

論文の内容の要旨

論文題目 NASH(非アルコール性脂肪肝炎)進展における アディポネクチンの関与

指導教官 小俣 政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月 入学

医学博士課程
内科学専攻

氏名 浅野 岳晴

【背景・目的】

近年、生活習慣病関連疾患の増加に伴い、脂肪肝や、さらに進行した疾患である NASH の病態生理への関心が一層高まっている。NASH は飲酒歴がないにも関わらずアルコール性肝障害に似た病理像を呈する疾患で、日本では成年人口の 1%弱が NASH と推計されている。ヒト NASH の一般的な自然史としては、肥満、高脂血症、耐糖能異常などを背景に、脂肪肝から肝炎、線維化、肝硬変へと進展し、一部は肝癌発症に至る進行性疾患である。NASH は肝硬変や肝癌の危険群として注目されており、メタボリック症候群の一表現型として病態や疾患メカニズムの解明が求められているも、まだ不明な点が多い。

実験的視点から NASH 病態解明のために動物モデルを用いた解析が進められており、現在、糖尿病モデルマウスや、脂肪肝を発症する遺伝子改変マウス、脂肪萎縮性モデルなどを用いた研究が行われている。しかし NASH 患者の疫学的背景や病状進行は特異的であり、その自然史を忠実に再現する動物モデルは、十分に確立されているとはいえない。

NASH の背景には、肥満や生活習慣病関連疾患が存在する事が多いが、肥満者において、body mass index (BMI) と血清アディポネクチン値とが負の相関を示し、肥満を伴う 2 型糖尿病患者や虚血性心疾患を有する内臓脂肪蓄積者においてもアディポネクチンの低下する事が報告されている。アディポネクチンはインスリン抵抗性や高脂血症及び動脈硬化の改善作用、肝においては抗炎症・抗線維化作用が報告されている。また、肥満や低アディポネクチン血症は、多くの癌と関連性が報告されており、NASH からの肝癌の発生にも、何らかの重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究では、食餌による、よりヒト NASH の病態に近い動物モデルを考え、長期間の高脂肪食負荷を試みた。長期間の高脂肪食負荷したアディポネクチン KO マウスを用いて、アディポネクチンが NASH で認められる炎症及び線維化の進展に対し、さらに NASH に関連した腫瘍形成に対して、防御的な役割を持つかの検討を行った。

【方法】

アディポネクチン KO マウスの遺伝的背景は C57B1/6 × 129/sv であり、雄のみを用いて実験を行った。アディポネクチン KO マウスに関しては、我々を含め計 4 グループが作成に成功している。他の 3 グループの KO マウスでは普通食下の耐糖能異常は認められなかったのに対し、我々の KO マウスは普通食下でもインスリン抵抗性、耐糖能異常が認められた事を以前に報告している。

マウスは生後 8 週の時点で無差別に 2 群へ分け、1 群は高脂肪食を、もう 1 群は通常の飼料を投与した。高脂肪食の組成は脂肪含量 32%、508kcal/100g、脂肪由来カロリー比 (Fat kcal%) 60% で、脂肪酸の組成としては、飽和脂肪酸 22% (パルミチン酸 12.6%、ステアリン酸 8%)、不飽和脂肪酸 77% (オレイン酸 64%、リノール酸 10%) である。これに対し、コントロール群の通常の飼料では脂肪含量 5.3%、360kcal/100g、脂肪由来カロリー比は 13% を占めている。

マウスは 24 週 (普通食 n=4, 高脂肪食負荷 n=4)、48 週 (普通食 n=4~5, 高脂肪食負荷 n=8~10) でそれぞれ sacrifice を行い、sample を採取した。眼窩静脈叢からの採血で血清 AST, ALT, TG, TC, NEFA, FBS, 血清アディポネクチンを測定し、肝組織から TG 含量を測定した。肝組織 RNA 発現は、脂質合成・酸化や炎症、線維化、酸化ストレス、細胞周期に関係する遺伝子等を Real time RT-PCR にて定量的に評価した。肝の組織学的検査では、切片を H&E 染色して中心静脈周囲を中心に炎症や線維化、腫瘍の有無を観察し、masson 染色にて 1 匹 30 ヶ所の中心静脈周囲領域を観察し線維化領域の定量的評価を行った。

【結果】

高脂肪食負荷によりマウスは肥満した。外見や体重増加に野生型 (WT) とアディポネクチン KO マウスで有意な差はなかった。血清アディポネクチン値は WT マウスの高脂肪食負荷 48 週では、24 週に比して 30% 程の減少傾向があった。血

清 AST, ALT はアディポネクチン KO マウスの高脂肪食負荷 48 週で普通食に比して有意な上昇を認めた. FBS は, WT マウス, アディポネクチン KO マウス共に, 高脂肪食負荷では普通食に比して有意に高かった. 血清 TC, NEFA は, WT マウス, アディポネクチン KO マウスともに, 高脂肪食負荷 24 週では, 普通食に比して有意な上昇を認めた.

