

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590433

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪性肝炎と原発性胆汁性肝硬変の発症過程における類似性

研究課題名（英文） Sharing pathogenic mechanism between non-alcoholic steatohepatitis and primary biliary cirrhosis

研究代表者

常山 幸一（TSUNEYAMA KOICHI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：10293341

研究成果の概要（和文）：高齢肥満女性非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）患者に原発性胆汁性肝硬変（PBC）に似る炎症像や自己抗体が合併しやすい傾向が認められた。高齢雌 NASH モデル動物では約1/3に門脈域の炎症や胆管障害、抗核抗体が出現したが、PBC モデル動物に NASH 様病変は認められなかった。NASH モデル動物では内臓脂肪に TNF- α や IL6-陽性のマクロファージが集簇し、これら炎症性サイトカイン値はエストロゲンの前処置で低下し、プロゲステロンで上昇した。高齢肥満女性では炎症性サイトカインの作用がホルモン不均衡で増強され、胆管障害や門脈域の炎症を生じていると推測された。

研究成果の概要（英文）：Pathological characteristics of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and primary biliary cirrhosis (PBC) were examined. Obese female NASH patients of the older age have a tendency to show PBC-mimicking biliary damages, portal inflammation as well as autoantibodies. Similar pathological changes were observed in older aged female NASH mice model. In contrast, NASH features were not observed in any PBC model mice. In visceral fat of NASH mice model, TNF- α or IL6-positive macrophages aggregation was detected. In drug-induced liver injury mice model, estrogen pretreatment reduced inflammatory severity, while progesterone pretreatment enhanced it. We hypothesized that effects of inflammatory cytokines in the obesity women were enhanced by hormonal imbalance, and easy to cause biliary damages and portal inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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、NASH,PBC,酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

「病は時代を映す鏡」と言われるが“メタ

ボリック症候群 (MS)” は全身に多彩な疾患を惹起するが、肝臓での表現型は非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) と呼ばれ、その重篤型である NASH は肝硬変、肝細胞癌へ進展する難治性進行性疾患である。我々はこれまでに、ヒト NASH 患者の肝組織や複数の NASH モデル動物を用い、NASH の病態生理を病理学的に探索してきた。その過程で、NASH モデル動物の門脈域に、炎症細胞浸潤が目立ち、胆管障害を伴う例がしばしば出現する事に気付いた。興味深い事に、これらの所見は原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の門脈域の炎症像に極めて類似するものであった。PBC は抗ミトコンドリア抗体 (抗 PDC-E2 抗体) の高頻度の発現と、免疫介在型胆管障害を基本像とする自己免疫性肝疾患である。ヒトにおいても自己抗体の出現を伴う NASH 症例をしばしば経験するが、文献的に PBC と NASH の合併について検証した報告はない。

本研究では、“NASH と PBC の胆管障害の出現の関連性” について、NASH モデル動物、PBC モデル動物を用いて病理学的見地から検証する。

2. 研究の目的

原発性胆汁性肝硬変 (PBC) は中年女性に好発する難治性肝疾患である。ミトコンドリア内膜に存在するピルビン酸脱水素酵素群 (PDC) の E2 component を主たる対応抗原とする自己抗体 (抗ミトコンドリア抗体: AMA) がほぼ 100% の症例に出現し、抗核抗体 (ANA) もしばしば出現する。病理組織学的には、小葉間胆管を標的とするリンパ球・形質細胞浸潤による胆管の特異的な破壊が特徴であり、進行例では胆管破壊・消失の結果、胆汁鬱滞が生じ、線維化が進行して肝硬変に至る。PBC との類縁疾患として自己免疫性肝炎 (AIH) が知られている。AIH は一般的には ANA 陽性、AMA 陰性であり、肝実質の炎症が主体である。

