

機関番号：16401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590785

研究課題名 (和文) 非アルコール性脂肪肝炎発生における Kupffer 細胞の2面性機能異常の重要性

研究課題名 (英文) The importance of 2 dimensional dysfunction of Kupffer cells for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

小野 正文 (ONO MASAFUMI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：70304681

研究成果の概要 (和文)：非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病因・病態は不明な点が多いが、近年その病態に Kupffer 細胞の機能異常が重要であることが指摘されるようになった。我々は、NASH ラットモデルにて Kupffer 細胞の貪食能低下を蛍光ビーズ貪食実験および SPIO-MRI を用いた実験にて明らかにし、NASH 患者でも同様の病態が起きている事を SPIO-MRI 解析にて明らかにした。サイトカイン過剰分泌と貪食能低下という一見相反する Kupffer 細胞の機能異常が NASH の病態に重要であることが分かった。

研究成果の概要 (英文)：The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) has not been well understood yet. Recently, it is reported that the dysfunction of Kupffer cells would be involved in the pathogenesis of NASH. Therefore, we clarified the impairment of the Kupffer cells' phagocytic function in NASH rats by the fluorescent beads uptake examination and SPIO-MRI examination. In addition, the impairment of the Kupffer cells' phagocytic function in NASH patients was also shown by SPIO-MRI. Taken together these results, it was important pathogenesis in NASH of which co-existence of the activated cytokines release from Kupffer cells and impaired phagocytic function of Kupffer cells. 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：NASH、NAFLD、Kupffer 細胞、エンドトキシン

## 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の病因・病態は不明な点が多いが、近年 NASH 発症の病因・病態に Kupffer 細胞の活性化および炎症性サイトカインの過剰分泌が重要であることが明らかとなってきた。しかし、Kupffer 細胞活性化のメカニズムについては明らかではなく、Kupffer 細胞の貪食能の評価およびそれが NASH 発症の病

因・病態に及ぼす影響については明らかとはなっていなかった。

## 2. 研究の目的

NASH 発症メカニズムにおいて、活性化 Kupffer 細胞から過剰分泌される TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインの存在が重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、なぜ NASH 発症において Kupffer 細胞が活性化され、TNF- $\alpha$  などの

炎症性サイトカインの過剰分泌が起こるのかといった、本質的かつ重要なメカニズムの解明は十分になされているとは言えない。Kupffer 細胞は、腸管からのエンドトキシンなどにより活性化を受けることが知られており、その活性化に引き続いて TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインを分泌する。NASH でも細菌 lipopolysaccharide (LPS) など腸管からのエンドトキシンが、肝炎発症において重要な病因となっていることが指摘されており、LPS による Kupffer 細胞活性化による過剰な炎症性サイトカイン分泌が、NASH 発症に重要であると想定されている。しかし、Kupffer 細胞からのサイトカイン過剰分泌と食食能低下という一見矛盾した状態が同時に存在するメカニズムについては明らかとされていない。

そこで、Kupffer 細胞の 2 面性功能異常の状態とその発生メカニズムについて説明するとともに、NASH の病因・病態における食食能の機能異常からみた Kupffer 細胞の役割、重要性について検討を行うことが今回の研究目的である。

### 3. 研究の方法

我々は北海道大学獣医学部放射線学教室との共同研究によりネズミ用 MRI 装置を用いた SPIO-MRI にて MCD (メチオニン・コリン欠乏) 食誘発 NASH ラットにおける Kupffer 細胞の食食能の機能異常を評価した。また、蛍光ビーズ食食実験などの手法にて MCD 食誘発 NASH ラットの Kupffer 細胞食食能についても検討を行った。さらに、別の NASH ラットでも同様のことを確認するために、肥満 Zucker ラットを用いて同様の検討を行った。次に、ラットモデルで確立した SPIO-MRI 撮影方法を用いて NASH 患者についても同様の評価を行い、C 型慢性肝炎患者や正常ボランティアと比較検討を行った。さらに、NASH の Kupffer 細胞は C 型慢性肝炎や正常肝と比べ膨化していることがこれまでの我々の検討から判明しており、Kupffer 細胞食食能の低下と形態的膨化には関連があることが予想されている。このため、MCD 食誘発 NASH ラットおよび肥満 Zucker ラットを用いて、Kupffer 細胞の形態学的変化に影響を及ぼす因子の同定、検討を行った。

