

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09437

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎の慢性炎症形成における赤血球、血小板の役割

研究課題名(英文)Role of red blood cells and platelets in the development of chronic inflammation of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

藤井 英樹 (Fujii, Hideki)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20382070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は「非アルコール性脂肪肝炎における肝臓内の炎症形成に赤血球、血小板による血栓形成が関与する」という仮説を証明することを目的に施行した。高脂肪高コレステロール食(1.25%)を16週摂取させたマウス群では病理組織学的にNASHを認めたと、抗凝固薬であるリバーロキサバン(5mg/kg body weight/day)を含む高脂肪高コレステロール食ではNASHの抑制効果が認められなかった。ヒト肝生検組織(N=8)を用いて電子顕微鏡による組織観察を行った。類洞内を詳細に観察したところ、うっ血所見が認められたものの、血小板血栓を見つける事は出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では残念ながら自分の仮説を証明する事は出来なかった。しかし、血小板のNASH病態への関与については「血小板数が低下したNAFLD患者では指数関数的にHCC発生のリスクが上昇する」という論文を発表することが出来た(Hepatol Res. 2023;53:391-400)。血小板の形態学的観察は困難であったが、NASHの病態進展に伴い血小板が活性化されたり、多くのケモカインを放出することが明らかになりつつある。今後更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to prove the hypothesis that thrombus formation by red blood cells and platelets is involved in the formation of inflammation in the liver in non-alcoholic steatohepatitis. (1) A group of mice fed a high-fat, high-cholesterol diet (1.25%) for 16 weeks showed histopathological evidence of NASH, whereas a high-fat, high-cholesterol diet containing the anticoagulant drug, Rivaroxaban (5 mg/kg body weight/day), failed to suppress NASH. (2) Human liver biopsy tissues (N=8) were used for histological observation by electron microscopy. Detailed observation of the sinusoids revealed stasis findings, but no platelet thrombi could be found.

研究分野：脂肪性肝炎の病態の解明

キーワード：血小板 赤血球 NASH

## 1. 研究開始当初の背景

### 肥満人口の世界的な増加

・現在、肥満人口は肥満大国であるアメリカ合衆国で 1 億人(BMI30 以上)、わが国でも 2,300 万人(BMI25 以上)のぼり、世界的に増加の一途を辿っている(Lancet 2011;378:804)。肥満と関連する疾患として、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常、脳卒中、虚血性心疾患、一部の癌(大腸癌、前立腺癌、乳癌、肝臓癌)などが挙げられる(Lancet 2008;371:569)。肥満の予防はこれらの疾病の発症率を低下させ、人々の健やかな生活に寄与すると思われる。

### 肝硬変を来す脂肪肝、NASH

・肥満の増加に従い、脂肪肝の患者数も増加の一途を辿っている。特に、脂肪肝の一部は肝硬変に進展しうることが明らかになった(Clin Gastroenterol Hepatol 2009;7:234)。このような疾患を総称して非アルコール性脂肪性肝疾患(Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)と呼ぶ。NAFLD は脂肪化のみで予後良好な非アルコール性脂肪肝(NAFL)と進行型で脂肪化に加え炎症細胞浸潤、線維化を認める疾患を非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に分かれる。NASH は 10 年で 5-20%の患者が肝硬変に進行し、さらに肝癌を合併しうるため、早急な病態の解明と治療法の確立が急務である(J Gastroenterol 2012;47:215)。

### NASH の病態進展のメカニズム: なにが分からないか

・NASH では、アルコール性肝障害と同様に腸内細菌由来のエンドトキシン (LPS)の門脈血中への流入に伴い肝マクローファージ(Kupffer 細胞)の活性化が生じ、M1 優位のサイトカインや NADPH oxidase を介した ROS 産生を介して肝細胞障害を生じると考えられている。形態学的には、増加した M1 マクローファージが泡沫化し、細胞死に陥った細胞を取り囲む特徴的な構造 (crown-like structure:CLS)を形成し、慢性的な組織炎症の起点になると報告されており、当施設での免疫染色でも確認している。(PLoS ONE 2013;8:e82163, 3page 図)。CLS が認められる臓器は脂肪組織および肝臓で、マウスおよびヒトに共通に見られる現象とされる。しかしながら、CLS 形成に関与する細胞や機序は現在も不明である。