一方、非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) は、肥満や糖尿病、高脂血症などのメタボリックシンドロームの諸症状を背景に、肝臓に脂肪が沈着する疾患であり、進行性・不可逆性に肝硬変まで進展する症例は、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と呼ばれている。元来、PBC と NAFLD/NASH はまったく異なる疾患であると考えられてきた。しかしながら、最近、臨床的に PBC や AIH と診断された症例が、肝生検によって NASH と病理診断される例をしばしば経験する。本研究では最近 10 年間に経験しえたヒト NASH 症例を再検討し、“NASH with autoimmune feature” の臨床病理学的特徴を明らかにするとともに、そのメカニズムについて、種々の動物モデルを用いて解析した。

3. 研究の方法

(1) ヒト NASH 症例の再検討

富山大学附属病院、および関連施設で 2002 年以降に肝生検が施行され、病理組織学的に NASH と診断された 54 症例を対象とし、臨床的に ANA 陽性、IgG 高値、AMA 陽性などが指摘され、AIH、或いは PBC と臨床診断されていた 26 症例を NASH with autoimmune feature 群、それ以外の 28 症例を common NASH 群とし、両群間の臨床病理学的特徴を比較検討した。病理組織学的所見は全例を再検討し、門脈域の炎症の程度 (interface hepatitis も含む) と肝実質の炎症の程度を none(-)、minimal(+/-)、mild(+), moderate(++), severe(+++) の 5 段階に分類し、両群間で比較検討した。

NASH with autoimmune feature 群、common NASH 群のそれぞれ 20 症例を抽出し、免疫染色を施行した。

(2) マウスモデルでの検討

① NASH モデルマウスでの検討

異なる機序で発症する 3 種類の NASH モデ

ルマウスを用い、自己免疫機序の出現の有無を検討した。使用するマウスモデルは、A:生後すぐにグルタミン酸ナトリウムを皮下投与して作成した MSG マウス、B: *ddy* マウスから尿糖出現と肥満を指標に系統作出された TSOD マウス、及び C:CDAA 食で飼育されたマウス、の 3 種類とした。いずれも雌雄 3-10 匹を 48 週齢で sacrifice し、AIH、或いは PBC 様の肝組織像の出現の有無を検討した。炎症が認められた個体では、胆管障害の有無、浸潤炎症細胞のプロフィール等を免疫染色で同定した。また、MSG マウス、CDAA マウスの一部では血清も採取し、抗核抗体、及び抗ミトコンドリア抗体の出現の有無を検討した。

②PBC モデルマウスでの検討

従来検討してきた PBC モデル動物のうち、Dominant negative TGF- β receptor II KO mice, 2-octynoic acid induced mice, IL-2 receptor α KO mice, scurfy mice の 4 種類の PBC モデルマウスの肝臓 HE 染色標本を全例再検討し、NASH 様病変の有無を検討した。

③薬剤性肝障害モデルマウスでの検討

女性ホルモンと肝障害の関連を検討する目的で、halothane で誘導した薬剤性肝障害モデルにエストロゲン、もしくはプロゲステロンを前処置し、肝病変や炎症性サイトカイン値を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト NASH 患者の臨床病理学的特徴

NASH with autoimmune feature 群と common NASH 群の臨床病理学的特徴を表 1 に示す。

54 cases showing NASH with or without autoimmune features collected from several hospitals in Toyama, Japan

NASH with autoimmune features 26 case		(common NASH) (28cases)
Clinical Dx.	21 cases :AIH susp. 4 cases: PBC susp. 1 case: AIH-PBC overlap. Susp.	
Sex: Male : Female	5:21	(16:12)
Age:	60.4 \pm 10.3	(49.9 \pm 15.8)
GOT:	68 \pm 43	(67 \pm 32)
GPT:	84 \pm 72	(119 \pm 113)
ANA:	23/26 cases > x80 (8 cases > x320)	
AMA:	6/26 cases positive	
Obesity:	23/26 cases	
Other metabolic features:	DM, HT, RA, etc	