### 4. 研究成果

NASH ラットモデルにて Kupffer 細胞の食食能低下を蛍光ビーズ食食実験および SPIO-MRI を用いた実験にて明らかにし、NASH 患者でも同様の病態が起きている事を SPIO-MRI 解析にて明らかにした。

人工呼吸器にて NASH ラットの呼吸数と MRI の回転数を同期させた後、SPIO を静脈投与し、スピンエコー法にて肝臓における

取り込みを MRI シグナル低下度として検出した。その結果、コントロール群と比べ NASH ラットではその低下度が明らかに減弱していた。

図 1 : SPIO-MRI による Kupffer 細胞食食能の評価 (# $p < 0.05$ , ## $p < 0.05$ , § $p > 0.05$ , §§ $p < 0.05$ )

次に、NASH ラットに蛍光ビーズを静脈投与し、1 時間後に肝臓 Kupffer 細胞に食食されている蛍光ビーズを数えることで、Kupffer 細胞の食食能を評価した。その結果、コントロールラットに比べ、NASH ラットでは明らかに取り込みビーズの数は少なく、食食能が低下していることが明らかとなった。

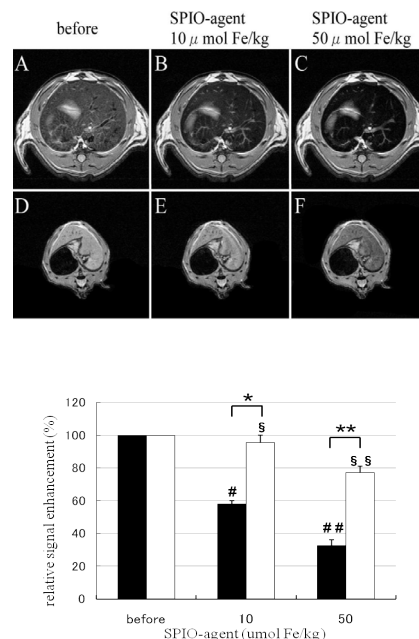


図 2 : Kupffer 細胞による蛍光ビーズの取り込み数 (\* $p < 0.005$ )

また、肝生検にて診断の確定した非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者における SPIO-MRI の低下率は、C 型慢性肝炎患者や正常ボランティアよりも減弱しており、Kupffer 細胞食食能が低下していることが明らかとなった。また、その SPIO-MRI 低下率は、肝脂肪化の程度と相関があり、脂肪化が強い NAFLD ほど Kupffer 細胞の食食能が低下していることが明らかとなった (図 3)。さらに、NASH と診断のついた症例においても、脂肪化の程度が単純性脂肪肝よりも軽度の場合には Kupffer 細胞の取り込みは良好な傾向であった。

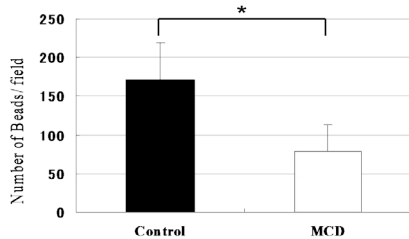
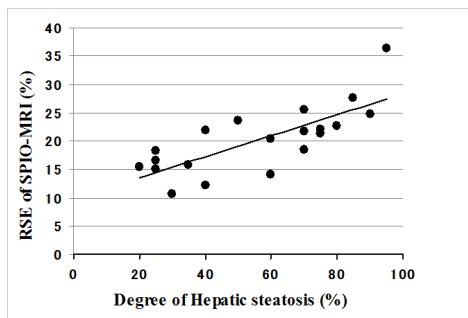


図3：非アルコール性脂肪性肝疾患患者における SPIO-MRI 低下率と肝脂肪化との関連

以上の結果より、NASH 肝における Kupffer 細胞の貪食能はC型慢性肝炎や正常肝に比べ、低下しており、脂肪化の強い脂肪肝患者ほどその傾向が顕著であることが明らかとなった。Kupffer 細胞のこの異常状態が NASH の病因・病因に重要である可能性が示唆された。



