

70. 非アルコール性脂肪肝炎の発症機構の解明と医学応用

小川 佳宏

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子内分泌代謝学分野

Key words : 非アルコール性脂肪肝炎, マクロファージ, hepatic CLS, 細胞死

緒言

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はアルコール多飲歴がないにもかかわらず発症する脂肪性肝疾患の総称であり、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられている。NAFLD は組織学的に脂肪沈着と軽度の炎症を伴う単純性脂肪肝と典型的な炎症所見と線維化を呈する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に大別され、後者は高率に肝硬変や肝細胞癌を発症する重症型と考えられている。わが国の NAFLD の罹患率は成人の 10–30 % とされ、肝生検組織診断により診断される NASH は成人の 1–3 % と推定されており、今後更に増加することが予想されている。しかしながら、NASH の病勢を反映する優れたバイオマーカーがないこと、確定診断には肝生検が必須であることより、過栄養による内臓脂肪型肥満を背景として脂肪肝、NASH を経て肝硬変、肝細胞癌を発症する一連の経時変化の詳細は不明である。我々は既に、メラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) を欠損するマウス (MC4R-KO マウス) を用いて、肥満・インスリン抵抗性を背景として脂肪肝からヒト NASH に酷似した肝病理組織像を経て肝細胞癌を発症する新しい NASH モデルの開発に成功した¹⁾。最近では、NASH マウスと NASH 患者の肝臓において、細胞死に陥った肝実質細胞をマクロファージが取り囲んで処理する構造物 (hepatic CLS (hCLS)) が起点となり、炎症の慢性化と線維化を発症する可能性を提唱した²⁾。本研究は、我々が独自に開発した新しい NASH モデルを用いて NASH の発症機構の解明と早期発見・発症前診断のためのバイオマーカーと新しい治療戦略の開発を目指すものである。

方法、結果および考察

1. NASH モデルを用いた薬効評価

代表的な *n-3* 系多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸 (EPA) は、高脂血症治療薬として既に臨床応用されており、脂肪肝改善作用を有することが知られているが、NASH に対する治療効果は不明である。高脂肪食に EPA (EPA 群) またはパルミチン酸 (対照群) を 5 % (wt/wt) 混和した飼料を MC4R-KO マウスに投与し、24 週間観察した。正常対照群として通常食飼育の野生型マウスを用いた。MC4R-KO マウスに対照群は野生型マウスと比較して体重、肝重量、肝中性脂肪含量が著しく増加し、肝細胞障害の指標である ALT の上昇、抗炎症性アディポサイトカインであるアディポネクチンの低下が認められた (表 1)。EPA 群は対照群と比較して、体重や脂肪組織重量に明らかな変化はなかったが、肝重量と肝中性脂肪含量の抑制、血中 ALT 値の減少、アディポネクチンの増加が認められた (表 1)。

表1. MC4R-KO マウスに対する EPA 投与時の組織重量及び血中パラメーター

	野生型マウス	MC4R-KOマウス	
	通常食	対照群	EPA群
Body weight (g)	30.3 ± 0.4	55.5 ± 1.3**	57.8 ± 1.0
Liver weight (g)	1.28 ± 0.02	5.81 ± 0.28**	3.12 ± 0.27
Liver TG content (mg/g tissue)	8.8 ± 0.8	69.8 ± 4.3**	42.3 ± 5.9 [¶]
ALT (IU/L)	47.5 ± 5.6	539.1 ± 87.2**	120.5 ± 16.8 [¶]
Adiponectin (mg/mL)	12.7 ± 1.4	7.8 ± 1.0	17.7 ± 2.0 [¶]

ALT, alanine aminotransferase. Data are expressed as the mean ± SE.

** $P < 0.01$ vs. 野生型 - 通常食; [¶] $P < 0.01$ vs. MC4R-対照群. $n = 7-10$.

統計処理は Scheffe の多重比較検定にて行った。

組織学的解析では、MC4R-KO マウスの対照群において NAFLD 活動性スコア（脂肪肝、炎症細胞浸潤、肝細胞風船様変性の各スコアの総計として算出、5以上を NASH と判断）が 7.7 ± 0.2 と増加していたが、EPA 群では 4.8 ± 0.6 に低下しており、スコア別に検討すると脂肪肝と肝細胞風船様変性が改善していた（図 1A、E、F）。線維化スコア及び線維化面積は対照群において増加し、EPA 群では有意に低下していた（図 1B、C、D）。

