

論文内容の要旨

獣医学 専攻

平成 24 年度博士課程入学

氏 名 小島 高

指導教員名 辻本 元

論文題目：

Analysis of serum alkaline phosphatase isoenzymes and hepatic lipid accumulation in dogs with hepatobiliary diseases

(肝胆道系疾患のイヌにおける血中 ALP アイソザイムと肝脂質蓄積に関する解析)

アルカリフォスファターゼ(ALP)は全身のさまざまな臓器において発現している酵素である。犬の血中では肝臓由来の Liver ALP(LALP)、若齢犬や骨腫瘍など骨形成の盛んな個体でのみ検出される Bone ALP(BALP)、ステロイドホルモンによって誘導され犬に特異的な ALP アイソザイムである Corticosteroid-induced ALP(CALP)の 3 種類が検出される。健常な犬では LALP が全体の 90%以上を占めるが、内因性・外因性のステロイドホルモンの曝露されると CALP が支配的になる場合もある。

肝空胞変性を呈する犬の症例は高 ALP 血症の症例が多いことが知られている。肝空胞変性はグリコーゲンや脂質などの肝細胞内へ蓄積することで引き起こされると言われている。しかし犬の肝空胞変性の原因物質や ALP アイソザイムとの関係についてはこれまで十分に検討されていない。また犬の肝臓内における過剰な脂肪蓄積は、ヒトの脂肪肝のモデルとしても注目される場所であるが、その脂質蓄積の評価やその代謝関連因子の変化に関してはほとんど研究が行われていないのが現状である。

そこで本研究では犬の自然発生性肝疾患における ALP アイソザイムの変動と脂肪蓄積の病態への関与を詳細に調べる目的で一連の研究を実施した。第 1 章において肝胆道系疾患の犬の血中 ALP アイソザイムの分布と活性に関して検討を行った。また第 2 章ではさまざ

まな肝胆道系疾患の犬において実際の脂質・グリコーゲンの蓄積量と肝空胞変性の重症度、各 ALP アイソザイム活性との比較を行うとともに、脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った。第 3 章では実験犬を用いて肝臓内の脂質蓄積を誘導し、脂質蓄積と各 ALP アイソザイムの変化、および脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った。

第 1 章 肝胆道系疾患犬における ALP アイソザイムの解析

犬の血中 CALP は、副腎皮質機能亢進症の症例や実験的なグルココルチコイド投与で上昇することが報告されているが、犬の肝疾患との関連性や臨床検査としての有用性に関しては情報が乏しい。そこで、本研究ではグルココルチコイド投与歴のない肝胆道系疾患の犬における血中 ALP アイソザイム活性と全体の ALP 活性に占める割合について回顧的に調査した。健常犬 7 例とグルココルチコイド投与歴がなく、肝胆道系疾患と診断された 72 例を実験に供した。血清 ALP アイソザイムはアガロースゲル電気泳動後に ALP 染色を行い、各アイソザイム分画の活性比率を測定した。

その結果慢性肝炎や肝細胞腺腫、結節性過形成と診断された症例群では健常犬群に比べて有意に血中 CALP 活性が上昇しており、空胞性肝障害と診断された 3 症例全てで CALP 活性が総 ALP 活性の 80%以上を占めていた。しかし血中コルチゾール値を測定した結果、CALP 活性や ALP 活性全体に占める割合とは有意な関連性は認められなかった。この結果から、肝胆道系疾患の犬においてグルココルチコイド投与歴がなく、コルチゾールの基底値が明らかな上昇を認めない場合でも血中 CALP の上昇が存在することが明らかになった。このことは犬の CALP が内因性・外因性のグルココルチコイド以外の要因でも上昇しうることを示唆し、また空胞性肝障害の症例では CALP の支配的な上昇が認められたことから、グリコーゲン以外の蓄積物による空胞変性でも CALP が誘導されうることが示唆された。

第 2 章 肝胆道系疾患の犬における脂質およびグリコーゲンの蓄積と肝空胞変性の病態解析および脂質代謝関連遺伝子の発現解析

第 1 章において、空胞変性以外のさまざまな犬の肝疾患で CALP の上昇が確認された。一方過去の報告において、犬の先天性門脈体循環シャントや結節性過形成の症例の一部で肝臓内の脂質蓄積や空胞変性の存在が指摘されている。また実験的なグルココルチコイド投与により CALP 発現と肝臓内のグリコーゲン量が増加することも報告されている。しかしさまざま犬の肝胆道系疾患症例において脂質やグリコーゲン蓄積を網羅的に調査した報告はまだない。そこで本研究では肝胆道系疾患の犬において肝臓中の脂質・グリコーゲン量を定量し、空胞変性の重症度および血中 ALP アイソザイム活性との比較を前向き研究にて行った。同時に脂質代謝関連遺伝子の発現量を肝臓中脂質量と比較した。

健康犬 8 頭と肝生検を行った 58 症例において肝サンプルから凍結切片を作成し、Oil Red O 染色を行い、画像解析によって肝臓中に占める脂質の面積比を算出した。また、同時に肝サンプルから生化学的方法にてグリコーゲン量を測定した。HE 染色標本において脂質性・グリコーゲン性の空胞変性の重症度を評価した。得られたサンプルからリアルタイム PCR 法により脂質代謝関連遺伝子(SREBP1c, PPAR α , PPAR γ , ChREBP1, LPL, LFABP, DGAT1, DGAT2)の遺伝子発現量を測定した。

