

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
福面新弥	主査 教授 芝山 雄老 副査 教授 谷川 允彦 副査 教授 朝日 通雄 副査 教授 林 秀行
<p>主論文題名</p> <p>Development of fibrosis in nonalcoholic steatosis through combination of a synthetic diet rich in disaccharide and low-dose lipopolysaccharides in the livers of Zucker (fa/fa) rats</p> <p>(Zucker (fa/fa)ラットに二糖類の多い飼料と低用量のリポポリサッカライドを投与すると肝臓に非アルコール性脂肪変性ととも線維化が進行する)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD; Nonalcoholic fatty liver disease)は先進国で最も一般的な慢性肝疾患で、肝細胞内へのトリグリセリドの単なる蓄積から炎症、線維化を伴い肝硬変に至る非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH; Nonalcoholic steatohepatitis)と称される疾患までの幅広い領域を含んでいる。NASH の進展過程は未だ解明されていないが、現在「2-hits」仮説が広く支持されている。この仮説では “1st-hit” を肝細胞の脂肪変性と考え、この脂肪変性に何らかの増悪因子が “2nd-hit” として作用することで肝炎に進行するとされている。その 1 因子として門脈血中の腸管由来の lipopolysaccharide (LPS) が想定されている。この研究の目的は「2-hits」仮説に基づき、NASH の進展過程での LPS の役割を検討することである。</p> <p>《対象及び方法》</p> <p>“1st-hit” のための合成飼料の摂取及び “2nd-hit” のための LPS の投与</p> <p>1977 年に Novikoff は肥満及び糖尿病を発症する Zucker ラットに、二糖類の配合率が極端に高い飼料(カロリー換算で炭水化物の 85.7%)を摂取させ、1〜3週間で炎症性変化のない単純性脂肪肝が発現することを報告した。この研究では Novikoff の飼料に比べて二糖類の配合率を低くした合成飼料(カロリー換算で炭水化物の 17.4%)を“1st-hit”</p>	

として6週齢の雄性 Zucker ラットに12週間摂取させた。このラットは第11、12週目の2週間に“2nd-hit”としてLPSを100 $\mu$ g/kgの用量で1日1回毎日腹腔内に投与する群(合成飼料+LPS; n=3)と生理食塩水を1日1回投与する群(合成飼料+saline; n=3)に分け、またLPS自体の効果を検討するために、通常飼料を12週間摂取させ、同様にLPSを投与する群(通常飼料+LPS; n=3)を作成した。期間終了後にラットを屠殺し、血液及び肝臓を採取し、肝の組織学的、生化学的検討及び肝での線維化関連性のmRNAの発現の検討を行った。同実験過程を繰り返し、再現性を確認した。

## 《結果》

### 1) 体重及び肝臓／体重比率の変化の検討

実験期間終了後の体重及び肝臓／体重比率は、いずれも(合成飼料+LPS)群が他群より有意な増加及び高値を示した。

### 2) 耐糖能及び肝機能への影響の検討

(合成飼料+LPS)群は、血糖値、血漿インスリン値、血漿ALT値及び肝細胞内の中性脂肪濃度は、他群より有意な高値を示した。

### 3) 線維化に関連するレプチンへの影響の検討

肝線維化に関連する血漿レプチンは、(合成飼料+LPS)群が、他群より有意な高値を示した。

### 4) 生体内でのLPS濃度への影響の検討

各群の血液中のLPS濃度は、いずれも測定感度以下であった。

### 5) 組織学的な変化(HE染色、Azan染色)についての検討

i) (通常飼料+LPS)群では、明らかな脂肪変性及び線維形成は認めなかった。

ii) (合成飼料+LPS)群では、著明な脂肪変性及び炎症性細胞浸潤のない巣状壊死と軽度の線維形成を認めた。

iii) (合成飼料+saline)群では、軽度の脂肪変性は認めしたが、線維形成は認めなかった。

### 6) 肝臓内での線維化に関連するmRNAの発現についての検討

i) 線維化の中心的な役割を果たす星細胞を活性化させるTransforming growth factor (TGF)- $\beta$  1のmRNAは、(合成飼料+LPS)群で、他群より有意な高い発現を認めた。