## 2. 研究の目的

肥満人口の増加に伴い、脂肪肝患者数も増加している。脂肪肝の一部は肝硬変や肝がん進展するが、病態進行の詳細なメカニズムは今もなお不明であり、治療法は確立していない。本研究は マウス脂肪肝炎モデル、ヒト肝生検病理組織の赤血球、血小板の役割を形態学的に解析し、「非アルコール性脂肪肝炎における肝臓内の炎症形成に赤血球、血小板による血栓形成が関与する」という仮説を証明することを目的とする。本仮説を証明することで、非アルコール性脂肪肝炎の新規診断法のみならず、抗血小板薬による新規治療の開発に役立つことが期待される。

## 3. 研究の方法

### 平成 29 年度

マウス NASH モデルの肝臓の形態学的検討を行う。複数のマウス NASH モデル(メチオニン・コリン欠乏食(MCD)、高脂肪食等)の肝組織中の血小板、赤血球の免疫染色を施行し、NASH 炎症グレード、線維化ステージ進展に伴う赤血球・血小板の形態学的変化を確認する。

### 平成 30 年度以降

マウスモデルで得られた実験結果をもとに、ヒト NASH 肝組織を用いて血小板、赤血球の免疫染色を施行し、NASH 炎症グレード、線維化ステージ進展による形態

## 4. 研究成果

高脂肪高コレステロール食(1.25%)を 16 週摂取させたマウス群では病理組織学的に NASH を認めしたが、抗凝固薬であるリバーロキサバン(5mg/kg body weight/day)を含む高脂肪高コレステロール食では NASH の抑制効果が認められなかった。ヒト肝生検組織(N=8)を用いて電子顕微鏡による組織観察を行った。類洞内を詳細に観察したところ、うっ血所見が認められたものの、血小板血栓を見つける事は出来なかった。しかし、マウスモデル自体は新たに作成する事が出来たので以下に報告する。

図 1. 研究に使用した飼料の組成

	Formula (% kcal from)		
	Western	HFHC	MCD
<b>Protein</b>	15.2	20.5	14.6
<b>Carbohydrate</b>	42.7	42.4	63.2
<b>Fat</b>	42.0	37.1	22.1
<b>kcal/100g</b>	450.0	380.0	410.0

Cholesterol 0.2%  
High sucrose (34% by weight)

Cholesterol 1.25%  
Sodium cholate 0.5%

Methionine and  
choline deficient

今回使用したのは高脂肪高コレステロール食である(緑色)。

図 2. 研究の群分け(リバーロキサバン群除く)

