する肝特異的自己免疫性肝疾患であるが、病態形成機序の詳細は未だ不明である。現在、病態進展抑制のための第一選択薬はウルソデオキシコール酸 (UDCA) であり、特に早期 PBC において血液検査所見、肝組織所見や生存率を改善させると報告されている。しかし、UDCA が PBC の進展を抑制する機序については未だ明確にされていない。最近、UDCA の抗酸化作用について報告される一方で、PBC における肝細胞や胆管細胞の傷害に酸化ストレスが関与していることが明らかとなった。また、酸化ストレスに対する生体防御系の転写因子として、酸化ストレス応答転写因子 nuclear factor-E2-related factor-2 (NRF2) がある。酸化ストレスに侵されると NRF2 の活性化が誘導され、NRF2 の標的遺伝子群 [γ-glutamylcysteine synthetase (γGCS)、heme oxygenese 1 (HO-1)、peroxiredoxin (PRX)、glutathione peroxidase 2 (GPX2)、thioredoxin (TRX)、thioredoxin reductase 1 (TRXR1)] を統一的に転写誘導することで、酸化ストレスに対して防御能を発揮している。最近、UDCA が NRF2 を活性化させることが培養細胞や実験動物で報告されている。そこで、PBC における UDCA の抗酸化作用と NRF2 の活性化に関して検討をした。

［材料と方法］

UDCA（600 mg/日）投与前後で肝生検を施行した 13 例（男性 1 例、女性 12 例；治療期間 36 ± 4 ヵ月；Ludwig 分類 stage Ⅰ 9 例、stage Ⅱ 4 例）の早期 PBC 症例を対象として、UDCA 投与前後における血液検査所見、肝組織所見、肝組織の酸化ストレス［8-hydroxy deoxyguanosine (8OHdG) の免疫組織染色］、肝 NRF2 およびリン酸化 NRF2 の蛋白発現（ウェスタンブロット法と免疫組織染色）、肝 NRF2 標的遺伝子群の蛋白発現（ウェスタンブロット法）を比較検討した。なお、正常肝として、UDCA 投与の既往のない 4 例の転移性肝腫瘍症例の背景肝の一部を手術的に採取して用いた。また、UDCA 投与前後の血清総胆汁酸量と血清胆汁性分画を測定し比較検討した。

［結果］

UDCA 投与後、血中肝・胆道系酵素は有意に低下し、肝組織所見では小葉内壊死炎症反応の改善を認めた。

UDCA 投与前の肝細胞および胆管細胞の 8OHdG 陽性率は、正常肝と比較して有意に高く（肝細胞：UDCA 前 73% vs 正常肝 19%、$p<0.01$、胆管細胞：UDCA 前 66% vs 正常肝 11%、$p<0.01$）、UDCA 投与後、肝細胞および胆管細胞の 8OHdG 陽性率は有意に低下した（肝細胞：UDCA 前 73% vs UDCA 後 37%、$p<0.01$、胆管細胞：UDCA 前 66% vs UDCA 後 48%、$p<0.01$）。

UDCA 投与前の NRF2 とリン酸化 NRF2 の蛋白発現は、ウェスタンブロット法において、正常肝と同程度であり、UDCA 投与後、共に有意な増加を認めた($p<0.01$)。また、免疫組織染色法におい

ては、リン酸化 NRF2 を発現している胆管細胞が、UDCA 投与後、明らかに増加した（胆管細胞：UDCA 前 62% vs UDCA 後 69%、$p<0.05$）。

NRF2 の標的遺伝子群の蛋白発現では、TRX および TRXR1 において、UDCA 投与後、有意な増加を認めたが ($p<0.01$)、γGCS、HO-1、PRX、GPX2 においては、正常肝および UDCA 投与前後で変化を認めなかった。また、TRX および TRXR1 の増加率は、それぞれ NRF2 蛋白の増加率と正の相関を示した (TRX: $r=0.92$、$p<0.001$、TRXR1: $r=0.69$、$p<0.05$)。

血清総胆汁酸量と UDCA 濃度は、UDCA 投与後、有意に増加した($p<0.01$)。

［考察］

今回の検討では、早期 PBC に対する UDCA 療法が効果的であることを確認しつつ、UDCA の PBC に対する作用機序の解明として UDCA の抗酸化作用に注目した。

PBC においては、8OHdG 陽性肝細胞および胆管細胞が正常肝と比べて著明に増加していることから、すでに報告されているように肝組織における酸化ストレスの亢進が認められた。UDCA 投与後、8OHdG 陽性細胞が明らかに減少したことから、UDCA による酸化ストレスの軽減が考えられた。また、UDCA 投与後、肝細胞における NRF2 およびリン酸化 NRF2 の発現が増強したことから、UDCA による NRF2 の活性化が考えられた。さらに、NRF2 の活性化により誘導される酸化ストレス防御分子の TRX および TRXR1 の発現も、UDCA 投与後に増強したことから、TRX および TRXR1 が UDCA による抗酸化作用として働いている可能性が示唆された。

［結論］

PBC において、UDCA は、NRF2 を活性化し TRX と TRXR1 を誘導することにより、酸化ストレスを軽減し病態進展を抑制する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

原発性胆汁性肝硬変は慢性に進行する原因不明の疾患であるが、臨床的にはウルソデオキシコール酸 (UDCA) により改善する例があり、実際に第一選択薬として用いられている。一方、UDCA の生物学的影響については、試験管内での研究があり、nuclear factor-E2-related factor-2 (Nrf2)という細胞の酸化ストレスへの防御的反応の中心的役割を果たす転写制御分子が、upregulate されるという知見が知られている。

申請者は 3 年間にわたる臨床例 13 例を解析し、UDCA の効果とその作用機序について、肝生検材料を用いて以下の点を明らかにした。肝組織所見は治療の前後で、小葉内の炎症細胞浸潤の改善をみとめた。また、酸化ストレスの指標である 8-ヒドロキシグアニンの免疫組織化学的検討では、肝細胞、胆管上皮細胞いずれでもこれらの陽性率は治療により低下した。一方、Nrf2 タンパクおよびそのリン酸化タンパクはウエスタンブロットでも、胆管上皮における発現でも UDCA 投与後に増加していた。Nrf2 の標的遺伝子群では thioredoxin (TRX)、thioredoxin reductase 1 (TrxR1)、γ-glutamylcysteine、heme oxygenase-1、peroxiredoxin、glutathione peroxidase 2 について検索したうち、TRX と TrxR1 が増加し、その増加率は Nrf2 の増加率と相関していた。血清総胆汁酸量と UDCA 濃度も治療後増加していた。

申請者は酸化ストレスの反応機構が、Nrf2 という分子を中心として、実際のヒトの病気である原

発性胆汁性肝硬変とその治療機序に深く関わっていることを見いだし、さらに慢性肝疾患一般に本機序が関係する仮説を検証したことを高く評価した。

以上により、本論文は博士（医学）の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　　椙村　春彦
　　副査　　三浦　直行　　副査　　坂口　孝宣