

審査の結果の要旨

氏名 竹内文乃（戸籍名：頼本文乃）

非アルコール性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis : NASH）はアルコール性肝炎と類似の病態を示すが、アルコールの摂取なしで起こり、リスクファクターとしては肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常等のメタボリックシンドロームが知られている。NASH は、組織診断あるいは画像診断で脂肪肝を認め、アルコール性肝障害など他の肝疾患を除外した病態のうち、病理組織学的に脂肪変性、炎症細胞浸潤、肝細胞傷害及び線維化の特徴を示すことで診断される。このうち線維化については肝硬変や肝細胞がんという更に重篤な疾患の素因となるため、最も懸念されるが、その確定診断は侵襲性の高い肝生検に頼らざるを得ないのが現状である。そこで申請者は NASH における肝線維化に注目し、その発現機序とバイオマーカーの探索を試みた。

試験系としては、ヒト NASH 病態との類似性、実験の簡便さなどを考慮し、choline-deficient and iron-supplemented L-amino acid-defined (CDAA) diet 誘発モデルを用いた。CDAA 食はコリンが欠乏しており、コリン欠乏状態では脂肪酸の β 酸化で生じるケトン体の排泄抑制、あるいは脂肪酸運搬を担っている VLDL の産生障害が生じて肝細胞に脂肪が沈着する。CDAA 食モデルではこれまでも NASH や肝発がんに関する研究が行われているが、肝線維化を経時的に確認した報告、回復性を検討した報告はない。

Wistar 雄ラットに CDAA 食を 24 週間与え、3 日、1 週、4 週、12 週、19 週、24 週時点で血液検査及び剖検を行った (CDAA 群)。対照群にはコリンを添加した choline-sufficient and iron supplemented L-amino acid-defined (CSAA) 食を与え、同じタイミングで検査を行った (CSAA 群)。回復性の検討のため、CDAA 食を 12 週間、その後 CSAA 食に切り替えた群を設定し (回復群)、試験開始 19 週及び 24 週時点で剖検した。肝臓と血液を採材し検討を行った。

CDAA 群において、NASH の典型的な病理組織像のうち、脂肪化及び小葉性炎症は 1 週から、線維化は 4 週から認められ、線維化部分の面積は 12 週から有意に増加した。その他の病理組織像としては、肝細胞の単細胞壊死及び分裂像は 1 週以降に認められ、変異細胞巣や胆管増生は 12 週から経時的に増加した。肝逸脱酵素である AST 及び ALT は 1 週から有意に増加し、4 週でピークを示した。その後低下したものの、CSAA 群と比較すると有意に高値であった。

回復性に関して、脂肪化と小葉性炎症は 19 週時点で明らかな回復性を示したが、線維化は 19 週時点では CDAA 群と同程度で回復性は認められず、24 週時点で回復傾向を示した。AST、ALT 活性は 19 週から CSAA 群と同程度まで低下した。

肝線維化の回復性に関しては論争があり、NASH では回復しないと報告されているが、B 型/C 型肝炎、あるいは自己免疫疾患に伴う肝線維化は薬物治療で回復した事例が報告されている。ただし投与期間は 2 年以上と長い。一方、これまでの動物モデルの報告では、ヒトと比較するとはるかに迅速に回復している。申請者の CDAA 誘発モデルは、回復性が迅速でなかった点も、ヒトの病態により近いと考えられた。

以上より、申請者の試験系において、CDAA 食の摂取により典型的な NASH 病態が確認された。このモデルでの肝線維化のメカニズムを研究することは、ヒトの病態を理解する上で有用であると考えられた。

線維化のメカニズムを検討するため、種々の因子の発現を免疫組織化学的、RT-PCR あるいは Western blot により検出した。肝線維化はディッセ腔に存在する伊東細胞 (hepatic stellate cell : HSC) が種々の因子で活性化することにより引き起こされると考えられているため、まず

HSC 活性化因子の発現を検討した。CDAA 群において、HSC 活性化因子である TGF- β 、MMP-2 及び 9、TIMP-1 及び 2 のいずれも、CSAA 群と比較して有意な上昇が認められた。免疫組織化学で HSC の特染を行ったところ、CDAA 群では抗 α -SMA 染色で活性型 HSC が確認され、肝臓中 mRNA 及びタンパク発現量の有意な上昇も認められた。

回復群については、抗 α -SMA 染色では陽性像はみられず、mRNA 及びタンパクともに CDAA 群と比較し有意に低値であった。肝臓中 mRNA の発現量については、TGF- β 、MMP-2 及び 9、TIMP-1 及び 2 のいずれについても、CDAA 群と比較しての有意な減少が認められた。線維形成因子が減少していたにも関わらず、回復群 19 週時点で線維化が持続していたため、その原因を更に追究することにした。

線維化あるいは炎症を引き起こす要因として酸化ストレスが知られているため、これらの因子の関与を検討した。細胞内の低酸素を検出する Hypoxyprobe-1 の染色性を検討したところ、CDAA 群の肝臓では小葉全域に強い陽性像が認められた。低酸素状態で誘導あるいは活性化される HIF-1 α の肝臓中のタンパク発現量は、CDAA 群で CSAA 群より有意に高値であった。酸素濃度が低いと、血液供給を補うため血管が新生されることが知られているが、CDAA 群では小葉間を結ぶように CD34 陽性の新生血管が認められた。

