

Title	トリテルペン化合物のC型肝炎治療薬としての有用性研究
Author(s)	葛原, 博幸
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49670">https://hdl.handle.net/11094/49670</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 【3】

氏名	葛原博幸
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第22550号
学位授与年月日	平成20年10月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	トリテルペン化合物のC型肝炎治療薬としての有用性研究
論文審査委員	(主査) 教授 山元 弘 (副査) 教授 八木 清仁 教授 松田 敏夫 教授 中川 晋作

## 論文内容の要旨

C型肝炎は、C型肝炎ウイルス(HCV)が直接的に肝細胞を障害するのではなく、感染を受けた宿主の細胞性免疫の発動により、持続的な肝細胞壊死、炎症及び再生を繰り返しながら、慢性肝炎、肝硬変及び肝細胞癌へと進展する慢性疾患である。HCV除去を目的とした原因療法における現在の第一選択薬の完治率は47.6%であり、効果が得られない患者が多く残されている。一方、HCV除去は無いものの肝細胞壊死を抑制する肝臓用剤での治療においても、病態の進展は抑制され、肝癌発症が抑止される可能性が報告されており、対症療法も重要な選択肢の一つである。以上の背景から、C型慢性肝炎において原因療法により有効性が期待できない症例の病態改善を目的とした長期連用可能な肝臓用剤が必要と考え、新規母核で経口投与可能なC型慢性肝炎治療薬の開発を目的として研究を実施した。

肝臓用剤の中で、肝細胞壊死の指標であるalanine aminotransferase (ALT)をある程度正常化できる静注剤の強力ネオミノファーゲンCの有効成分であるグリチルリチンは、トリテルペン化合物の一種である。このことに着目し、入手可能な天然のトリテルペン類からリード化合物を探索した。アフラトキシンB<sub>1</sub>(AFB)誘発in vitro細胞障害モデルで、トリテルペン化合物の細胞障害抑制作用を評価した結果、Soyasapogenol Bが最も強い抑制作用を示し、リード化合物として選択した。また、Soyasapogenol Bの誘導体をAFB誘発in vitro細胞障害モデルで評価した結果、E環22β-O-メチル体、22β-O-アセチル体、22位デオキシ体等のSoyasapogenol Bよりも強い細胞障害抑制作用を有する誘導体を得られた。

Tリンパ球活性化及びサイトカイン産生亢進を介して発症するconcanavalin A (Con A)誘発マウス肝炎モデルはC型肝炎に類似の肝障害発症機序を有するモデルであることから、Soyasapogenol B誘導体のin vivoでの肝障害改善作用をこのモデルを用いて評価した。皮下投与による評価の結果、E環22β-O-メチル体、22β-O-アセチル体、22位デオキシ体等がSoyasapogenol Bよりも強く血漿中ALT上昇を抑制した。次いで、混餌経口投与により評価し

た結果、皮下投与で高い活性を示した誘導体の中でE環22β-O-メチル体が最も強く血漿中ALT上昇を抑制した。このことから、E環22β-O-メチル体をC型肝炎治療薬の開発化合物(ME3738)として選択した。このCon A誘発マウス肝炎モデルにおいて、ME3738は皮下投与及び混餌経口投与のいずれにおいても肝細胞壊死の他の指標である aspartate aminotransferase (AST)と胆汁うっ滞の指標であるalkaline phosphatase (ALP)、total bilirubin (T-Bil)の血漿中での上昇も有意に抑制した。また、病理組織学的解析においてもME3738はCon A誘発肝炎での肝細胞壊死を改善することが確認された。

C型肝炎においては、①宿主の細胞性免疫に起因する肝細胞障害に加え、②酸化ストレス性肝細胞障害や、③胆汁うっ滞による二次的な肝細胞障害も想定されている。酸化ストレス性肝障害モデルの四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)誘発マウス肝障害モデル及びアセトアミノフェン誘発マウス肝障害モデルにおいて、ME3738は混餌経口投与で血漿中ALT上昇を有意に抑制した。CCl<sub>4</sub>誘発マウス肝障害モデルにおいては、ME3738は血漿中AST、ALP及び肝細胞壊死領域面積の上昇も有意に抑制した。また、α-naphthylisothiocyanate誘発胆汁うっ滞性マウス肝障害モデルにおいては、ME3738は経口投与で血漿中ALT、AST、ALP及びT-Bilの上昇を有意に抑制した。

C型肝炎と同様に、持続的な肝細胞壊死により肝線維化が進行し、肝硬変に至るCCl<sub>4</sub>誘発ラット肝線維化モデルを慢性肝障害モデルとして用い、ME3738の作用を検討した。その結果、ME3738は肝障害を発症させた後に混餌経口投与を実施しても血漿中ALT、AST及びALPの上昇を有意に抑制するとともに、肝線維化率を有意に減少させた。ME3738は、C型肝炎の特徴を反映する肝炎・肝障害モデルのいずれに対しても改善作用を示し、慢性肝障害モデルにおいては肝障害発症後の投与によっても肝障害改善及び肝線維化抑制作用を示したことから、C型慢性肝炎治療薬としての可能性を有すると考えられた。

