

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790299

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪肝（NAFLD）発症に関わる免疫学的検討

研究課題名（英文） The role of immune system to non alcoholic fatty liver disease

研究代表者

入江 潤一郎（IRIE JUNICHIRO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70306687

研究成果の概要：メタボリックシンドロームに高率に合併する肝脂肪蓄積（非アルコール性脂肪肝（NAFLD））は肥満と独立して糖尿病発症の危険因子となることが知られているが、その成因には不明な点が多い。研究代表者はモデル動物においてリンパ球の刺激により肝脂肪蓄積が生じることを見出した。さらに肝臓周囲を取り囲む免疫担当細胞の活性化状態が肝脂肪蓄積に重要であることも見出した。本モデルの解明が、今後ヒト肝脂肪蓄積の病態の解明、治療法の開発に寄与すると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)）は肝障害を惹起する程度アルコール摂取歴がなく、その他ウイルス性肝炎など原因の明らかなものを除外した、肝への脂肪沈着を認める肝疾患である。NAFLD は一般臨床では脂肪肝と称され、昨今メタボリックシンドロームの一つの表現系であると考えられるようになってきている。実際に BMI25 以上 30 未満の 1 度肥満者の 30%、BMI30 以上の 2 度肥満者の 70% に NAFLD を認めるとされており、肥満が NAFLD と密接に関係していることはほぼ間違いな

いと考えられる。NAFLD でメタボリックシンドロームを合併するものは 40%にも及ぶ。NAFLD は健診受診者でも 20-30%に認めるとされ、日本人に急増している病態である。現在までは NAFLD は肝臓に余剰な栄養が蓄積した状態“脂肪肝”であり、疾病とは捉えられてこなかった。ところが昨今この NAFLD が糖尿病発症の独立した誘因であるとする疫学調査が相次いでいる (Diabetes56;984,2007, Diabetes Care31;1138, 31;1230,2008)。すなわち肝臓に脂肪蓄積が生じることこそが、その後の糖代謝異常に寄与する因子であることを欧米人と日本人でともに明らかにし

ており、さらに糖尿病の改善は内臓脂肪よりも肝臓の脂肪蓄積量の減少とよく相関することも明らかになっている (Diabetes54;603,2005)。

NAFLD は10%程度の患者が非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis (以下 NASH)) と呼ばれる肝組織の炎症、壊死を伴う病態へ進行し、さらに肝硬変、肝細胞癌を発症することから 21 世紀のガンの主因となると懸念されているが、肝脂肪蓄積の解消から肝疾患のみならず糖尿病の予防・治療をすることが可能となれば、今後の日本人の疾病構造の変化に与えるインパクトは多大と考えられる。

2. 研究の目的

そこで研究代表者は NAFLD の成因の解明と治療法の開発を本研究の目的とした。前述のように肥満を呈する患者では脂肪肝を認めることが極めて多いが、入院加療で嚴重に減量し、血糖値や血清中性脂肪値の改善を見た後も、脂肪肝の消失を見ないことは临床上多々経験される。また、肥満を認めず血液検査上軽度の脂肪肝を認めるだけの患者が、徐々に肝硬変にいたる場合もある。これらの事実は NAFLD が単なるエネルギーの蓄積だけで説明しうるものでないことを示唆している。実際、脂肪肝の動物モデル系でさえも NAFLD の誘導には感受性と抵抗性の種があることが知られており、NAFLD の原因を過剰なエネルギー摂取のみとするのは困難であろう。

研究代表者はマウス新規炎症性肝臓疾患の治療法を検討する中で、T リンパ細胞を刺激除去することでマウスに NAFLD を誘導しようを見出した。これは脂肪肝を過剰なエネルギー摂取にて生じるとする現在の概念と全く異なるものである。そこで肝内免疫細胞の活性化を通じて NAFLD を引き起こすという現象を解析することで、NAFLD の成因を明らかとすることとした。

