

博士論文要旨

氏名	山田 みのり (旧姓 三村)
学位の種類	博士 (人間科学)
学位記番号	乙第 5 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 17 日
学位授与の条件	神戸女学院大学学位規程第 5 条 2 項の規定による
学位論文題目	メタボリックシンドロームに関与するバイオマーカー測定系の確立

論文の要旨

1. はじめに

メタボリックシンドロームでは、過剰な内臓脂肪蓄積により、脂肪細胞からのアディポサイトカイン分泌異常を認め、高血圧、糖代謝異常、脂質代謝異常を引き起こしている。さらに病態の進行により、糖尿病、動脈硬化症（心筋梗塞・脳梗塞）、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）のような生活習慣病を発症する。これら生活習慣病の予防もしくは早期治療を行うために、メタボリックシンドロームでの中心となる脂肪組織と肝臓の病態を正確に把握するバイオマーカーが求められてきた。

そこで、本研究では、メタボリックシンドロームに関与するバイオマーカーとして、白色脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのTNF α とLeptin、NASHバイオマーカー候補であるフラグメント化サイトケラチン18（fCK18）の高感度測定系を確立した。

2. TNF α とLeptinの高感度測定系の開発¹⁾

内臓脂肪が蓄積された状態で、白色脂肪組織の慢性的な炎症と、その脂肪蓄積能やアディポサイトカイン分泌調節機能の破綻により、インスリン抵抗性を引き起こし、メタボリックシンドロームとなる。TNF α は、インスリン抵抗性を引き起こす最も主たるアディポサイトカインであり、白色脂肪組織あるいは浸潤したマクロファージから分泌される。レプチンは、白色脂肪組織から分泌され、肥満を抑制する代表的なアディポサイトカインとして知られている。脂肪組織の病態を正確に把握するために、まずは脂肪蓄積とこれらアディポサイトカイン分泌との関係性を明らかにしたいと考えた。

そこで、本研究では、マウス白色脂肪細胞モデル系を使い検証を進めるため、マウスアディポサイトカインに対する高感度測定の開発を試みた。サンドイッチELISAは、1次抗体としてヤギ抗マウスTNF α 抗体（あるいはヤギ抗マウスレプチン抗体）、2次抗体はウサギ抗マウスTNF α 抗体（あるいはウサギ抗マウスレプチン抗体）、3次抗体に β ガラクトシダーゼ標識抗ウサギIgG、そして基質には4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside（MUG）を用い、蛍光

強度を測定した。HRPを標識体に用いた比色検出系の感度10 ng/mLと比較して、 β ガラクトシダーゼ/MUGの蛍光検出系を用いることにより、1pg/mLまで感度を向上させることに成功した。これにより、白色脂肪細胞の形態変化とアディポサイトカインの関係性を明らかにした。

3. 白色脂肪細胞の脂肪蓄積とTNF α の産生を抑制する化合物の探索²⁾

TNF α はインスリン抵抗性の要因であり、白色脂肪細胞からのTNF α 分泌異常の抑制は、生活習慣病やその予備軍であるメタボリックシンドロームの予防につながる。そこで、脂肪蓄積モデルと高感度測定法により、白色脂肪細胞の脂肪蓄積量とTNF α の分泌量を減少させる物質の探索を行った。

脂肪細胞株(3T3-L24)は、前駆脂肪細胞3T3-L1をIBMX、デキサメタゾン、インスリンにより分化誘導し、転写因子の発現を確認した。内臓脂肪蓄積モデルは、3T3-L24にオレイン酸を添加し作製した。このモデルを使って、サプリメントを評価したところ、有機酸(酢酸、クエン酸)、カルニチン、タウリンにおいて、TG蓄積量及びTNF α 分泌量の減少が認められた。

