

主論文の要旨

DSS colitis promotes tumorigenesis and fibrogenesis in a choline-deficient high-fat diet-induced NASH mouse model

〔 コリン欠乏高脂肪食による NASH マウスモデルにおいて
DSS 腸炎は腫瘍形成と線維化を促進させる 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：後藤 秀実 教授)

阿知波 宏一

【緒言】

NASH (Nonalcoholic steatohepatitis) 肝発癌モデルには主に Diethylnitrosamine や Streptozotocin によって誘発されたモデルの報告があり、今までに多くの研究で使用されている。一方、食餌性の肝脂肪化を起こすマウスモデルは、主にメチオニン・コリン欠乏食、コリン欠乏食、高脂肪食などがある。メチオニン・コリン欠乏食は体重減少が強く見られ、長期の生存ができず、コリン欠乏食は 8 週飼育では脂肪化、炎症はみられるが、線維化は起こらない。高脂肪食では 24 週飼育において体重増加がみられ、脂肪化はみられるが、炎症、線維化はほぼみられない。それぞれ NASH モデルとしては不十分な点がある。我々は、コリン欠乏食と高脂肪食を組み合わせた Choline deficiency high fat diet (CDHF) を使用し、8 週間給餌させた C57BL/6 マウスにおいて、肝に脂肪化や炎症と線維化がみられたことを報告している。また長期(50 週以上)にコリン欠乏食を給餌させると肝腫瘍形成がみられるという報告はあるが、CDHF における腫瘍形成については不明である。また腸管細菌由来の LPS (Lipopolysaccharide) が Toll-Like Receptor 4 を介して肝障害を発症し、Kupffer 細胞と肝星細胞に影響する報告がある。さらに、高脂肪食を給餌したマウスに DSS (Dextran sulfate sodium) を投与し腸炎を発症させたモデルにて、門脈中の LPS 濃度の上昇と、肝実質の炎症と線維化が確認されたという報告がある。これらのことから、本研究では、CDHF を給餌した NASH モデルマウスに対して、DSS にて腸管環境を変化させることによる、肝脂肪化、炎症、線維化の程度と、腫瘍形成の有無について検討した。

【方法】

20 週齢の C57BL/6 雄マウスに対して CDHF を給餌した。DSS 群は 1% DSS を給水に混ぜて間欠的に投与した。対照群は自由給水とした。4、12 週で解剖し、マウスの肝臓、血液、腸管、糞便を採取した。体重、肝重量、腸管長、血液生化学の測定を行った。門脈血中の LPS 濃度を測定した。肝組織において NAS (NAFLD activity score) や免疫染色にて脂肪化と炎症を、また Sirius-red 染色にて線維化を評価し、画像解析ソフトにて定量した。また、肝発癌の有無を評価した。肝組織中の脂質関連物質や、炎症因子など測定した。糞便は T-RFLP 法にて腸内細菌叢の割合を測定した。

【結果】

体重は 4 週において両群とも差はないが、12 週において DSS 群はやや低下した。肝重量・体重比は 4 週、12 週ともに DSS 群にて増加した (Table1)。

大腸において、DSS 群は対照群と比べ、4 週、12 週ともに腸管長の短縮がみられ、粘膜に有意に炎症細胞浸潤と、上皮の低層化や脱落が認められた。門脈中 LPS において、4 週にて有意な上昇が認められた。また便中の腸内細菌は 4 週の DSS 群で Bacteroides の割合の上昇がみられ、12 週においては嫌気性菌の増加と、Clostridium cluster XI の割合の上昇がみられた (Fig.1)。

血液生化学データにおいて、DSS 群は対照群と比較し、4 週、12 週ともに血中ビリ

ルビン、トランスアミラーゼの上昇を認めた。血中中性脂肪値、コレステロール値においては4週においてのみ有意な上昇がみられた (Table1)。肝脂肪化において定量化するため肝内中性脂肪、総コレステロール量を測定したが、12週においては両群に差は認められなかった。肝脂肪滴の面積も同様に12週では両群で差は認められなかったが、4週についてはいずれもDSS群で有意に増加していた (Table1)。

肝組織にてNASにおいて4週ではDSS群で有意に上昇した。12週では有意な差は認めなかったが、DSS群に炎症細胞浸潤をより多く認めた。活性化マクロファージを評価するF4/80免疫染色を施行し、画像解析にて定量すると、4週と12週いずれもDSS群にて有意な増加を認めた (Fig.2A,B,C)。Real time PCRにて炎症性サイトカインを検討したところ、4週においてはいずれもDSS群がやや上昇しており、IL-1 β において有意な差を認めた。活性化マクロファージの指標のEMR1においても有意な差がみられた (Fig.2E,F)。

肝線維化について4週において対照群では線維化は認めず、DSS群には肝細胞周囲の線維化が認められた。12週では両群とも肝細胞周囲の線維化は認めたが、DSS群により中心静脈、門脈域に有意に線維化が確認されSirius red positive areaの上昇がみられた (Fig.3A,B)。TGF β では有意な差が認められなかったが、 α SMAでは4週において有意な差がみとめられた (Fig.3C,D)。

腫瘍形成は12週のDSS群のみに認め、対照群には認められなかった。また4週では両群とも認められなかった (Fig.4A,B)。12週において酸化ストレスマーカーのiNOsがDSS群に有意に上昇した。また肝癌に促進的に働くJNK1の上昇がみられた (Fig.4C,D)。

Real time PCRにてClostridium cluster XIの発現量を調べたところDSS群において上昇していた (Fig.4 E)。

【考察】

DSS群において12週で腫瘍形成が一部にみられたが、高脂肪食のみでの腫瘍形成は明確な報告はないが、コリン欠乏食のみにおいて50週以上経過しているものに腫瘍形成がみられる報告が多く、最短の報告でも24週であった。今回の我々のモデルは食餌性のNASHを発症させ、より短期間に腫瘍形成を伴ったものであると考えられる。コリン欠乏食による発癌の機序はあきらかとなっていないが、インスリン抵抗性や酸化ストレス、ミトコンドリア機能異常を起こすとの報告があり、我々のモデルも酸化ストレスマーカーの上昇がみられた。

CDHFを給餌させるNASHモデルに、DSSによる腸炎をおこすことで肝臓に早期からより強い脂肪化や炎症、線維化がみられた。腸管からのLPSなどの流入によるKupffer細胞の活性化により、IL-1 β 上昇がみられ、肝脂肪化、炎症、線維化を誘導していることが示唆された。

12週のDSS群においてClostridium cluster XIの上昇がみられた。この結果は、腸内細菌叢の変化によって、胆汁酸の代謝に影響し、2次胆汁酸の一部が肝星細胞に

DNA 損傷を与え細胞老化が起こることによる細胞老化関連分泌現象が周囲の肝細胞の発癌を促進するとの報告と同様であった。

【結論】

食餌性 NASH モデルマウスにおいて、腸管の炎症を惹起することにより、腸内細菌叢などの変化がみられ、早期から肝における脂肪沈着、炎症、線維化が発症し、腫瘍形成が促進される可能性が示唆された。