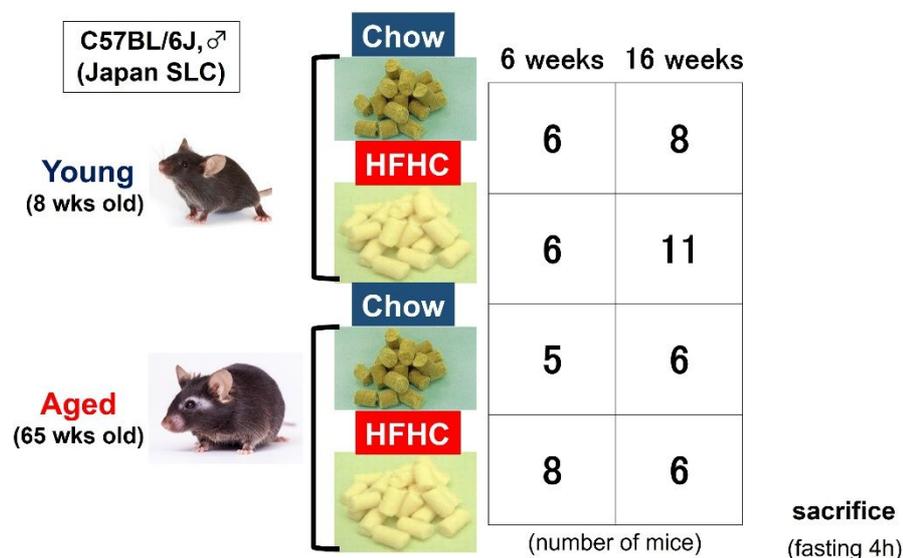
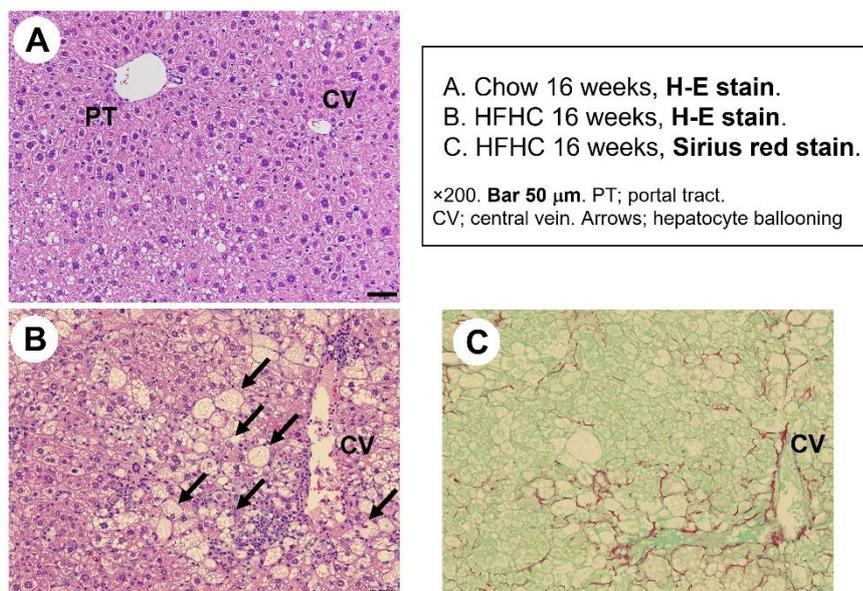
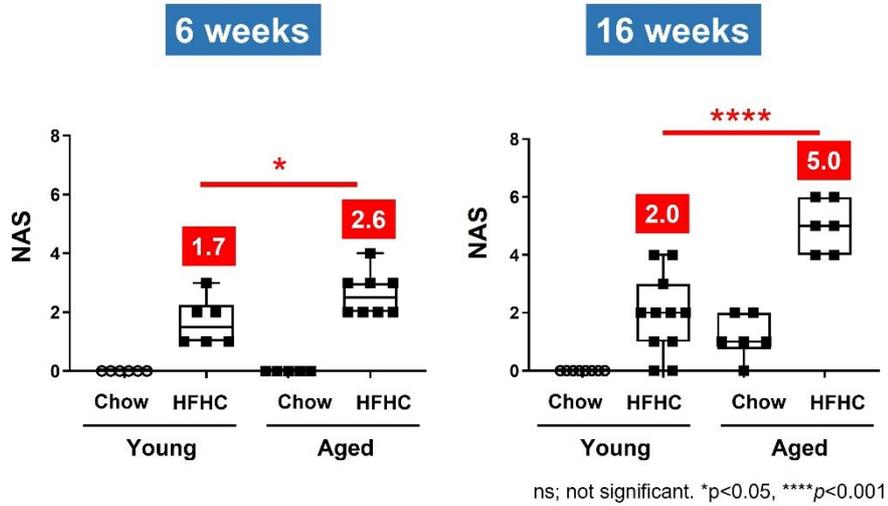


