

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860465

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎における肝臓類洞内皮細胞の超微細構造変化に関する研究

研究課題名(英文)Ultrastructural abnormalities in nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

宮尾 昌(Miyao, Masashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90711466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎、NASHは動脈硬化の独立した危険因子で心筋梗塞や脳血管障害の発症および死亡に強く関与しており、法医解剖でよくみられる疾患のひとつである。しかし、その病態機序には不明な点が多く、生命予後を改善させる薬剤も開発されていない。申請者らは2つのNASHマウスモデルにおいて、まず類洞内皮傷害が起こり、その後Kupffer細胞や肝星細胞が異常に活性化し、肝硬変へと進展していくことも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the precise role of Liver sinusoidal endothelial cell (LSEC) in the pathophysiology of NAFLD using two different mouse models. LSEC injury appeared during the simple steatosis phase, and preceded the appearance of activated Kupffer cells and hepatic stellate cells (HSCs). These results indicate that LSEC injury may have a 'gatekeeper' role in the progression from simple steatosis to the early nonalcoholic steatohepatitis (NASH) stage, and LSEC injury may be necessary for the activation of Kupffer cells and HSCs, which in turn results in the development and perpetuation of chronic liver injuries.

研究分野：法医学

キーワード：法医病理学

1. 研究開始当初の背景

法医学は、これまで予防医学に関する多くの提言を行ってきたが、メタボリック症候群も我が国の予防医学における克服すべき課題の一つで、法医学にとって重要な研究対象である。そして、その病態解明は日本人全体の生命予後改善や医療費削減に貢献できる。

NASH は、肝疾患であると同時にメタボリック症候群の一つでもある。NASH は動脈硬化の独立した危険因子で心筋梗塞や脳血管障害発症に強く関与しているが、現在のところ生命予後を改善させる薬剤は開発されていない。我が国の有病率は約 1% で、今後も増加することが予測されている。

NASH は、飲酒を原因としない脂肪性肝炎であり肥満や糖尿病と関連が深いことが分かっているが、発症機序は未だ不明である。最近、我々は別の慢性肝疾患である硬化性胆管炎モデルを用いて肝細胞周囲の線維化が起こる以前に肝細胞周囲を取り囲んでいる類洞内皮細胞に傷害が観察されることを明らかにし、類洞内皮細胞傷害抑制に主眼をおいた治療法の開発が予後改善に貢献する可能性を示した。また、同様の報告がラットの肝臓線維化モデルでも報告されている。しかしながら、NASH の病態進展とこの類洞内皮細胞傷害に関する研究は進んでいないのが現状である。

NASH モデルのコリン欠乏食投与モデル (choline-deficient amino acid-defined diet、以下、CDAA) は、インスリン抵抗性を伴い進行期には肝硬変や肝細胞癌を発症させることから、ヒトの NASH と類似している。また、数あるモデルの中でも緩徐な病態進展を示すため、我々が注目している類洞内皮細胞傷害を経時的に観察することに適したモデルと考えられる。CDAA モデルの欠点としては、ヒトの NASH と異なり、有意な体重増加を来さない、インスリン抵抗性は肝臓に限定している傾向があり、全身の臓器では示さない、ヒトの NASH ではコリン欠乏による NASH は通常みられないということが挙げられる。これらの欠点を補うためのいいモデルとしては、高脂肪食投与モデル (High fat diet、

以下、HFD) がある。CDAA モデルと比較すると、体重増加やインスリン抵抗性、高血圧などを来し、より緩徐に NASH に進展していくことが知られ、よりヒトの NASH を再現するが、HFD の投与期間をいくら延ばしてもヒトという初期の NASH の段階で止まり、高度の炎症、線維化、肝臓萎縮、肝硬変、肝細胞癌には至らない。

以上より、これら別々の機序で NASH を来たす CDAA モデルと HFD モデルの 2 つのモデルを用いて、NASH における類洞内皮細胞傷害と病態進展の関連を解明すれば、法医学における死因究明だけでなく新たな治療法開発に繋がり、日本の予防医学に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

NASH はメタボリック症候群の中でも特に診断・治療法が確立されていない。診断・治療法の確立がされていない原因としては、NASH の病態に対する理解がないことが考えられる。