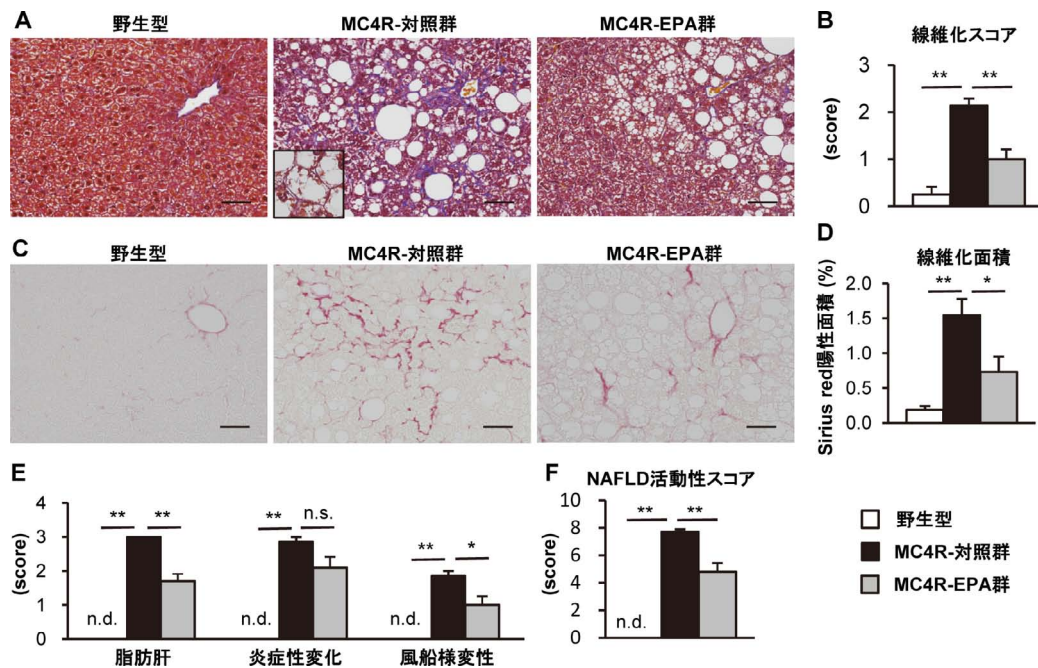


図1. NASH に対する EPA の効果

A) Masson trichrome 染色、インセットは肝細胞風船様変性。B) 線維化スコア。C) Sirius red 染色。D) 線維化面積。E、F) 各パラメーターに関するスコアリング及びその総計としての NAFLD 活動性スコア。Scale bar: 50 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n.s., not significant; n.d., not detected. 統計処理は Scheffe の多重比較検定にて行った。

F4/80 染色では、EPA 群において hCLS が有意に減少していた ($P < 0.01$, 図 2A)。TUNEL 染色において、MC4R-KO マウスの対照群では野生型マウスと比較して TUNEL 陽性細胞が増加するが、EPA 群では著しく減少しており、

細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲んで処理する組織像である hCLS の数と線維化面積、TUNEL 陽性面積には正の相関が認められた (図 2B、C、D)。