図 3. Aged mice. Histological findings



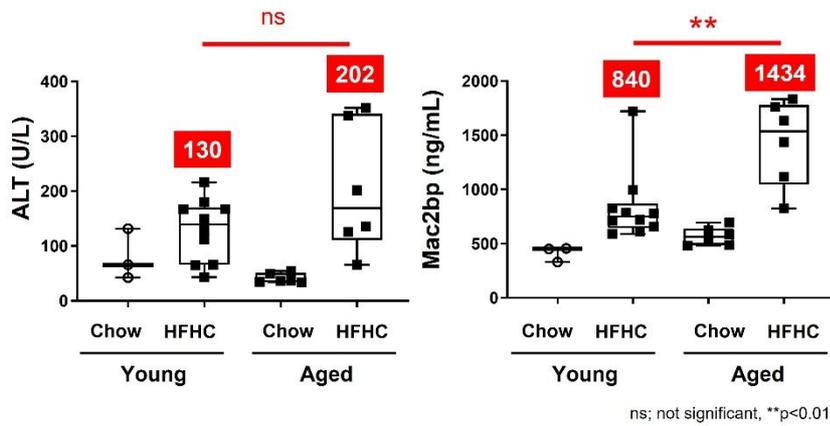
高齢マウスにおいて、典型的な NASH 像を認めた(B)。また、stage2 程度の線維化を認めた(C)。

図 4. NAFLD activity score (NAS)



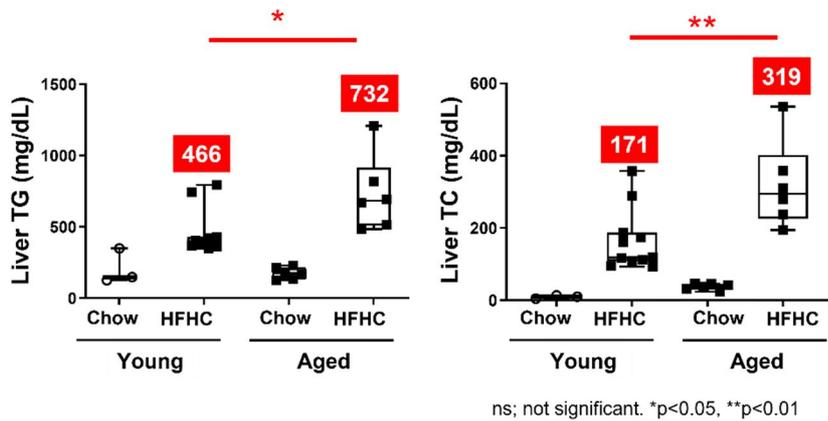
特に高齢マウスにおいて NAS が有意に高値になった。

図 5. 肝機能および NASH 進展のマーカーの一つ、Mac2bp



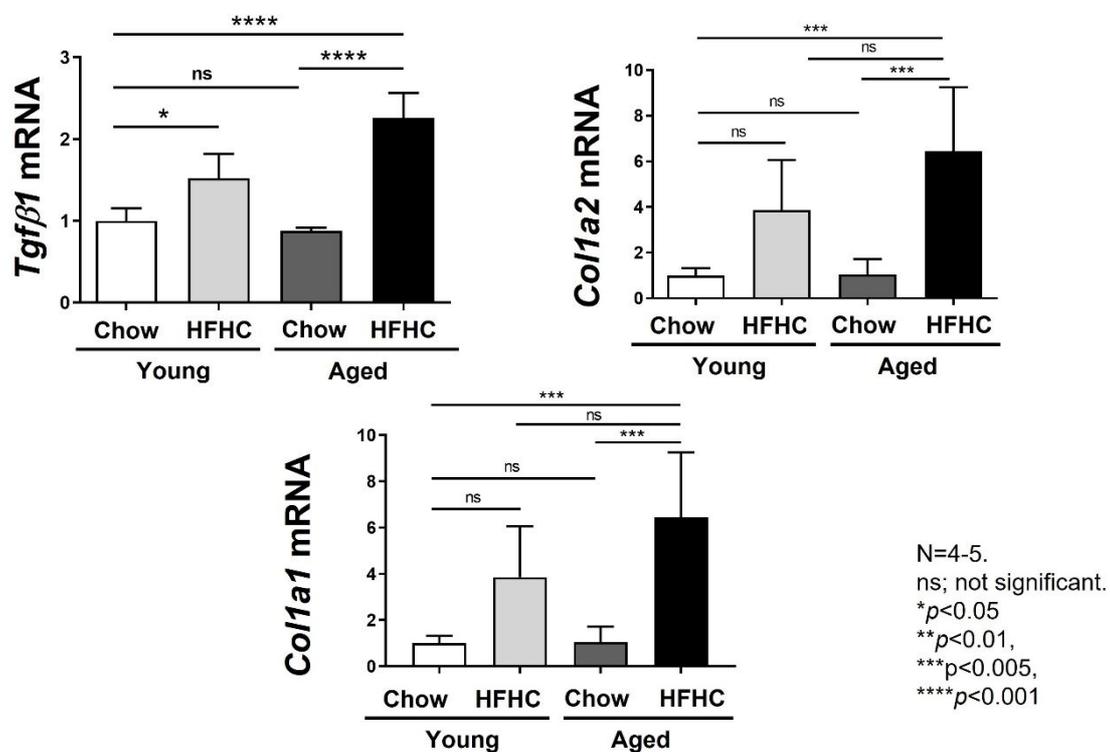
Iwata A, Kamada Y, et al. Hepatol Res 2017;47:902-909.

