



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1790号
学位記番号	第1268号
氏名	小川 健人
授与年月日	令和3年3月24日
学位論文の題名	<p>Pemafibrate, a selective PPAR<math>\alpha</math> modulator, and fenofibrate suppress microglial activation through distinct PPAR<math>\alpha</math> and SIRT1-dependent pathways (選択的 PPAR<math>\alpha</math> モジュレーターであるペマフィブラートとフェノフィブラートはそれぞれ PPAR<math>\alpha</math> 依存および SIRT1 依存と異なる経路を介してマクログリア活性を抑制する)</p> <p>Biochem Biophys Res Commun. 2020; 524:385-391</p>
論文審査担当者	主査： 瀧口 修司 副査： 高橋 智, 澤本 和延

## 論文内容の要旨

**目的：**肥満の原因としての視床下部炎症が注目されている。視床下部炎症を含む神経炎症においてマイクログリアは重要な役割を担うことから、マイクログリア機能を標的とした肥満関連疾患の治療戦略の展開が期待される。肥満に関連することが多い脂質異常症の治療薬、フィブラートは、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) のアゴニストであり、抗炎症作用をも有することが知られている。フィブラート系薬剤の抗炎症作用には NAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素であるサーチュイン 1 (SIRT1) を介するシグナルの関与が示唆されている。しかし、フィブラートがマイクログリアに及ぼす作用やその機序には不明な点が多く、フィブラート系薬剤間の差異についてはほとんど知られていない。新しい脂質異常症治療薬、ペマフィブラートは、PPAR $\alpha$ をグローバルに活性化するこれまでのフィブラートとは異なり、PPAR $\alpha$ をリガンド特異的な立体構造に誘導することで選択的なコアクチベーターを動員する選択的 PPAR $\alpha$ モジュレーターであり、オフターゲット効果の少ない脂質低下作用が期待されている。一方、ペマフィブラートの抗炎症作用や機序は未解明である。本研究では、マイクログリアの活性制御における従来のフィブラートやペマフィブラートの意義とそのメカニズムを、リガンド間の差異に注目して解析した。

**方法：**マウスマイクログリア細胞株 BV-2 および MG6 を、ペマフィブラートないしフィブラートを含む他の PPAR $\alpha$ リガンドで前処理し、LPS 誘導性のサイトカイン発現を分析した。また、これら薬剤の作用を媒介すると考えられる PPAR $\alpha$ 、SIRT1 遺伝子等のノックダウンや過剰発現下において同様の検討を行った。炎症の指標としては、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等のサイトカインの mRNA 発現および NF- $\kappa$ B のリン酸化を用いた。また各セルラインでの PPAR $\alpha$ の mRNA 発現をマウス肝臓、脂肪組織、大脳皮質および視床下部組織と比較した。

**結果：**PPAR $\alpha$ リガンドであるフェノフィブラート、ペマフィブラート、オレオイルエタノールアミドおよびベザフィブラートの 4 薬剤は、いずれも BV-2 において LPS による炎症性サイトカインの遺伝子発現誘導を抑制した。フェノフィブラート、ペマフィブラートについては NF- $\kappa$ B のリン酸化の抑制も実証された。これら薬剤の抗炎症作用は MG6 においても再現された。PPAR $\alpha$ の mRNA 発現は、マウス由来の肝臓や脂肪組織より低かったが、これらマイクログリア細胞株でも検出された。ペマフィブラートの抗炎症作用は PPAR $\alpha$ ノックダウンにより減弱したのに対し、フェノフィブラートの抗炎症作用は PPAR $\alpha$ のノックダウンにより変化を示さなかった。一方、PPAR $\alpha$ 過剰発現下においては、ペマフィブラート、フェノフィブラートの抗炎症作用にはいずれも変化が認められなかった。フェノフィブラートおよびオレオイルエタノールアミドは SIRT1 発現を有意に上昇させたのに対し、ペマフィブラートは SIRT1 発現を有意に減少させた。さらに興味深いことには、SIRT1 の遺伝子ノックダウンは、フェノフィブラートによる抗炎症作用を減弱させたが、ペマフィブラートの作用には変化をもたらさなかった。以上より、フェノフィブラートは SIRT1 を介して抗炎症作用を発揮するのに対し、ペマフィブラートはより特異的な PPAR $\alpha$ 依存性の抗炎症作用を示すものと考えられた。