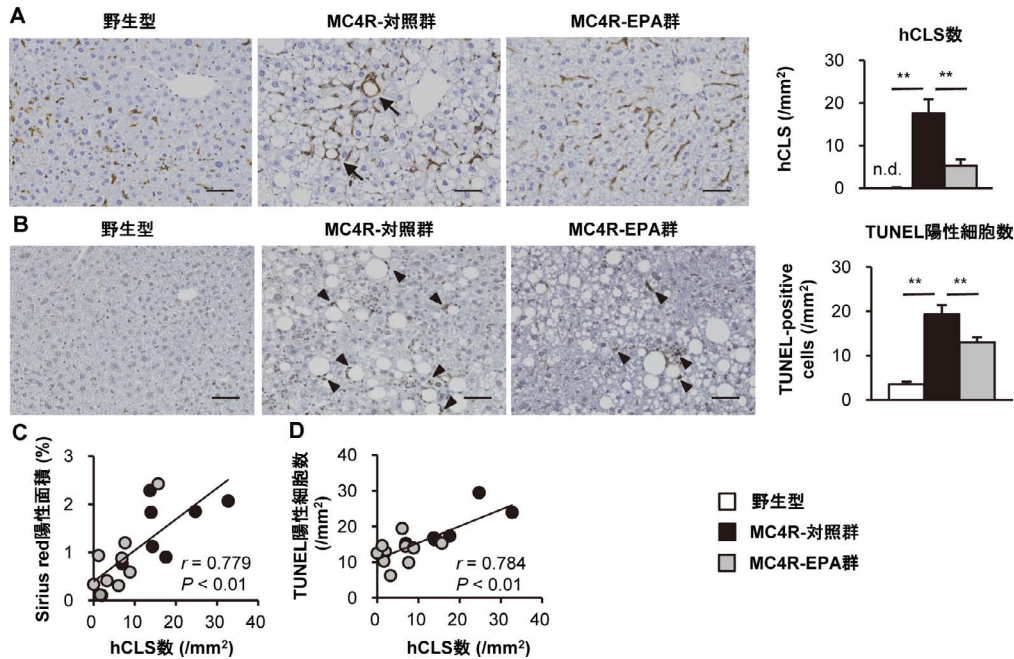


図 2. 細胞死に対する EPA の効果

A) F4/80 染色と hCLS 数。矢印：hCLS。B) TUNEL 染色と TUNEL 陽性細胞数の定量。矢頭：TUNEL 陽性細胞。hCLS 数と線維化面積 (C) 及び TUNEL 陽性細胞数 (D) の相関。Scale bar: 50 μ m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; n.d., not detected. 統計処理は Scheffe の多重比較検定にて行った。

以上のように EPA 群において TUNEL 陽性細胞数や肝細胞障害のマーカーである肝細胞風船様変性が減少し、血中 ALT 濃度が低下したことより、EPA は肝細胞障害や細胞死を抑制し、線維化の発症・進展を抑制する可能性が示唆された³⁾。従来、肥満脂肪組織におけるアディポサイトカイン産生調節の破綻は NASH をはじめとする肥満関連疾患の病態形成に深く関与することが報告されているが、EPA 投与により抗炎症作用を有するアディポネクチンが増加するため、アディポサイトカイン産生調節を介する線維化抑制が示唆された。

2. hCLS 短期モデルの確立

肝細胞死を起点として hCLS の形成から肝線維化に至る一連の過程を短期間に評価可能な短期モデルの作製を試みた。MC4R-KO マウスに高脂肪食 (WD: Western diet) を 4 週間負荷し、低用量の四塩化炭素 (0.1 ml/kg) を腹腔内に投与して細胞死を誘導した (図 3A)。非投与群 (Veh 群) としてオリーブ油を投与したが、投与後の経時的観察において明らかな変化が認められなかったため、図にはオリーブ油投与後 7 日のデータを示した。血清 ALT は投与後 2 日には著しく上昇したが、4 日以降は Veh 群と明らかな差は認められなかった (図 3B)。HE 染色では四塩化炭素投与 2 日後に中心静脈領域に膨化した細胞が多数認められ (図 3C)、細胞骨格であるサイトケラチン 18 が陰性化しており (図 3D)、肝細胞風船様変性に合致する所見であると考えられた。投与 4 日から 7 日にかけて同領域に TUNEL 陽性細胞が増加し、7 日目には多数の hCLS の出現し、7 日から 10 日にかけて肝細胞周囲性線維化が認められた (図 3E、F、G)。