Common NASH 群では男 : 女が 16:12 と男性優位であり、年齢は平均 49.9 \pm 15.8 歳なのに対し、NASH with autoimmune feature 群は男 : 女が 5:21 と圧倒的に女性に多く、生検診断時の年齢も平均 60.4 \pm 10.3 歳で、通常の NASH 症例よりも高齢であった。NASH with autoimmune feature 群には基礎疾患として肥満が 23/26 例 (88.5%) と高率に認められた。NASH with autoimmune feature 群の臨床診断は AIH が 21/26 例 (80.8%) を占め、PBC が 4/26 例 (15.4%)、AIH+PBC が 1/26 例 (3.8%) であった。

トランスアミナーゼ値は、NASH with autoimmune feature 群が GOT:68.1 \pm 42.9、GPT:84.0 \pm 71.5 であるのに対し common NASH 群では GOT:66.5 \pm 32.1、GPT : 119.3 \pm 113.1 であり、両群に有意差は認められなかった。門脈域の炎症の程度 (interface hepatitis も含む) と肝実質の炎症の程度を比較すると、autoimmune feature を示す NASH 症例の方が common NASH 群よりも門脈域の炎症が重篤である傾向が認められた。autoimmune feature を示す NASH 症例には、PBC に極めて類似する強い門脈域の炎症や胆管障害像がしばしば認められた。

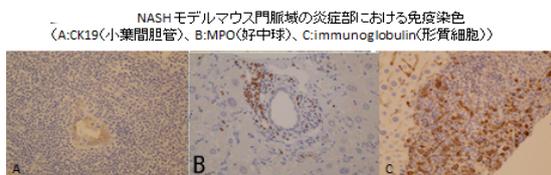
(2) 3 種類のマウス NASH モデルの病理組織像と自己抗体の出現

いずれのマウスも、オスには著明な実質炎や門脈域の炎症、胆管障害などは認められなかった。一方、メスでは、MSG マウス 2/6 匹 (33%)、TSOD マウス 3/10 匹 (30%)、CDAA マウス 2/6 匹 (33%) において、門脈域の強い炎症細胞浸潤や胆管障害像、強い実質炎などが認められた (図 1-A, B, C)

NASHモデルマウスに認められたPBCに類似する組織像
(A:MSGマウス、B:TSODマウス、C:CDAAマウス)



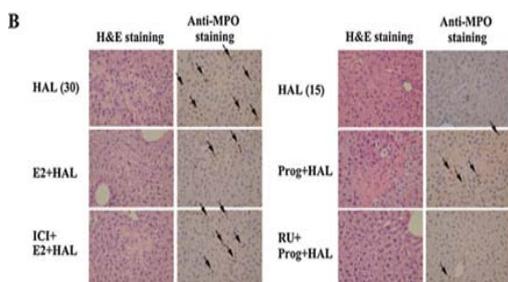
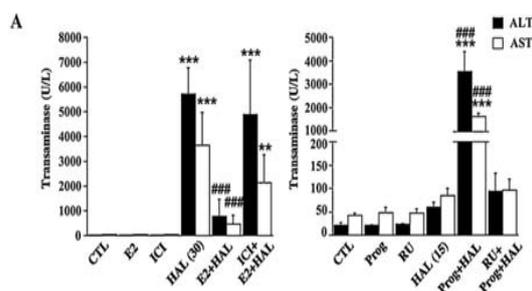
免疫染色の結果、小葉間胆管の障害像 (CK19 染色 : 図 2A) が確認され、ヒト PBC の非化膿性破壊性胆管炎に似る組織像を呈していた。門脈域への好中球浸潤像 (MPO 免疫染色 : 図 2B) や形質細胞浸潤 (immunoglobulin' s 免疫染色 : 図 2C) も確認された。