3. 研究の方法

まず NAFLD を誘導することが出来る T 細胞抗体の至適投与量について、一匹あたりの抗体投与量を段階的に変化させ明らかにする。一匹あたりの抗体の投与量を 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 μg と変化させ、肝臓を組織学的に検討し NAFLD 誘導のための最低必要量を明らかにする。各投与量は C57BL/6 マウス 5 匹ずつで検討する。またコントロールとしてマウス TNF を直接マウスに投与する系を用い、同様に肝臓を検討する。脂肪肝の確認には HE 染色に加え、脂肪染色も行う。

次に NAFLD の時間的経過を観察検討する。すなわち、投与前、NAFLD 発症時 (投与 10 日後)、回復期 (投与 30 日後) の 3 点でそれぞ

れ 5 匹ずつのマウスから、血清、脾細胞、肝内細胞を採取し、血清中のサイトカイン値 (IFN γ , IL-6, IL-2, TNF) を ELISA 法で解析、採取した脾細胞および肝内浸潤細胞の分画 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NKT 細胞など) を flowcytometer にて解析する。また脂肪肝が持続しているコントロールとして、高脂肪食を与え続け脂肪肝を誘導したマウスを用い、同様の検討を行う。

そして次に NAFLD 誘導に必須の細胞分画の同定をまず行う。CB17scid マウス 1 匹に対し正常の CB17 マウス (ドナー) を 10 匹用意し、ドナーに抗 T 細胞抗体を投与し、投与後 10 日目に脾細胞、肝内細胞を採取しプールする。得られた脾細胞および肝内浸潤細胞から磁気分離システムで特定の細胞分画 (CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、NKT 細胞) を純化し、レシピエントのマウスに静脈注射して NAFLD の発症を観察する。レシピエントの観察期間は、正常マウスの臨床経過を考え、2 週間、4 週間とし、それぞれ 2 週間 (10 匹)、4 週間 (10 匹) を用いて実験を行う。

また除去実験として、正常マウスに予め NAFLD 発症に重要と推測された細胞分画に対する抗体を投与してその分画を除去しておき、その上で T 細胞を刺激して NAFLD の発症に与える影響を検討する。

最後に NAFLD 発症の分子機構を解明する。すなわち NAFLD を発症したマウスから肝組織を摘出し、メッセンジャー RNA を抽出して、半定量 PCR 法で脂肪合成系酵素の遺伝子発現量を検討する。

4. 研究成果

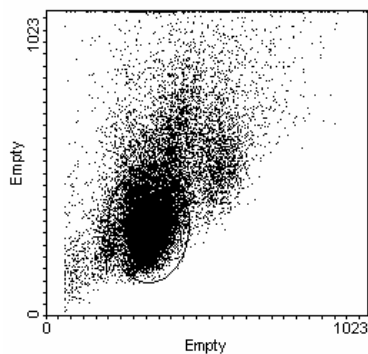
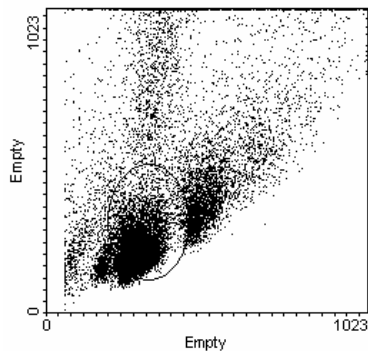
NAFLD の誘導には最低 10 μg の抗体投与が必要であることが明らかとなった。またマウスの種により感受性に差があることも明らかとなり、DBA マウスでは NAFLD の誘導が困難であり、また C57BL/6 マウスでは誘導が比較的容易であった。しかし雌雄差や週令が影響することも明らかとなった。