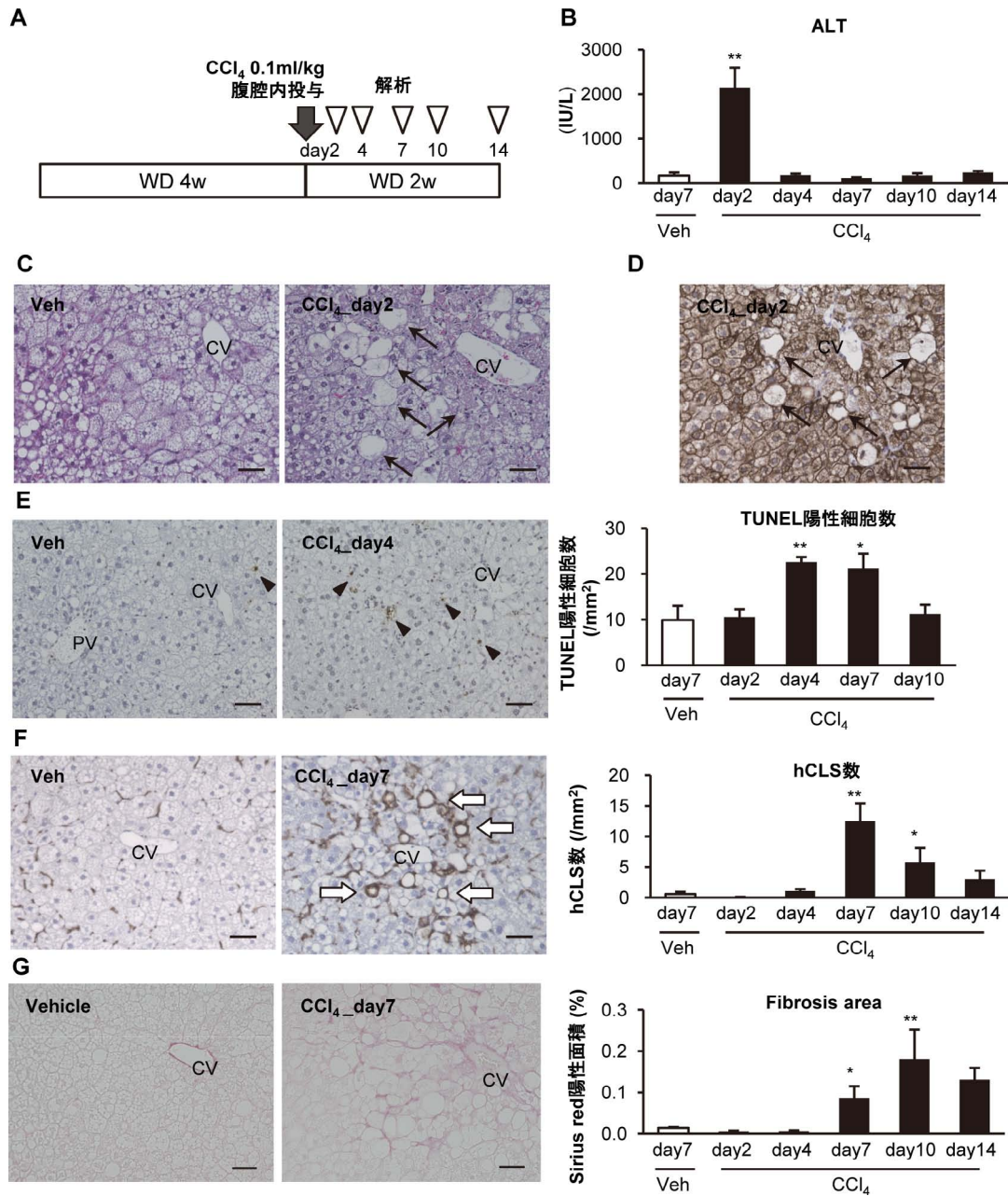


図3. 短期モデルの確立

A) 実験プロトコール：MC4R-KO マウスに対し、高脂肪食（WD: Western diet）を4週間負荷し、低用量の四塩化炭素（CCl₄）を投与後、経時的に解析した。B) CCl₄投与後の血清 ALT。C) HE 染色、矢印：肝細胞風船様変性。D) 細胞骨格であるサイトケラチン 18 の免疫染色（風船様変性を起こすと陰性化する）。E) TUNEL 染色および TUNEL 陽性面積、矢頭：TUNEL 陽性細胞。F) F4/80 染色および hCLS 数の定量、矢印（白）：hCLS。G) Sirius red 染色および Sirius red 陽性面積。Scale bar: 50 μm **P* < 0.05, ***P* < 0.01; n.d., not detected. 統計処理は Scheffe の多重比較検定にて行った。

通常食の野生型マウスや WD を4週間負荷した野生型マウスに同様の処置を行っても hCLS 形成や肝線維化は認められなかった。

本モデルでは約5週間という短期間で、肝細胞風船様変性、アポトーシス細胞の増加、hCLS の出現を経て肝線維化に至る過程が観察可能であり、NASH の病態解析や薬効評価、バイオマーカーの探索に極めて有用なモデルであると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学環境医学研究所の菅波孝祥と東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科の伊藤美智子である。

文 献

- 1) Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2011 Nov;179(5):2454-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.014. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21906580
- 2) Itoh M, Kato H, Suganami T, Konuma K, Marumoto Y, Terai S, Sakugawa H, Kanai S, Hamaguchi M, Fukaishi T, Aoe S, Akiyoshi K, Komohara Y, Takeya M, Sakaida I, Ogawa Y. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS One.* 2013 Dec 11;8(12):e82163. doi: 10.1371/journal.pone.0082163. eCollection 2013. PMID: 24349208
- 3) Konuma K, Itoh M, Suganami T, Kanai S, Nakagawa N, Sakai T, Kawano H, Hara M, Kojima S, Izumi Y, Ogawa Y. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using melanocortin 4 receptor-deficient mice. *PLoS One.* 2015 Mar 27;10(3):e0121528. doi: 10.1371/journal.pone.0121528. eCollection 2015. PMID: 25816330