

|      |    |   |   |
|------|----|---|---|
| 報告番号 | ※甲 | 第 | 号 |
|------|----|---|---|

## 主論文の要旨

論文題目

Short-term high-fat diet intake leads to exacerbation of concanavalin A-induced liver injury through the induction of procoagulation state.

短期間の高脂肪食摂取は凝固亢進状態の誘導によりコンカナバリン A 誘導性肝障害の増悪をもたらす。

氏名

名仁澤 英里

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

高脂肪食など食生活の欧米化、肥満者の増加に伴い、非アルコール性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD）の有病率は増加している。NAFLD は非進行性の病態である単純性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver; NAFL）と非アルコール性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis; NASH）に分類され、本邦における NAFLD の有病率は約 30%、NASH の有病率は 3~5%と推定されている（日本消化器病学会「NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014」）。特に、NASH 症例では、肝臓の線維化の進行による肝硬変への進展、さらには肝細胞癌の合併のリスクがあるため、その有病率の高さは保健医療上の大きな問題となっている。

NASH の病態成立機序については、その疾患概念の提唱時より two hit theory が提唱されてきた。まず、肝細胞への脂肪沈着（first hit）が起こり、その後、肝細胞障害要因や遺伝的素因（second hit）が加わることで NASH の発症に至るという仮説である。first hit であ

る脂肪肝の形成は、肥満や食事摂取過多による細胞への脂質輸送の増加、肝内の脂肪酸の増加、肝細胞からの脂質輸送障害などによって起こる。この時点では炎症を伴わない NAFL の状態にとどまるが、ここに second hit として、何らかの原因による酸化ストレス、腸管由来のエンドトキシン、アディポサイトカインである TNF- $\alpha$ 、遊離脂肪酸などの複数の因子の負荷が肝臓に加わることで NASH を発症するというのが two hit theory である (Gastroenterology. 1998; 114: 842-845)。最近では、脂肪変性や炎症の進展が連続性に起きるのではなく、並行して生じてくる multiple parallel hit theory という仮説も提唱されているが、NASH の病態成立機序は未だに明確にされていないのが現状である (Metabolism. 2016; 65: 1038-1348)。

一方で、肥満あるいは高脂肪食摂取が血栓症リスクを上昇させることが明らかにされている。実際にメタボリック・シンドロームでは、糖尿病、脂質異常症、高血圧などの合併によってリスクの高まる心筋梗塞や脳梗塞などの血栓形成性疾患が大きな問題となっている。また、肥満者ではアディポサイトカインである plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の血中濃度の上昇を認め、血栓形成性疾患の発症に関連する凝固亢進状態にあることも示されており (Thromb Haemost. 2004; 91: 861-72.)、高脂肪食負荷による高血糖状態、過剰な脂質の代謝過程で産生され得る遊離脂肪酸、VLD、酸化型 LDL が、PAI-1 の発現亢進や第VII因子の活性化を惹起することも報告されている (Mol Cell Biochem. 2003; 246: 69-74)。

劇症肝炎などの重症型肝炎では、肝類洞内（肝臓の毛細血管）での血栓形成による微小循環障害が肝障害の重症化をもたらすことが知られている。マウスの実験的肝炎モデルである concanavalin A (Con A) 誘発性肝障害においては、炎症進展過程で肝臓内の tissue factor

(TF) と PAI-1 の発現増加が誘導され、この凝固亢進状態で起こる肝類洞内の血栓形成、それによる微小循環の障害が、肝障害進展機序の主体であることが示されている (Hepatology. 2013;57:362-72)。

これらより、肥満あるいは高脂肪食摂取による凝固亢進状態は、NASH の病態形成過程で作用する、いわゆる second hit に起因する肝障害への感受性上昇をもたらし、肝障害の進展に関与している可能性があると考えられる。本研究では、肝脂肪変性と同時に炎症・線維化も進展するという multiple parallel hits theory の立場から、高脂肪食負荷自体が肝障害の増悪に関与することを明らかにし、その機序を解析することによって、NASH 病態の成立機序に関する考察を試みた。