肝臓には、肝細胞の他に、胆管上皮細胞、マクロファージ、平滑筋細胞、伊東細胞、類洞内皮細胞、好中球、リンパ球など種々の異なる細胞が存在し、生理的あるいは病的状態の時に相互に関係していることが分かっている。その中でも類洞内皮細胞は肝細胞に接して存在し、また、機能的にも血液と肝細胞の間で物質交換を行うなど肝細胞と密接な関係にあるため、肝細胞と類洞内皮細胞は深く関与していると考えられる。さらに、近年、肝臓線維化を促進する肝星細胞と類洞内皮細胞が密接に関連することが明らかになった。また、我々も慢性進行性肝疾患である硬化性胆管炎のモデルを用いて、肝臓線維化が起こるより以前に類洞内皮細胞が傷害されることを明らかにしている。これらのことから、NASH を含めた慢性進行性肝疾患では、その線維化に類洞内皮細胞・肝星細胞・肝細胞の傷害が互いに深く関与していると容易に推察できる。しかしながら、類洞内皮細胞の超微細構造変化という観点から NASH の病態解明を試みた報告はない。

これまでの研究では、NASHは肝細胞内の脂肪沈着（脂肪肝）を特徴とすることから、脂質代謝異常や糖尿病に着目して病態に迫ることが一般的な発想であった。しかし、この研究手法では生命予後を改善させる薬剤はこれまでのところ開発されていない。さらに、これらの脂質代謝異常や糖尿病が発見された時には、すでにNASHの進展がかなり進んでおり積極的な治療をしたとしても治りにくい状態に陥っている場合が多い。ゆえに、現在の一般的な発想とは異なる視点でのアプローチが求められる。

従って本研究の目的はNASHの病態進展における類洞内皮の構造変化とこれに関与する形態学的ならびに機能的関与因子を解明することで、類洞内皮細胞傷害の抑制がNASHの病態進展を抑制できるかを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

本研究では、下記の分析を行うことで、類洞内皮細胞の病理形態学的変化や病態進展への寄与の有無、寄与がある場合はその程度を明らかにした。

マウスは、C57BL/6のオス（体重20～30g）を用いる。CDAА投与の直前、1週後、2週後、4週後、8週後、22週後に、それぞれ最低6匹のマウスから検体を採取した。CDAАモデルで以下を確認後、CDAАとは異なる機序でNASHをきたす高脂肪食投与モデルでも同様の実験を行った。

(1). NASHにおける肝臓類洞内皮の超微細構造変化の解明

二次元での細胞内小器官観察に優れた透過型電子顕微鏡を用いて、ミトコンドリアを初めとした細胞内小器官を軸とした形態変化を評価した。また、三次元の観察が可能な走査型電子顕微鏡も用いて、類洞内皮細胞の形態変化を評価した。類洞内皮細胞傷害は毛細血管孔の減少の他に、脂肪沈着、壊死、線維化、貪食能変化などで評価した。

(2). 類洞内皮傷害への形態学的関与因子の検索

H&E染色標本で、類洞内皮細胞、肝星細胞、

肝細胞、クッパー細胞などの細胞分布や病理形態学的変化を評価し、オイルレッドオー染色で脂肪の沈着、アザン染色で線維化、PAS染色で肝細胞のグリコーゲン貯蔵能なども評価した。そして、抗CD31、34抗体や抗体CK8/18抗体、抗SMA抗体による免疫染色を行い、類洞内皮細胞と肝細胞の関係、肝臓線維化に重要な肝星細胞の活性化を評価することで病態進展の関係解明に迫った。

(3). 類洞内皮傷害への機能的関与因子の検索

マウス肝臓組織、血液および尿を用いて、血清ALT、脂質、糖などを測定し、肝細胞傷害、脂質異常症やインスリン抵抗性との関連を評価するとともにTNFを始めとした炎症性サイトカインのタンパク質、mRNAの定量を行うことで、機能的関与因子を検索した。

4. 研究成果

CDAА、HFD投与により肝臓において、肉眼的に肝腫大と色調変化がみられた。また、両特殊飼料の投与時間依存性に脂肪沈着、肝細胞巨細胞化、小葉内炎症、線維化がみられた。CDAАモデルでは一部のマウスに肝硬変や肝臓腫瘍がみられた。さらに、ヒトのメタボリック症候群のような中心性肥満、インスリン抵抗性と高脂血症が認められた。両モデルにおいて、病態早期である単純性脂肪肝から初期のNASHの段階に、類洞内皮傷害を認めた。この病態早期の段階では、マクロファージや伊東細胞の病的な変化は形態学的にも機能的にも認められなかった。そして、類洞内皮傷害に引き続いて、マクロファージの病的活性化、伊東細胞の筋線維芽細胞への分化と膠原線維の放出がみられることが分かった。両モデルの飼料を中断し通常飼料に戻して病態の回復期における類洞内皮やマクロファージ、伊東細胞、肝細胞の変化を評価したところ、マクロファージ、伊東細胞、肝細胞で有意な改善がみられた。一方、類洞内皮は一部回復していたが比較的病的形態変化が残存していた。これらの結果から、類洞内皮傷害がNASHの病態進展において「ゲートキーパー」としての機能を持つことが示唆された。さらに、病態回復期における類洞内皮傷