このME3738のin vivoにおける作用機序に関して、C型肝炎に近似な発症機序を有するCon A誘発マウス肝炎モデルを用いて検討した。その結果、ME3738は細胞障害性サイトカインであるtumor necrosis factor-α (TNF-α)及びinterferon-γ (IFN-γ)の血漿中濃度上昇を有意に抑制したが、Tリンパ球活性化に対しては影響を示さなかった。また、ME3738は、細胞障害性サイトカイン産生に対し抑制作用を示すinterleukin-6 (IL-6)の血漿中濃度を上昇させた。更に、ME3738投与後の肝臓ではIL-6により誘導されるserum amyloid A (SAA)やα<sub>1</sub>-acid glycoprotein (AAG)等の急性期蛋白質のmRNA発現が上昇し、血漿中ではSAA濃度の上昇が見られた。これらSAAやAAGはAFB誘発in vitro細胞障害モデルで抑制作用を示し、Con A誘発マウス肝炎モデルにおいては肝障害を改善した。また、IL-6遺伝子欠損マウスにおいては、ME3738の肝障害改善作用が大きく減弱した。以上の結果から、ME3738のin vivo肝障害改善作用には①生体内で誘導するIL-6を介した細胞障害性サイトカイン産生抑制や②そのIL-6により産生される急性期蛋白質を介した細胞障害抑制が関与している可能性が推定された。また、ME3738が誘導するIL-6はin vivo肝障害改善作用に大きく寄与していることも推定された。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、C型肝炎など慢性肝炎の病態改善を目的とした長期連用可能な肝臓用剤の開発研究を進め、臨床応用可能な物質の発見に至った成果をまとめたものである。

C型慢性肝炎では、原因療法により有効性が期待できない症例の病態改善を目的とした長期連用可能な肝臓用剤が必要と考え、新規母核で経口投与可能なC型慢性肝炎治療薬の開発を目的として研究を計画した。肝臓用剤の中で、肝細胞壊死の指標である alanine aminotransferase (ALT) をある程度正常化できる静注剤のグリチルチン はトリテルペン化合物の一種である。このことに着目し、入手可能な天然のトリテルペン類からリード化合物を探索した。まずアフラトキシンB<sub>1</sub> (AFB) 誘発 in vitro細胞障害モデルで、トリテルペン化合物の細胞障害抑制作用を評価した結果、Soyasapogenol B が最も強い抑制作用を示し、リード化合物として選択した。また、Soyasapogenol B の誘導体を AFB 誘発 in vitro細胞障害モデルで評価した結果、Soyasapogenol B よりも強い細胞障害抑制作用を有するいくつかの誘導体が得られた。次いで、Tリンパ球活性化及びサイトカイン産生亢進を介して発症する concanavalin A (Con A) 誘発マウス肝炎モデルで、皮下投与による評価と混餌経口投与により評価した結果、E環22β-O-メチル体が最も強く血漿中ALT上昇を抑制することを明らかにした。

そこでE環22β-O-メチル体をC型肝炎治療薬の開発化合物 (ME3738) として選択し更なる効果を調べたところ、Con A 誘発マウス肝炎モデルにおいて、ME3738 は皮下投与及び混餌経口投与のいずれにおいても肝細胞壊死の他の指標である aspartate aminotransferase (AST) と胆汁うっ滞の指標である alkaline phosphatase (ALP)、total bilirubin (T-Bil) の血漿中での上昇も有意に抑制した。また病理組織学的解析においても、ME3738 は Con A 誘発肝炎での肝細胞壊死を改善することが確認された。C型肝炎と同様に持続的な肝細胞壊死により肝線維化が進行し、肝硬変に至るCCl<sub>4</sub>誘発ラット肝線維化モデルを慢性肝障害モデルとして用い、ME3738 の作用を検討した。その結果、ME3738 は肝障害を発症させた後に混餌経口投与を実施しても血漿中ALT、AST及びALPの上昇を有意に抑制するとともに、肝線維化率を有意に減少させた。ME3738 は、C型肝炎の特徴を反映する肝炎・肝障害モデルのいずれに対しても改善作用を示し、慢性肝障害モデルにおいては肝障害発症後の投与によっても肝障害改善及び肝線維化抑制作用を示したことから、C型慢性肝炎治療薬としての可能性を有すると考えられた。

ME3738 の in vivo における作用機序は、interleukin-6 (IL-6) の血漿中濃度を上昇させること、その結果肝臓でIL-6により誘導される serum amyloid A (SAA) や α<sub>1</sub>-acid glycoprotein (AAG) 等の急性期蛋白質が肝障害を改善することを明らかにした。またIL-6 遺伝子欠損マウスにおいては、ME3738 の肝障害改善作用が大きく減弱した。

以上、天然のトリテルペン類からリード化合物を探索し、臨床応用可能な新規化合物の開発に成功した本研究は、大阪大学博士学位(薬学)に値するものと判断した。