本研究は、マウス Concanavalin A (Con A) 肝障害モデルを用いて、高脂肪食負荷が肝障害の重症度に与える影響を検証し、さらには肝障害重症化に関わる因子および重症化機序を解明することを目的として行った。

### 【材料と方法】

従来実施されてきた実験系のように長期間の高脂肪食 (HFD) 給餌により、完成した脂肪肝の状態に至ったマウスを用いるのではなく、肝細胞に明らかな脂肪沈着を認めない程度の短期間 (2 週間以内) の HFD 給餌を行ったマウスを用いて実験を行った。

まず、通常食 (ND) 摂取マウス (ND 群) を対照として、HFD 摂取マウス (HFD 群、給餌期間: 4 日間、14 日間) において血清 AST/ALT 値など血液生化学検査値、肝組織像などを評価した。また、肝臓における免疫・凝固応答関連因子、小胞体(ER)ストレス因子、解糖系関連因子および低酸素・酸化ストレス関連因子などの mRNA 発現の程度を real-time PCR により解析した。さらに、ND 群及び HFD 群 (給餌期間: 4 日間、14 日間) において、Con

A 投与 (10mg/kg i.v.) により肝障害を誘発し、肝障害のピークとなる Con A 投与 24 時間後に、血清 AST/ALT 値など血液生化学検査値、肝組織像などを評価した。そして、ND 群及び HFD 群 (給餌期間: 4 日間) の Con A 投与後 1 時間、3 時間の血清生化学検査値、肝臓における免疫・凝固応答関連因子、小胞体(ER)ストレス因子、解糖系関連因子および低酸素・酸化ストレス関連因子の mRNA 発現の程度を real-time PCR により解析した。最後に、ND 群及び HFD 群 (給餌期間: 4 日間) の Con A 投与 30 分前に抗凝固剤であるヘパリンを投与し、Con A 投与 24 時間後に血清 AST/ALT 値など血液生化学検査値、肝組織像などを評価した。また、肝臓における免疫・凝固応答関連因子、小胞体(ER)ストレス因子、解糖系関連因子および低酸素・酸化ストレス関連因子などの mRNA 発現の程度を real-time PCR により解析した。

### 【結果】

ND 群、HFD 群ともに、Con A 投与前の AST/ALT 値に明らかな差は認めなかった。HFD 群では、血清コレステロール値、血糖値の上昇を認めたが、中性脂肪値は明らかな変化を認めなかった。肝組織像では、HFD 群においても肝細胞に明らかな変性所見は認めず、Oil Red O による脂肪染色の結果からも微細な脂肪沈着を疑う所見のみが認められた。フィブリノーゲン/フィブリンの免疫染色の結果より、HFD 群のマウス肝臓類洞にフィブリノーゲン/フィブリンの広範な沈着を示したが、ND マウスでは観察されなかった。また、real-time PCR の結果より、短期の HFD 摂取により IFN- $\gamma$  や IL-10, TNF- $\alpha$  や MCP-1 の炎症性サイトカイン・ケモカイン、TF や PAI-1 などの凝固関連因子の発現亢進も観察された。また、解糖系関連因子である PDK-4 の発現減少も観察された。

Con A 投与 24 時間後の血清 ALT 値は、ND 群では ALT 300 U/L 台程度と軽度の上昇にと

どまったが、HFD 群においては ALT3,000-4,000 U/L 台と ND 群に比較し顕著に上昇していた。また、HFD 群において給餌期間を 4、14 日間と変えた場合も、AST/ALT 値の上昇の程度にはほとんど差を認めなかった。肝組織像においても、ALT 値の上昇の程度と一致して、HFD 群で壊死巣の明らかな拡大を認めた。

ND 群、HFD 群（給餌期間：4 日間）における Con A 投与後の real-time PCR の結果より、IFN- $\gamma$ 、MCP-1 は、Con A 投与後も HFD 群において高値で推移する傾向を認めた。IL-10 は、Con A 投与前には両群間で明らかな差を認めなかったが、Con A 投与後は、HFD 群より ND 群において高値で推移する傾向を認めた。TF は、Con A 投与前より HFD 群で高値を示し、Con A 投与後も HFD 群において高値で推移する傾向を認めた。