## 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 13 件)

- ① Sumida Y, Ono M, Saibara T, Kawada N, (18 名中 5 番目) ; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD) : A simple clinical scoring system using ferritin, fasting, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol [Epub ahead of print] 査読有, [IF: 2.909]
- ② Ogasawara M, Hirose A, Ono M (6 名中 3 番目) : A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet. Liver Int. 査読有, 31(4)2011, 542-51
- ③ Ono M, Okamoto N, The latest idea in NAFLD/NASH pathogenesis. Clin J

Gastroenterol. 査読有, (3) 2011, 263-270

- ④ Asanuma T, Ono M, Kubota K, Saibara T, (12 名中 2 番目) : Super paramagnetic iron Oxide MRI shows defective kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. Gut, 査読有, 59 : 258-266, 2010.
- ⑤ 岡上武, 西原利治, 小野正文 (9 名中 3 番目) : 日本肝臓学会コンセンサス神戸 2009:NASH の診断と治療. 肝臓, 査読無, 50 : 741-747, 2009. (特別寄稿)

[学会発表] (計 19 件)

- ① Ono M : Angiotensinogen gene haplotype associate with the prevalence of Japanese NASH. 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Poster, 2011. 3. 30.-4. 3., Berlin Germany.
- ② Ono M, Gold-thioglucose with high fat dies provides comprehensive mice models of NASH. , 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 2010. 4. 14, Reed Messe Wien Exhibition & Congress Center (Austria)
- ③ 小野正文, 遺伝子ハプロタイプから見た NASH 治療標的としての angiotensinogen. 第14回肝臓学会大会、第52回日本消化器病学会大会合同シンポジウム、2010. 10. 14、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ 小野正文 : クラウド・コンピューティングを駆使した遠隔地の多施設共同研究の試み -Japan Study Group for NAFLD (JSG-NAFLD) の試み. 第5回医療の質・安全学会学術集会., 2010. 11. 27. 幕張.
- ⑤ 小野正文 : 非アルコール性脂肪性肝疾患と高尿酸血症に対するエストロゲンの影響について. 第6回消化器病における性差医学・医療研究会. 2010. 7. 17. 東京.
- ⑥ Ono M : The evaluation of hepatic mitochondrial fatty acid beta-oxidation in nash patients using <sup>123</sup>I-BMIPP scintigraphy. EASL special conference NAFLD/NASH and related metabolic disease. Poster, 2009. 9. 25. Bologna Italy.
- ⑦ Ono M : Novel comprehensive animal models of NASH treated with gold-thioglucose. The 60th Annual meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Poster, 2009. 11. 2. Boston USA.
- ⑧ 小野正文 : 検診受診者における NASH の高リスク群の同定. 第51回日本消化器病学

会大会. シンポジウム「メタボリック症候群における肝障害」, 京都, 2009.

- ⑨ 小野正文: 123I-BMIPP 肝脂肪酸代謝シンチを用いた非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の脂肪酸 $\beta$ 酸化の解析とその有用性について. 第38回日本肝臓学会西部会. シンポジウム「NASH研究の最前線」, 2009. 12. 4. 鳥取.
- ⑩ 小野正文: ゴルジ装置の機能に影響を与える遺伝子の遺伝子多型は風船様肝細胞の危険因子である. 第95回日本消化器病学会総会. ワークショップ「NAFLDの経時的進展」, 2009. 5. 9. 札幌.
- ⑪ 小野正文: NASHの発症機序. 第45回日本肝臓学会総会. コンセサスミーティング「NASH」, 2009. 6. 4. 神戸.

[図書] (計7件)

- ① 小野正文, 他中外医学社, 6 非アルコール性脂肪性肝疾患, 林紀夫・日比紀文・上西紀夫・下瀬川徹編, Annual Review 2011, 146-151
- ② 西原利治, 小野正文, 南山堂, NASH (非アルコール性脂肪肝炎), 薬局 増刊号 病気と薬パーフェクトブック, 2010, 464-465
- ③ 西原利治, 小野正文, 中外医学社, 現場の疑問に答える 肝臓病診療 Q&A, 2009, 231-233
- ④ 西原利治, 小野正文, 南山堂, 薬局 増刊号 病気と薬パーフェクト BOOK 2009, 384-386

[その他]

ホームページ等

<http://www.kochinai.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 正文 (ONO MASAFUMI)  
高知大学・教育研究部医療学系・講師  
研究者番号: 70304681

### (2) 連携研究者

西原 利治 (SAIBARA TOSHIJI)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号: 60145125