害は病態回復を阻害あるいは遅延させる因子として働いていることが示唆された。

しかしながら、類洞内皮傷害が病態進展やマクロファージ、伊東細胞の異常な活性化にどの程度寄与しているかは不明であるので、今後は類洞内皮傷害を抑制する薬剤などを用いて、寄与の程度を明らかにするために研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. T Ishida, H Kotani, M Miyao, C Kawai, L Jemail, H Abiru, K Tamaki. "Renal impairment with sublethal tubular cell injury in a chronic liver disease mouse model." *PLOS ONE*. 2016; 11(1): e0146871. (査読有)
2. M Miyao, H Kotani, T Ishida, C Kawai, S Manabe, H Abiru, K Tamaki. "Pivotal role of liver sinusoidal endothelial cells in NAFLD/NASH progression." *Lab Invest*. 2015; 95(10): 1130-44. (査読有)
3. C Kawai, M Miyao, H Kotani, K Tamaki. "Bilateral spontaneous pneumothorax secondary to aspiration pneumonia induced by a wristwatch lodged at the pharyngo-esophageal junction." *Forensic Sci Med Pathol*. 2015; 11(2): 249-254. (査読有)

真鍋 翔、濱野 悠也、川合 千裕、森本 千恵、宮尾 昌、玉木 敬二、ピーク高に影響を及ぼす各パラメータの分布に関する統計学的推定、DNA 多型、査読有、23巻、1号、2015、159-65

[学会発表](計10件)

1. Kawai C, Miyao M, Ishida T, Jemail L, Kotani H, Tamaki K.
Extracellular histone is a new therapeutic

target for multiple organ injuries.

The 99th Congress of the Japanese Society of Legal Medicine. Abstracts. 2015; p102, Kochi, Japan.

石田 季子、小谷 泰一、宮尾 昌、川合 千裕、ジェマイル・レイラ、篠塚 淳、長村 敏生、玉木 敬二、夜間就寝中ほぼ同時に突然死した双胎男児例、第22回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会。講演要旨集。2016; 30

小谷 泰一、長村 敏生、宮尾 昌、藤井 法子、大前 禎毅、玉木 敬二、小児救急臨床と法医学の連携の試み(4) 警察との連携拡大に向けて、第22回日本SIDS・乳幼児突然死予防学会。講演要旨集。2016; 33

藤本 駿太郎、真鍋 翔、石田 季子、ジェマイル・レイラ、尾関 宗孝、宮尾 昌、玉木 敬二、PowerPlex Fusion 22 ローカスを用いた混合試料の関与人数の推定と尤度算出の精度について、日本DNA多型学会第24回学術集会。講演要旨集。2015; 94

ジェマイル・レイラ、川合 千裕、石田 季子、阿比留 仁、宮尾 昌、篠塚 淳、馬場 志郎、長村 敏生、小谷 泰一、玉木 敬二、水痘および流行性耳下腺炎が先行し突然死した1歳9か月女児、第62回日本法医学会学術近畿地方集会。講演要旨集。2015; 13

小谷 泰一、宮尾 昌、南 博蔵、阿比留 仁、尾関 宗孝、松村 由美、玉木 敬二、「医療事故調査制度」における京大病院の解剖支援体制、第62回日本法医学会学術近畿地方集会。講演要旨集。2015; 35

石田 季子、宮尾 昌、川合 千裕、ジェマイル・レイラ、小谷 泰一、玉木 敬二、新規AKIモデルマウスにおけるsublethal cell injuryの発生機序、第99次日本法医学会学術全国集会。日本法医学雑誌。2015; 54

小谷 泰一, 宮尾 昌, 南 博蔵, 森本 千恵, 尾関 宗孝, 玉木 敬二、乳児突然死例の検討 Triple Risk Model for SIDS を踏まえて、第 99 次日本法医学会学術全国集会。日本法医学雑誌。2015; 68

宮尾 昌, 阿比留 仁, 真鍋 翔, 石田 季子, 小谷 泰一, 玉木 敬二、神経性無食欲症による低栄養の 1 例、第 99 次日本法医学会学術全国集会。日本法医学雑誌。2015; 77

小谷 泰一, 長村 敏生, 山本 憲, 宮尾 昌, 藤井 法子, 大前 禎毅, 富樫 かおり, 玉木 敬二、小児救急臨床と法医学の連携の試み(2) 小児科、放射線科、法医による合同症例検討会、第 21 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会。講演要旨集。2015; 31

〔図書〕(計 1 件)

宮尾 昌、玉木 敬二、虚血性心疾患発症を減少させる NAFLD への早期治療、日本医事新報、査読なし、2016;4796:45.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.fp.med.kyoto-u.ac.jp/>

(1)研究代表者

宮尾 昌 (MIYAO, Masashi)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：9 0 7 1 1 4 6 6