図：肝脂肪蓄積

組織学的検討では、誘導された NAFLD は脂肪滴を含む脂肪肝を呈しており、総脂質の含有量は増加していた。

次に NAFLD 発症の時間経過について検討した。NAFLD は抗体投与後早期に発症し、自然回復することが明らかとなった。血清中のサイトカインレベルとは明らかな関係は認められなかった。血清脂質は増加していた。抗体の投与によって脾細胞の T 細胞数は減っていたが、肝内細胞では明らかな変化は認めなかった。



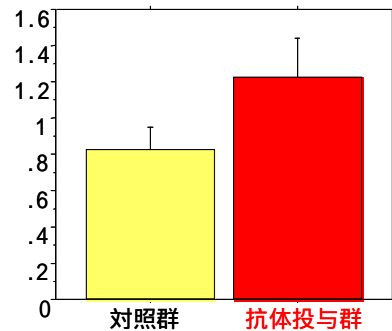
図：肝内細胞（上：対照群、下：抗体群）

さらに NAFLD の発症に寄与する細胞性因子の検討を行った。すなわち NAFLD を発症したマウスから免疫担当細胞を抽出し、免疫不全マウスに移植した。血清の移入では病態を移入できず、肝細胞分画の移植にて病態の移入が可能であった。よって免疫担当細胞そのものが NAFLD 発症に影響していると考えられた。加えて、同血清中の炎症性サイトカイン量を検討したが、明らかに変化しているものを認めず、これも液性因子でなく細胞性因子が NAFLD の発症に寄与するとする上述の所見に合致するものであった。

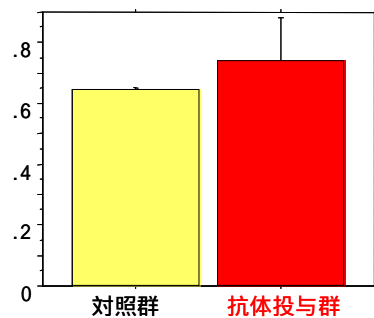
さらに詳細に肝脂肪蓄積の発症に寄与する細胞性因子の検討を行った。リンパ球を有さないマウスでは本肝脂肪蓄積が生じないこと、リンパ球の移植を行うことで本病態が再現できることを見出した。また除去抗体を正常マウスに投与し、予め NK 細胞を除去す

る前処置を行っておくと、本病態が生じ難くなることも見出した。これらの知見から NK マーカー陽性の T 細胞が病態の形成に重要であると考えられた。

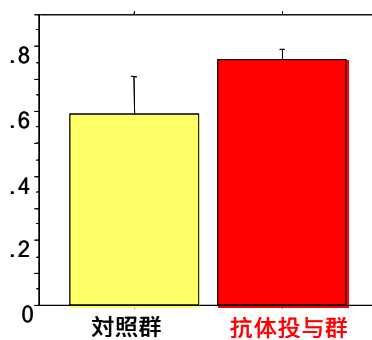
最後に本モデルで生じた脂肪肝における遺伝子発現を検討した。ACC や FAS といった脂肪合成系酵素の遺伝子発現が亢進しており、また同時に炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進していた。従って本モデルにおける肝脂肪蓄積は、肝実質細胞内において脂肪合成が亢進しているために生じたと考えられた。



ACC



FAS



TNF-

以上のことより肝臓の脂肪蓄積には肝臓外からのエネルギー流入のみが重要なのではなく、肝臓周囲を取り囲む免疫担当細胞の活性化状態も重要であると考えられた。

さらにこれら脂肪肝を有したマウスでは糖負荷検査で耐糖能の増悪を呈しており、本モデルが今後ヒトでのメタボリックシンドロームから糖尿病へ進行する病態の解析に有益なモデルとなることが考えられた。今後さらに肝脂肪蓄積に関わる分子機構を明らかと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1件)

田川裕恒、入江潤一郎、山田悟、伊藤裕・Tリンパ球の糖脂質代謝への影響の検討．糖尿病 52(s1)s280、2009．査読有．

6. 研究組織

(1)研究代表者

入江 潤一郎 (IRIE JUNICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70306687

(2)研究分担者

(3)連携研究者