肝組織 TG 含量は, アディポネクチン KO マウスにおいて普通食 48 週で WT マウスに比して有意に増加したが, 高脂肪食になると有意な差はなくなった.

肝組織 RNA では, より早期の 24 週において, 高脂肪食負荷アディポネクチン KO マウスは WT マウスに比して TNF- α 発現の有意な増加, procollagen α (I) 発現増加を認めた. 脂質合成系遺伝子の発現 (SREBP1c, SCD1) は, WT マウス, アディポネクチン KO マウスともに, 高脂肪食負荷で普通食に比して有意に増加していた. また細胞周期関連遺伝子 cyclin D1 は, アディポネクチン KO マウス高脂肪食負荷 48 週では, WT マウスに比して発現増加を認めた.

組織学的には, 高脂肪食負荷 48 週のアディポネクチン KO マウスで肝の脂肪沈着, 肝細胞の風船様腫大, spotty necrosis, Mallory body, 中心静脈周囲の pericellular fibrosis が見られた. 線維化は 24 週ではみられず, 高脂肪食負荷 48 週におけるアディポネクチン KO マウスの線維化面積は, WT に比して有意に増大していた (1.62% vs. 1.16%, $p=0.033$). 腫瘍に関しては, 24 週や 48 週 WT マウスでは全く見られなかったが, 高脂肪食負荷 48 週のアディポネクチン KO マウスの 1 匹に過形成性変化や腺腫 (12.5%, $n=1/8$) が認められた.

【考案】

アディポネクチン KO マウスは, 普通食で既に肝 TG 含量増加がみられ, 長期の高脂肪食により, 大滴性脂肪肝に加え肝の炎症, 中心静脈周囲の線維化を来たし, 一部に腫瘍形成した事から, ヒト NASH の自然史に近い病態を呈する動物モデルと考えられた. 現在 PPAR γ agonist などを含め, アディポネクチンの関わる代謝系の制御による NASH 治療の可能性が検討されており, この動物モデルを用いて NASH の病態解明及び治療研究が今後進んでいくと期待される.

アディポネクチン KO マウスは, 高脂肪食負荷のより早期 (24 週) から, WT マウスに比して肝 TNF- α 発現の有意な増加を認めており, アディポネクチンは, NASH 進展のより早期において, TNF- α など炎症系サイトカイン産生を抑え, 肝の炎症を抑えている可能性が考えられた. また, アディポネクチン KO マウスは, 高脂肪食負荷のより早期 (24 週) から, WT マウスに比して procollagen α (I) 発現の増加を認めており, 48 週での肝線維化面積は WT マウスに比して有意に増大していた事より, アディポネクチンが脂肪肝炎に続発する肝の線維化を抑えている可能性が示唆された.

アディポネクチン KO マウスの一部に腺腫や過形成性変化が認められた ($n=1/8$). アディポネクチン KO マウスの遺伝的背景は C57B1/6 x 129/sv であり,

C57Bl/6 マウスの肝発癌率は 1-2%/2 年, 129/sv マウスも肝腫瘍の報告はなく, 本来肝腫瘍が出来にくい系統のマウスに, アディポネクチン欠損と高脂肪食負荷の条件が加わった事によって, 腫瘍の発生が認められた. 高脂肪食負荷 WT マウスでは腫瘍は認められず, またアディポネクチン KO マウスの高脂肪食負荷 48 週では WT マウスに比して cyclin D1 発現が増加していた事から, アディポネクチン欠損は腫瘍形成にも関与する可能性が示唆された. 低アディポネクチン血症は多くの癌で危険因子とされ, 特に子宮体癌, 乳癌, 前立腺癌, 大腸癌などで強く, 肝臓癌に関しても重度肥満や糖尿病患者では強い関連が報告されており, 今後の臨床研究の蓄積が待たれる.

【結語】

アディポネクチン KO マウスは普通食で既に肝 TG 含量増加がみられ, 長期の高脂肪食負荷により, 肥満や高血糖, 高脂血症に加え, 肝の炎症, 中心静脈周囲の線維化を来し, 一部には腺腫の形成が認められた. よって, ヒト NASH の自然史に近い病態を呈する動物モデルと考えられた. この動物モデルを用いて NASH の病態解明及び治療研究が今後進んでいくと期待される.

アディポネクチンは, 炎症系サイトカイン産生抑制や, 続発する線維化を抑制することにより, NASH 進展過程のより早期において抑制に働く可能性が示唆された.

アディポネクチン欠損は肝の腫瘍形成に関与している可能性が示唆された.