本結果より、これらの物質がインスリン抵抗性を改善し、メタボリックシンドロームを予防する可能性が示唆された。

4. NASHバイオマーカーのfCK18高感度測定系の開発³⁾

NASHの確定診断には、肝生検による病理組織診断が用いられているが、侵襲的な検査であり診断のばらつきが問題となっており、非侵襲性のバイオマーカーによる診断法の開発が強く求められてきた。そこで、本研究では、NASH診断のバイオマーカー候補として、肝細胞のアポトーシス誘導により放出されるfCK18に注目し、新たな抗体を用いて高感度fCK18 CLEIAを確立した。

fCK18 CLEIAは、新規モノクローナル抗体とリコンビナントタンパク質を用いて構築し、全自動免疫測定装置へ適用させた。モノクローナル抗体は、rCK18または合成ペプチドをマウスへ免疫し、最終的に2種のクローン(K18-328とK18-624)を選択した。リコンビナントタンパク質は、N末端側を切断させた261-397aaを大腸菌で発現させ、アフィニティーカラムクロマトグラフィーにより精製し、スタンダードとして用いた。高感度CLEIAにより、NASH患者血清と健常者血清を測定した。

エピトープ解析の結果、K18-328はCK18の323G-340Sを認識し、CK18とfCK18の両方と反応した。K18-624はfCK18のC末端側を認識し、fCK18のみとの反応性を示した。IP-WBにて、比較対照の市販抗体は1.5 ngのrfCK18を検出したが、K18-624は約1/8の0.2 ngのrfCK18を検出し、高親和性を示した。K18-624結合磁性粒子とALP標識K18-328、そしてリコンビナントタンパク質により、高感度CLEIAを確立した。Standard Rangeは0.465-46.5 ng/mLで感度0.056 ng/mL、同時再現性及び日差再現性はCV10%以下であった。健常者血清中fCK18(平均0.483 ng/mL)と比較して、NASH患者(平均5.190 ng/mL)は有意に高値を示した。

5. fCK18高感度測定系を用いた検体中fCK18の臨床的有用性⁴⁾

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型であり、非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と NASH に分類される。NASH の病理組織像として肝細胞の ballooning が特徴的であり、これと強い相関を持ち、尚且つ NAFL と区別できるバイオマーカーの発見が期待されている。そこで、fCK18 CLEIA を用い、肝機能マーカーや肝組織との相関関係を解析し、NASH 診断バイオマーカーとしての有用性について検討した。

NAFLD 患者血清の fCK18 値は、肝逸脱酵素や NAFLD activity score (NAS) の構成要素と相関するとともに、Brunt stage ($p < 0.05$)、Matteoni 分類 ($p < 0.001$) と強い相関を示した。健常者の fCK18 値と比較して NAFLD で顕著に上昇し (AUC 0.96, $p < 0.0001$)、NAS 0-2 と NAS 3-8 (AUC 0.81, $p < 0.05$) や Matteoni type 1+2 と 3+4 の分別、すなわち NAFL と NASH の鑑別が可能であった。NAS の構成要素に fibrosis を加えた多変量解析では、ballooning のみが fCK18 値と関連する因子として抽出された。

6. 結論

生活習慣病の予防もしくは早期治療を目的として、メタボリックシンドロームに関与するバイオマーカー測定系の開発を行った。

TNF α と Leptin それぞれの高感度測定系は、マウス脂肪細胞内のアディポサイトカインの分泌量、蓄積量を測定するのに十分な感度であり、脂肪細胞のアディポサイトカインの挙動を把握し、更に、カルニチンが TNF α の産生抑制に有効であることを見いだした。

新規 K18-624 抗体は、fCK18 への高い親和性を示し、その抗体を用いた高感度 CLEIA は、全ての健常者血清中の fCK18 を測定可能な感度を有した。fCK18 値は、NASH 患者における肝機能や病理組織所見、特に hepatocyte ballooning と強い相関を示し、高い NASH 診断能を認め、肝生検に代わる診断法として大きく期待された。

【審査対象論文】

1. Mimura M, Nabeshima R, Maeda M, Shiomi N. A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of adipocytokines secreted by mouse adipocytes. *Biochemical Engineering Journal* 2009; 43(1): 58-63.
2. Shiomi N, Maeda M, Mimura M. Compounds that inhibit triglyceride accumulation and TNF α secretion in adipocytes. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 2011; 4(11): 684-691.
3. Yamada M, Eguchi A, Okuno K, Sakaguchi K, Yamaguchi T. Development of a highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for fragmented cytokeratin 18 using new antibodies. *Scientific Reports* 2021;11:18187.
4. Eguchi A, Iwasa M, Yamada M, Tamai Y et al. A new detection system for serum fragmented cytokeratin 18 as a biomarker reflecting histologic activities of human nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Communications*. 2022;00:1-13.