ii) 星細胞の活性化のマーカーである $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA)のmRNAは、(合成飼料+LPS)群で、他群より有意な高い発現を認めた。

iii) type 1 collagen  $\alpha$  1のmRNAは、(合成飼料+LPS)群で、他群より有意な高い発現を認めた。

## 《考 察》

NASH を含む NAFLD の進展過程は解明されていないが、現在「2-hits」仮説が広く支持されている。この研究では“ 1st-hit”として脂肪変性を誘導するために、二糖類を多く含んだ合成飼料を Zucker ラットに摂取させ、肝炎に増悪させる“2nd-hit”として門脈血にも含まれる LPS を腹腔内に低用量で投与した。

(合成飼料+LPS)群の肝臓では炎症性細胞浸潤を伴う典型的な NASH の組織像は認めなかったが、脂肪変性に加えて巣状壊死と軽度の線維化が認められた。また同群では血漿 ALT、血漿レプチン、肝臓での中性脂肪濃度及び線維化に関連する mRNA の発現は有意に高値を示した。(通常飼料+LPS)群と(合成飼料+LPS)群の比較より、肝の脂肪変性の状態での LPS の投与は、線維化に関連する mRNA の有意な発現を示した。これらの結果から LPS が NAFLD の進展過程に関与し、特に線維化に関わっている可能性を示した。

NASH は肝硬変や肝細胞癌に進展するので、特に線維化のメカニズムを解明することは重要である。今回の結果から LPS は肝の脂肪変性の状態から肝線維化を誘導する因子である可能性が示唆され、NAFLD における線維化進展過程の研究に寄与するものと考えられた。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	福西新弥
論文審査担当者			主査教授 芝山 雄老	
			副査教授 谷川 允彦	
			副査教授 朝日 通雄	
			副査教授 林 秀行	
主論文題名				
<p>Development of fibrosis in nonalcoholic steatosis through combination of a synthetic diet rich in disaccharide and low-dose lipopolysaccharides in the livers of Zucker (fa/fa) rats</p> <p>(Zucker (fa/fa)ラットに二糖類の多い飼料と低用量のリポポリサッカライドを投与すると肝臓に非アルコール性脂肪変性ととともに線維化が進行する)</p>				
論文審査結果の要旨				
<p>非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: Nonalcoholic steatohepatitis) の発症及び進展過程のメカニズムは、未だ解明していない。</p> <p>申請者は、現在広く支持されている「2-hits」仮説に基づき、疫学的に NASH が肥満及び糖尿病患者に多いので、肥満及び糖尿病を発症する Zucker ラットをこの研究で使用した。”1st-hit”としてヒトの生活習慣を考え、緩やかに脂肪変性を発症させるために、Novikoff の二糖類の配合率が極端に高い飼料よりも二糖類の配合率を抑えた飼料を 12 週間摂取させた。”2nd-hit”として NASH の進展に関与すると考えられている門脈血に含まれる lipopolysaccharide (LPS) の投与を 2 週間行い、NASH の進展メカニズムを組織学的、生化学的検査及び肝での mRNA の発現率を測定し、検討を行っている。</p> <p>申請者は、Zucker ラットに二糖類の配合された飼料を摂取させ、LPS を投与した群で、典型的な NASH とは炎症性細胞浸潤を伴わない点で異なるが、脂肪変性に加えて巣状壊死及び軽度の肝線維化を進行させた。同群での生化学的検討では、他群と比較して NASH の進展に関連するインスリン抵抗性を認め、線維化に関連するレプチンの有意な上昇を認めている。また同群では線維化関連性サイトカインの肝での発現率も他群と比較して有意な上昇を認めている。これまでの NASH の動物実験から NASH の発現に腸内細菌叢の関与の可能性が示されているが、本研究の結果から門脈血に含まれる LPS が NASH の進展メカニズムで、特に線維化に関連している可能性が示唆された。</p>				

国内外で様々な動物及び飼料を使用して NASH の進展メカニズムは検討されているが、この研究結果は NASH の進展過程で特に線維化の進展メカニズムの解明に寄与する可能性が示唆されている。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 45: 322-328, 2009