MSG マウス、CDAA マウスの血清を蛍光抗体法で確認したところ、門脈域の炎症や胆管障害が認められた症例 (MSG マウス 3 匹中 1 例、CDAA マウス 3 匹中 1 例) において、ANA 陽性像が確認された。AMA はいずれの個体にも確認できなかった。

一方、検索した限り、いずれの PBC モデル動物においても NASH を示唆する病理学的所見は認められなかった。

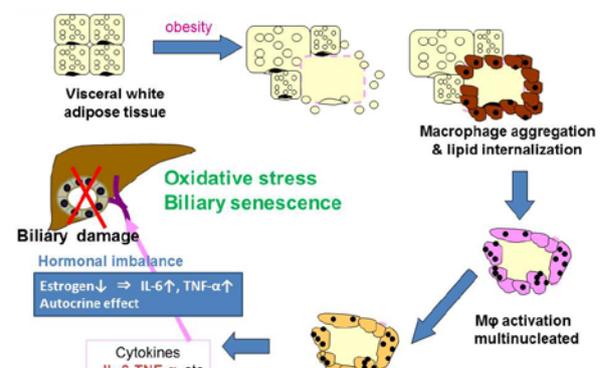
Halothane で誘導したマウス薬剤性肝障害モデルに estrogen を前処置すると、病態が軽快するのに対し、progesteron を前処置すると病態が増悪した (図 3)。



以上より、中年期以降のホルモンのアンバランスが肝病変形成に大きく関与していると推察された。

肥満を有する中高年女性 NASH 患者に autoimmune feature が出現する理由の 1 つとして、我々は酸化ストレスの亢進と炎症性サイトカインの関与の可能性を考えている。肥満患者では内臓脂肪における酸化ストレスの亢進や内臓脂肪に集簇するマクロファージによる TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生亢進が知られている。我々も、NASH モデル動物 (TSOD マウスや MSG マウス) の内臓脂肪に集簇するマクロファージが、TNF- α 、IL-6 などの炎症性サイトカインを発現することを報告している。

一方、肝臓では胆管上皮に TNF- α 受容体や IL-6 受容体が発現していることが知られている。内臓脂肪で産生された各種炎症性サイトカインが大循環、或いは門脈血流を介して肝臓に到達した場合、胆管を標的とする炎症が惹起される可能性が考えられた。



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 56 件)

- ① Shimoda S, Tsuneyama K, et al. The role of natural killer (NK) and NK T cells in the loss of tolerance in murine PBC. Clin Exp Immunol. 2012

- Jun;168(3):279-284. in press 查読有
- ② Fujimoto M, Tsuneyama K, et al. Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2012 in press 查読有
- ③ Toyoda Y, Endo S, Tsuneyama K, et al. Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury. *Toxicol Sci.* 2012 Mar;126(1):16-27. 查読有
- ④ Jin Q, Moritoki Y, Lleo A, Tsuneyama K, et al. Comparative analysis of portal cell infiltrates in AMAy-positive versus AMA-negative PBC. *Hepatology.* 2012 May;55(5):1495-506. 查読有
- ⑤ Tsuneyama K, et al. Advantages and disadvantages of hyperbaric oxygen treatment in mice with obesity hyperlipidemia and steatohepatitis. *ScientificWorldJournal.* 2011;11:2124-35. 查読有
- ⑥ Tsuneyama K, et al. Pathological features of new animal models for primary biliary cirrhosis. *Int J Hepatol.* 2012;2012:403954. 查読有
- ⑦ Toyoda Y, Miyashita T, Endo S, Tsuneyama K, et al. Estradiol and progesterone modulate halothane-induced liver injury in mice. *Toxicol Lett.* 2011 Jul 4;204(1):17-24. 查読有
- ⑧ Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, et al. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology.* 2011 Mar;53(3):915-25. 查読有
- ⑨ Moritoki Y, Tsuda M, Tsuneyama K, et al. B cells promote hepatic inflammation, biliary cyst formation, and salivary gland inflammation in the NOD.c3c4 model of autoimmune cholangitis. *Cell Immunol.* 2011;268(1):16-23. 查読有
- ⑩ Dhirapong A, Lleo A, Yang GX, Tsuneyama K, et al. B cell depletion therapy exacerbates murine PBC. *Hepatology.* 2011 Feb;53(2):527-35. 查読有
- ⑪ Zhang W, Tsuda M, Yang GX, Tsuneyama K, et al. Deletion of interleukin-6 in mice with the dominant negative form of transforming growth factor beta receptor II improves colitis but exacerbates autoimmune cholangitis. *Hepatology.* 2010 Jul;52(1):215-22. 查読有
- ⑫ Fujimoto M, Tsuneyama K, et al. The traditional Japanese formula keishibukuryogan reduces liver injury and inflammation in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1190:151-8. 查読有
- ⑬ Selmi C, Tsuneyama K. Nutrition, geoepidemiology, and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2010 Mar;9(5):A267-70. 查読有
- ⑭ Moritoki Y, Lian ZX, Lindor K, Tuscano J, Tsuneyama K, et al. B-cell depletion with anti-CD20 ameliorates autoimmune