図 6. 肝内中性脂肪、肝内総コレステロール



高齢マウス群では肝酵素、NASH マーカー、肝内中性脂肪等が全て有意に上昇した。

図 7. 肝線維化関連遺伝子発現



ここまで示したように、HFHC 食を高年齢マウスに投与する事でヒト NASH に近い病態を再現する事が出来た。ここで示した内容は第 55 回肝臓学会総会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujii Hideki, Nakamura Naotoshi, Fukumoto Shinya, Kimura Tatsuo, Nakano Akemi, Nadatani Yuji, Tauchi Yukie, Nishii Yuuko, Takashima Shingo, Kamada Yoshihiro, Watanabe Toshio, Kawada Norifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Lifestyle changes during the coronavirus disease 2019 pandemic impact metabolic dysfunction?associated fatty liver disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/liv.15158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Hideki, Enomoto Masaru, Fukumoto Shinya, Kimura Tatsuo, Nadatani Yuji, Takashima Shingo, Hagihara Atsushi, Uchida Kobayashi Sawako, Tamori Akihiro, Nishimoto Naoki, Kawada Norifumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Validation of a two step approach combining serum biomarkers and liver stiffness measurement to predict advanced fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 801 ~ 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Hideki, Fukumoto Shinya, Enomoto Masaru, Uchida-Kobayashi Sawako, Kimura Tatsuo, Tamori Akihiro, Nadatani Yuji, Takashima Shingo, Nishimoto Naoki, Kawada Norifumi	4. 巻 11
2. 論文標題 The FibroScan-aspartate aminotransferase score can stratify the disease severity in a Japanese cohort with fatty liver diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93435-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Hideki, Kawada Norifumi, Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD) Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD)	4. 巻 21
2. 論文標題 The Role of Insulin Resistance and Diabetes in Nonalcoholic Fatty Liver Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3863 ~ 3863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113863	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Hideki, Imajo Kento, Yoneda Masato, Nakahara Takashi, Hyogo Hideyuki, Takahashi Hirokazu, Hara Tasuku, Tanaka Saiyu, Sumida Yoshio, Eguchi Yuichiro, Chayama Kazuaki, Nakajima Atsushi, Nishimoto Naoki, Kawada Norifumi, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease	4. 巻 34
2. 論文標題 HOMA-IR: An independent predictor of advanced liver fibrosis in nondiabetic non-alcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 1390 ~ 1395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 藤井英樹、松原三佐子、河田則文
2. 発表標題 マウス脂肪肝炎モデルにおける加齢の影響
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松原 三佐子 (佐藤三佐子)  (Matsubara Misako)  (00635120)	大阪公立大学・大学院医学研究科・特任講師   (24405)	
研究分担者	LE THITHANHTHUY  (THITHANTHUY LE)  (10572175)	大阪公立大学・大学院医学研究科・特任講師   (24405)	
研究分担者	松原 勤  (Matsubara Tsutomu)  (20628698)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授   (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------