**結語：**PPAR $\alpha$ リガンドであるペマフィブラートとフェノフィブラートは、いずれもマイクログリアの活性化を抑制した。しかし選択的 PPAR $\alpha$ モジュレーター、ペマフィブラートは PPAR $\alpha$ 依存経路を介してマイクログリアの活性化を抑制したのに対し、従来型のフィブラートであるフェノフィブラートは SIRT1 依存経路を介してマイクログリア活性抑制作用を発揮することが示された。本研究により PPAR $\alpha$ を標的としたマイクログリアの活性制御の分子機序の一端が解明され、フィブラート薬による視床下部炎症制御への科学的基盤の確立に先鞭をつけた。

## 論文審査の結果の要旨

【背景・目的】肥満症の原因として注目される視床下部炎症においては、他の部位の神経炎症と同様、マイクログリアが重要な役割を担う。よってマイクログリア機能を標的とした肥満症の治療戦略の展開が期待される。肥満に合併することが多い高中性脂肪血症の治療薬、フィブラート薬は、ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) のアゴニストであり、抗炎症作用をも有するが、マイクログリアへの作用は十分解析されていない。最近、PPAR $\alpha$ をグローバルに活性化するこれまでのフィブラートとは異なり、PPAR $\alpha$ をリガンド特異的な立体構造に誘導する選択的 PPAR $\alpha$  モデュレーターが臨床応用され、オフターゲット効果の少ない脂質改善薬として期待されている。本研究では、マイクログリアの活性制御における従来の PPAR $\alpha$ アゴニスト (フェノフィブラート) と、選択的 PPAR $\alpha$ モデュレーター (ペマフィブラート) の作用と機序を解析した。

【方法】マウスマイクログリア細胞株 BV-2、MG6 を PPAR $\alpha$  リガンドで前処理後に LPS で刺激し、NF- $\kappa$ B のリン酸化やサイトカインの遺伝子発現を解析した。また、これら薬剤の効果を媒介すると考えられる PPAR $\alpha$ や SIRT1 の遺伝子のノックダウン・過剰発現実験を行った。

【結果】(1) 4種の PPAR $\alpha$ リガンド (フェノフィブラート[F]、ペマフィブラート[P]、オレオイルエタノールアミド、ベザフィブラート) はいずれも濃度依存的に LPS 誘導性の炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制した。(2) PPAR $\alpha$ リガンドは NF- $\kappa$ B のリン酸化を抑制した。(3) PPAR $\alpha$  mRNA 発現は、マウス肝臓・脂肪組織より低かったが、マイクログリア細胞株でも確認された。(4) PPAR $\alpha$ 遺伝子のノックダウンは、[P]の抗炎症作用を減弱させたが、[F]の作用には影響しなかった。(5) 逆に SIRT1 遺伝子のノックダウンは、[F]の抗炎症効果を減弱させたが、[P]の作用には影響しなかった。(6) [F]は SIRT1 発現を増加させたが[P]は減少させた。

【考察】古典的 PPAR $\alpha$ アゴニストと選択的 PPAR $\alpha$ モデュレーターは、いずれもマイクログリアの活性化を抑制したが、前者は主に SIRT1 を、後者は PPAR $\alpha$ を介して作用を示すと考えられた。

【結語】PPAR $\alpha$ リガンドによるマイクログリア活性制御機能とその機序の一端を明らかにし、PPAR $\alpha$ を標的とした視床下部炎症や神経炎症制御への可能性を提唱した。

【審査内容】主査の瀧口修司教授からは、①各薬剤の血液脳関門透過性について、②脂質異常症と認知症との関係についてなど計 4 項目の質問がなされ、これからの指導者としての心構えについての指導があった。第一副査の高橋智教授からは、①肥満に伴い生じる神経炎症は視床下部に局限したものか、②BV-2 や MG6 細胞は視床下部由来か、③実験における n 数の数え方やデータの SD の小ささについて、④LPS 刺激後の薬剤添加実験の実施有無、など計 12 項目の質問があった。第二副査の澤本和延教授からは、①PPAR $\alpha$ 作用の分子機序について、②脳内を構成する細胞とその中でのマイクログリアの基本的働きについて、③RT-PCR の原理について、④これら薬剤を抗肥満薬として開発するためのこれからの道筋と展望についてなど、計7項目の質問がなされた。

これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、PPAR $\alpha$ リガンドによるマイクログリアの活性制御の分子機序の一端を明らかにするものであり、PPAR $\alpha$ を標的とした視床下部炎症制御への科学的基盤の確立に資するところ大である。よって、これら新知見を理解し報告した本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 瀧口 修司 教授 副査 高橋 智 教授 澤本 和延 教授