

主論文の要旨

**Efficacy of Dietary Lipid Control in Healing  
High-Fat and High-Cholesterol Diet-Induced  
Fibrotic Steatohepatitis in Rats**

高脂肪・高コレステロール飼料により誘導された  
線維性脂肪性肝炎ラットに対する食餌性脂質コントロールの有効性

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻  
社会生命科学講座 環境労働衛生学分野

(指導：加藤 昌志 教授)

玉田 葉月

## 【緒言】

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、生活習慣の中でも特に食習慣と強く関連しているとされている。これまでに、高脂肪・高コレステロール(HFC)飼料の摂取により、脂肪肝、炎症、肝細胞の風船様腫大、重篤な線維症を発症する SHRSP5/Dmcr を開発した。本研究では、この新しいモデル動物を用いて脂質コントロールを主体とした食事介入の有効性に関して評価・分析を行った。

## 【方法】

本研究は金城学院大学動物実験委員会の承認を得て実施された。10 週齢の雄性 SHRSP5/Dmcr を 9 群に分け(n=6)、その内 3 群を対照群とし、それぞれコントロール飼料を 2、8、14 週間与えて飼育した。別の 3 群を HFC 群とし、それぞれ HFC 飼料を 2、8、14 週間与えて飼育した。残りの 3 群を食事介入群とし、一定期間 HFC 飼料を与えた後、コントロール飼料に切り替えて飼育を行った。2 週間の HFC 飼料摂取後(肝線維化は認められない)に、コントロール飼料を 6 または 12 週間与える群と、8 週間の HFC 飼料摂取後(肝線維化進展が認められる)に、コントロール飼料を 6 週間与える群を設け、改善効果を評価した(Fig 1)。体重および肝重量の測定、血液生化学検査、肝臓中脂質含量の測定、組織標本の作製と観察、定量リアルタイム PCR 法を用いた mRNA 量の測定、ウエスタンブロット法を用いたタンパク発現量の測定を行った。

## 【結果】

HFC 飼料の摂取は著しい肝腫大を招くが、食事介入はこれを改善した(Table 1)。しかし、線維化進展後の介入による改善効果は不完全であった。血中トリアシルグリセロール(TG)値は 8 週間の HFC 飼料摂取により低下したが、その後の 6 週間の食事介入により正常化した(Table 2)。血中および肝臓中の総コレステロール(TC)値は、全ての期間の HFC 群で著しく上昇した。食事介入により血中 TC 値は介入期間に関わらず完全に改善したが、肝臓中 TC 値は、線維化進展後の介入では正常化しなかった。血中アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)およびアラニンアミノ基転移酵素(ALT)値は、HFC 飼料摂取期間依存的に上昇したが、食事介入により低下した。しかし、線維化進展後の食事介入は ALT 値をコントロール群と同程度までは改善しなかった。

炎症性サイトカインであるインターロイキン(IL)-1 $\beta$ 、腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$ 、IL-6 の mRNA 量を測定した(Table 3)。IL-1 $\beta$  の mRNA 量は、HFC 飼料の摂取により増加したが、そのピークは摂取期間 2 週間の群であり、食事介入はこれを改善した。また、TNF- $\alpha$  および IL-6 の mRNA 量は HFC 飼料の摂取により著しく上昇し、食事介入はこれを改善したが、後者の発現量は線維化進展後の介入では完全には改善しなかった。

脂肪肝は HFC 飼料摂取期間依存的に重症化した。食事介入により改善した(Fig 2)。しかし、線維化進展後の介入群においては、大脂肪滴様の脂肪滴が観察された(Fig 2E)。脂質代謝因子であるジアシルグリセロールアシル基転移酵素(DGAT)-1 および-2、カ

ルニチンパルミトイル基転移酵素(CPT)-1、アシル CoA カルボキシラーゼ(ACC)のタンパク発現を定量した(Fig 3)。HFC 飼料の摂取はこれらの発現量を低下させ、脂質代謝異常を誘導したが、食事介入によりそれらはほぼ完全に正常化した。