cholangitis but exacerbates colitis in transforming growth factor-beta receptor II dominant negative mice. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1893-903. 査読有

- ⑮ Yoshida K, Yang GX, Zhang W, Tsuda M, Tsuneyama K, et al. Deletion of interleukin-12p40 suppresses autoimmune cholangitis in dominant negative transforming growth factor beta receptor type II mice. *Hepatology*. 2009 Nov;50(5):1494-500. 査読有
- ⑯ Zhang W, Moritoki Y, Tsuneyama K, et al. Beta-glucosylceramide ameliorates liver inflammation in murine autoimmune cholangitis. *Clin Exp Immunol*. 2009 Sep;157(3):359-64. 査読有

[学会発表] (計 19 件)

- ① 常山幸一、他、自然発症肥満・糖尿病・NASH モデル(TSOD)マウス脾臓における異常鉄沈着の病理組織学的検討、第 100 回日本病理学会総会、2011, 4, 28-3、東京
- ② Tsuneyama K, Autoimmune biliary damages and NASH. 2010 Immune-Mediated Digestive Diseases Forum (招待講演), 2010. 6. 12, Beijing, China
- ③ Tsuneyama K, Evidence-based efficacy of Chinese herbal medicine and functional foods in animal models of metabolic syndrome associated liver diseases. The 5th Symposium of TCM Pharmaceuticals of WFCMS (招待講演), 2010. 10. 23, Suzhou, China
- ④ 常山幸一、他、自然発症肥満・糖尿病モデル(TSOD)マウスに発症する NASH

様肝病変の発症機序の解明、第 99 回日本病理学会総会、2010. 4. 29、東京

- ⑤ Tsuneyama K, New animal models for Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) based on metabolic syndrome, 中国消化器病学会(招待講演)、2009. 12. 5、広州(中国)
- ⑥ Tsuneyama K, New Animal model of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) based on Metabolic Syndrome: MSG mice & TSOD mice. Changchun international digestive disease and liver disease peak forum(招待講演), 2009. 5. 2、長春(中国)
- ⑦ 常山幸一、他、自然発症肥満・糖尿病モデル(TSOD)マウスの肝病 NAFLD/NASHモデルとしての有用性、第98回日本病理学会総会、2009. 5. 2、京都
- ⑧ Tsuneyama K, et al. TSOD mouse: a new spontaneous model of nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma associated with obesity, type 2 diabetes, and hyperlipidemia, 第20回アジア太平洋肝臓会議, 2010. 3. 25、北京(中国)
- ⑨ Tsuneyama K. Pathological characterization of new animal models of Primary Biliary Cirrhosis. 2010 International Seminar on Digestive Diseases. 2010. 3. 26, 北京(中国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常山 幸一 (TSUNAYAMA KOICHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号 : 1029341