次に細胞内の酸化ストレスを示す因子である CYP2E1 は、免疫染色で CDAA 群において小葉全域に強い陽性像が認められ、肝臓中の mRNA 及びタンパク発現量も増加していた。過酸化水素を酸素と水に変える反応を触媒するペルオキシソーム酵素であるカタラーゼ、O₂を H₂O₂に変換する酵素である SOD1 は、いずれも酸化ストレスに伴い低下することが知られているが、CDAA 群において mRNA 発現が CSAA 群より有意に低値であった。不飽和脂肪酸の過酸化アルデヒド物である 4-HNE は免疫染色で CDAA 群では炎症巣あるいはその周囲に陽性像が確認され、肝臓中のタンパク発現量でも CDAA 群での有意な発現亢進が認められた。炎症反応で産生が亢進する iNOS の肝臓中 mRNA 発現量は、CDAA 群で CSAA 群と比較し有意に高値あるいは高値の傾向があった。生体内のスーパーオキシドラジカルで生成するニトロチロシンの免疫染色では、CDAA 群では炎症巣あるいはその周囲に陽性像が確認された。

回復群の 19 週時点では、上記のうち CD34、CYP2E1、カタラーゼ、4-HNE、ニトロチロシンの免疫染色の陽性像が継続して認められ、多くの因子で回復していないという結果が得られた。

以上より、回復期間には、脂肪化及び炎症は消失していたが酸化ストレスが継続していることが認められた。その原因として、CD38 で検出される血管構築の変化が認められていることから、これに伴う低酸素の継続の可能性が高い。また、19 週時点で線維形成因子の発現は減少していたにも関わらず、組織学的には線維化に回復傾向が認められなかった。細胞外基質の沈着は障害により失われた肝実質の間を埋める役割があるが、この構造は正常の有窓類洞細胞の機能を有さない瘢痕であり、細胞間ネットワークも正常に行われないことが報告されている。これらのことから、19 週時点では線維化が進展しているわけではなく、ヒトで報告のある瘢痕あるいは治癒過程であると考えられた。また、酸化ストレスが肝線維化の病理発生及び回復性の遅延に重要な役割を担っていると考えられた。

肝線維化の確定診断は肝生検が基本である。最近では新たな血中マーカー(ヒアルロン酸等)、血中マーカーと年齢などを組み合わせた評価 (ELF テスト等)、画像診断が報告されているが、特に軽度の線維化を診断するのは難しいことが報告されている。そこで申請者は、肝線維化に対するバイオマーカーとして、mRNA 調節機能を有し、血中及び体液中で安定に存在し、かつ種により保存されている microRNA を用いた。いくつかの候補のうち、肝線維化を促進するという報告のある miR-21 に注目した。

RT-PCR 解析の結果、CDAA 群の miR-21 発現量は肝臓中では 3 日から CSAA 群と比較して有意に高値となり、血中でも 1 週から上昇が認められた。さらに、肝臓中の miR-21 が他の因子に与える影響を検討するため、miR-21 と相補配列があり抑制関係が報告されている MMP-9 と、これを

抑制する TIMP-1 の mRNA 発現量を検討した。MMP-9 と TIMP-1 は、組織リモデリング等に関して相互作用し、両者の複合体が細胞外基質の産生を促進することも報告されている。肝臓中の MMP-9 の mRNA 発現量は、摂餌 4 週から CSAA 群と比較し有意に高値となり、その後低下傾向を示したものの 24 週まで有意に高値を保っていた。肝臓中の TIMP-1 の mRNA 発現量については、摂餌 1 週から CSAA 群と比較し有意に高値であった。

回復群では、肝臓中及び血漿中 miR-21、肝臓中の MMP-9 及び TIMP-1 の mRNA いずれも CDAA 群と比較し有意に低値であり、CSAA 群と同等であった。

miRNA だけでなく mRNA を含めた線維化のカスケードを理解するため、網羅的アレイ解析を実施した。用いたサンプルは、線維化が組織学的に確認できた最初の時点である 4 週とし、CDAA 群と CSAA 群の発現量を比較した。その結果、16 の miRNA 及び 11 の mRNA が絞り込まれた。これらは ET-1 系、PDGF 系、TGF- β 系及び LPS 系の発現亢進、VEGF 系、IL-6 系及び IFN α 系の発現低下であった。

本研究において、申請者は食餌誘発ラット NASH モデルを用い、肝線維化に関して以下のことを解明した。

1. CDAA 食摂餌 1 週から脂肪化及び炎症が引き起こされ、線維化は 4 週から認められることを確認した。
2. 回復性に関する詳細な検討を行い、19 週時点（CDAA 食 12 週摂餌後、CSAA 食 7 週摂餌）で脂肪化及び炎症が回復したのに対し、線維化は 24 週時点（CDAA 食 12 週摂餌後、CSAA 食 12 週摂餌）で回復傾向を示すことを見出した。
3. 病理発現機序として、TGF- β 、TIMP-1/2 の発現亢進が HSC の活性化に関与していることが確認された。回復性の遅延は酸化ストレスの持続が原因と考えられることが新たに分かった。
4. miR-21 は血中において肝臓中と平行に変動し、線維化のバイオマーカーとして有用であると考えられた。本研究は miR-21 を組織変化と対応させて継時的に検討した初めての報告である。

本研究は、肝線維化の病理発生機序解明及び診断に有用と考える。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。