8週間以上の HFC 飼料の摂取は非常に重篤な肝線維化を誘導し、ヒドロキシプロリン量を上昇させた(Fig 4)。線維化所見は食事介入後も残留したが、HFC 飼料の摂取を継続した群と比較した場合、線維化面積の増加は抑制された。また、HFC 飼料の摂取は $\alpha$ -平滑筋アクチン(SMA)陽性細胞を増加させたが、食事介入により減少した。加えて、HFC 飼料の摂取はトランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA、血小板由来増殖因子受容体(PDGF) $\beta$ R、 $\alpha$ 1 鎖 I 型コラーゲン(Col1 $\alpha$ 1)、細胞外基質分解酵素(MMP)-2、メタロプロテアーゼ阻害因子(TIMP)-1 の mRNA 量を増加させた(Table 3)。線維化進展以前での介入は、これらの因子の発現を低下させたが、PDGF $\beta$ R のみ正常化しなかった。また、線維化進展後の介入は、 $\alpha$ -SMA を除いて正常化しなかった。しかし、8週間の HFC 飼料摂取により著しく増強した TGF- $\beta$ 1、 $\alpha$ -SMA のタンパク発現は、食事介入により完全に正常化した。

2週間の HFC 飼料の摂取により、肝組織において CD68 陽性細胞の凝集が認められたが、食事介入によりほぼ消失した(Fig 6A-C)。8週間の HFC 飼料摂取では、より顕著な凝集が観察された(Fig 6D)。その後 6週間の食事介入を行った群では、CD68 陽性細胞は中心静脈域に集積しており(Fig 6E)、この所見は線維化範囲と類似していた(Fig 4B)。

## 【考察】

SHRSP5/Dmcr を用いて、食餌により誘導された線維化を伴う脂肪性肝炎に対する食事介入の効果を定量的に評価した。

ヒト患者やモデル動物を用いたこれまでの他の研究報告と同様に肝線維化所見への著しい改善効果は認められなかったが、一部の線維化関連因子や炎症性サイトカインの発現、脂肪肝とその関連因子の発現、血液生化学検査値に改善効果が認められたため、適切にコントロールされた栄養学的介入は、線維化を伴う脂肪性肝炎に対して最も有効な治療方法のひとつであることが示された。

これまでに、ヒト患者はコレステロール摂取量が多いことや、過剰コレステロールは肝細胞の風船様腫大や線維化を誘導することなどが報告されている。本研究で用いた HFC 飼料はコレステロールを多量に含んでおり、また、線維化進展後の食事介入も肝臓 TC 量を完全には正常化しなかったことから、コレステロール摂取量の適切なコントロールが重要であることが推測された。

線維化進展後の食事介入は線維化を改善しなかったが、関連因子の発現を部分的に改善したことに加え、線維分解酵素である MMP-2 の発現を維持したままその阻害因子の TIMP-1 を低下させたことから、より長期の介入や薬物療法との併用がすでに形成された線維化を軽減することが期待される。

HFC 飼料の摂取により、線維化進展以前の肝組織においてもクッパー細胞の特異的

マーカーである CD68 陽性細胞の凝集が観察されたが、食事介入によりほぼ消失した。これは炎症性サイトカインの挙動と類似していた。また、線維化進展後の肝組織では、より顕著な凝集が観察され、食事介入後も線維化領域において残留が認められた。この所見は、肝障害マーカーである AST や ALT 値の改善と一致せず、更なる治療の継続が必要であると考えられた。また、他の報告においては、CD68 陽性細胞の凝集は不可逆的であるとされていたが、本研究ではそれとは異なる知見を示した。

#### **【結論】**

線維化所見の顕著な改善は認められなかったが、食事介入により脂肪沈着だけではなく、線維化関連遺伝子の発現、CD68 陽性細胞、炎症性サイトカイン、血清 ALT 値、肝臓中 TC 量に対しても部分的には改善効果が認められたため、食餌の摂取により誘導された肝線維症を伴う脂肪性肝炎に対する食事介入は有意義であることが示された。