ヘパリンによる治療実験においては、ND 群では、Con A 投与の 24 時間後の ALT レベルは、ヘパリン非処理マウス ( $434 \pm 175$  U/l) と比較してヘパリン処理マウス ( $36 \pm 9$  U/l) で有意に減少した。同様に HFD 群でも、ヘパリン非処理マウス ( $5934 \pm 2706$  U/l) と比較して、ヘパリン処理マウス ( $112 \pm 78$  U/l) で ALT 値が有意に減少した。ヘパリン処理マウスにおける Con A 投与後 24 時間の ALT 値は、ND 群よりも HFD 群で高い傾向にあった。

#### 【考察】

本研究では、明らかな脂肪肝の合併をもたらさない短期間の HFD 負荷によっても、肝障害の増悪が誘発され得ることを短期 HFD 摂食マウスモデルにおいて明らかにした。

肝組織中のサイトカイン・ケモカイン mRNA 発現の解析では、HFD 群において IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 の発現上昇を認め、HFD 負荷が肝臓内で何らかの炎症応答を惹起していることを示していた。また、HFD 負荷は、TF の mRNA 発現の軽度の増加と、類洞内のフ

ィブリノーゲン沈着の増加をもたらすなど、凝固亢進状態を惹起していることも示された。そして、解糖系酵素である HK-4、GPI-1 の発現上昇、エネルギー代謝関連酵素である PDK4 の発現減少は解糖系および好気性代謝の亢進を示唆し、これがミトコンドリア電子伝達系での ROS の産生を誘発することで炎症状態を惹起する可能性も考えられた。

本研究で用いた Con A 肝障害モデルは、Con A 投与によって刺激された T 細胞から産生される IFN- $\gamma$  が TF 発現レベルを上昇させ、同様に活性化された T 細胞などからの TNF- $\alpha$  が TF や PAI-1 発現の増加に作用することで凝固亢進状態が引き起こされ、類洞内血栓形成による微小循環障害が広範肝壊死をきたすとされる急性肝障害モデルである (Hepatology. 2013;57:362-72)。今回の検討では Con A 投与後に TF と PAI-1 の mRNA 発現の増加を認めたが、その程度は HFD を負荷したマウスにおいてより顕著となった。HFD 摂取で上昇する飽和脂肪酸は、細胞間接着分子 ICAM-1 や血管細胞接着分子 VCAM-1 などの炎症誘発性接着分子の発現増加を誘発することが報告されており (Curr Opin in Physiol 12 (2019) 44-50.)、また、6~10 週間のコリン欠乏アミノ酸 HFD は、フィブリノーゲンのリガンドであるインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の発現を高めることが報告されている (Hepatol Commun 3 (2018) 246-261.)。これらより、HFD 摂取による類洞内のフィブリノーゲン沈着の増加は、血管内の接着因子の増加やフィブリノーゲンリガンドの発現増加による可能性があり、HFD 負荷による肝障害の重症化が、フィブリノーゲンの発現増加を含めた凝固亢進状態によってもたらされたことは明らかであると考えた。

本研究における Con A 刺激を、NASH 病態の成立に関わるいわゆる second hit と捉えれば、高脂肪食自体が肝臓における炎症刺激への感受性を増強することで NASH への進展リスクをもたらしていると考えられる。実際の NASH では、高血糖状態、遊離脂肪酸の増加、

腸内細菌叢の変化とそれによる炎症誘発性菌体成分の増加、肝細胞に傷害性に作用する二次胆汁酸の上昇（Nature. 2013;499:97-101）などが second hit の候補と考えられているため、より生理的な刺激（second hit）により、同様の病態が再現できることを示す必要があり、この点については、さらに検討を要するものと考えられる。

食餌因子が直接 NASH 病態の成立に関わるという仮説は、食の欧米化（高脂肪食）による脂肪肝の増加、血栓症リスクの増加などの臨床的事象とも矛盾せずに multiple parallel hit theory を説明できる可能性がある。食餌という生活習慣から NASH 病態の成立を説明できる可能性のあるモデルとして、今後も検討を進めていきたい。