その結果、慢性肝炎や肝細胞癌の非腫瘍部分では健康群と比べて有意に多くの脂質が蓄積しており、その他の肝胆道系疾患の症例においても健康犬と比べて重篤な脂質蓄積が存在する症例が認められた。グリコーゲン量に関しては疾患群で有意な差は認められなかった。症例全体では HE 染色での空胞変性の重症度や ALP アイソザイム分画と脂質量・グリコーゲン量の間に有意な相関関係は認められなかった。しかし、非腫瘍性疾患において健康群よりも脂質蓄積量が過剰であった群ではより高い CALP 分画や活性を示す傾向にあった。このことからグルココルチコイドの影響以外にも、肝細胞での脂肪の過剰な蓄積が CALP 上昇の背景に存在することが示唆された。

また、脂質過剰群では脂質代謝を制御する転写因子である PPAR α , PPAR γ やその制御を受けて中性脂肪を遊離脂肪酸に分解する LPL や細胞中での脂質合成を触媒する DGAT1 などの酵素の発現が有意に上昇していた。このことから、犬の肝胆道系疾患では肝細胞への脂質の取り込みが亢進し、肝臓における脂質合成が亢進した結果、過剰な脂質蓄積が誘発されることが示唆された。PPAR γ の発現亢進はヒトやマウスでの脂肪肝においても報告されており、犬の肝臓での脂肪蓄積も他の動物種と同様の病態生理が存在することが示唆された。

第 3 章 実験犬における脂肪乳剤の投与による肝脂質蓄積の誘導に伴う血中 ALP

および肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現解析

第 2 章における肝臓内の脂質蓄積の報告はいずれも肝胆道系疾患に罹患した症例におけるものであり、脂質蓄積のみ認められた場合の ALP アイソザイム分画や肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現を検討した報告はない。そこで第 3 章では脂肪乳剤投与によって肝臓内脂肪蓄積を実験的に誘導し、その際の ALP アイソザイム分画や脂質代謝関連遺伝子発現について解析を行った。

健康実験犬 4 頭を用いて、1 日に必要なカロリー量を給餌するとともに、さらにその 50% に相当するカロリーの脂肪乳剤を 4.5 時間かけて静脈内投与し、これを 4 日間繰り返し行った。採血を実験開始前、4.5 時間後、9 時間後に行い血中肝酵素活性およびトリグリセリド、コレステロール濃度を測定した。また実験開始前、5 日目、18 日目に肝生検を行い、第 2

章と同様に肝臓中脂質の定量および HE 染色にて空胞変性の重症度を評価した。またリアルタイム PCR を用いて LALP、CALP、脂質代謝関連遺伝子の発現解析を行った。

脂肪乳剤の投与によって、5 日後には 4 頭全てで HE 標本において空胞変性の重篤化および肝細胞腫大を認め、4 頭中 2 頭で肝臓中脂質の増加を認めた。血中肝酵素に関しては脂肪乳剤の投与開始後に 4 頭全てで総 ALP 活性および各 ALP アイソザイム活性の経時的な上昇を認め、18 日目において LALP 発現の上昇が全頭で認められた。CALP 発現に関しては脂質蓄積のみられた 2 症例に関して 5 日目での上昇が認められた。脂質蓄積が確認されたのは 2 頭のみだったが、ヒトでは年齢や性別、肥満などが脂肪肝のリスクファクターとして指摘されており、今後犬における脂質蓄積に関するさまざまな因子を検証していく必要があると同時に、高脂肪食給餌による長期的な肝脂肪蓄積の誘導系を確立する必要があると考えられる。

5 日目において 4 頭で PPAR γ 遺伝子の発現が上昇していたが、他の脂質代謝関連遺伝子の明らかな発現変化は認められなかった。この結果から脂肪乳剤の投与により、犬の肝臓では転写因子 PPAR γ の活性が刺激されることが明らかになった。また脂質蓄積自体は 4 頭中 2 頭でしか認められなかったことから、PPAR γ 単独では症例で見られたような過剰な脂質蓄積を起こす脂質合成系の活性化は起きないことが示唆された。

総括

今回の一連の研究によって、犬における CALP 上昇機序について新たな知見が示された。これまで副腎皮質機能亢進症や外因性ステロイド薬の投与、そしてスコッチテリアにおける性ホルモン過剰症などが犬の CALP 上昇の原因と考えられてきた。しかし本研究の結果から、さまざま肝胆道系疾患の犬においてグルココルチコイドと関係なく血中 CALP 活性が上昇していることが第 1 章で明らかになり、第 2 章および 3 章において、その原因の少なくとも一部に肝内の脂質蓄積が関与していることが示された。

肝臓の脂肪蓄積そのものについても、従来に報告されてきた疾患よりも広範に存在することが明らかになり、とくに肝炎や肝細胞癌の症例で脂質蓄積が有意に高いことを第 2 章で明らかにした。さらに脂質蓄積例や第 3 章の脂肪乳剤投与犬で認められた PPAR γ 遺伝子の発現亢進はヒトの脂肪肝でも認められており、比較病態の観点からも興味深い知見と考えられた。肝細胞における脂肪蓄積は炎症性サイトカインの誘導などを介して、肝炎や肝細胞癌の原因になりうると報告されているため、今後は脂肪蓄積の観点から、犬の肝胆道系疾患の病態解明や新規治療法が確立される可能性があると考えられる。