

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 10 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890207

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝疾患の発症・進展におけるスカベンジャー受容体発現細胞の意義

研究課題名(英文)Pathologic significance of scavenger receptor expressing cells in nonalcoholic fatty liver disease

研究代表者

伊倉 義弘 (Ikura, Yoshihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・その他

研究者番号：00240953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)では酸化ストレスが病理進展機序の一端を担うと考えられるが、その詳細は未だ不明のままである。酸化ストレス傷害の一様式である肝細胞風船様変性は、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)診断の要件となっているが、判別に難渋することが稀でない。本研究はユビキチン免疫組織化学染色の併用がNASH病理診断に有用であることを示した。さらに其の様にして正確に診断されたNASH/NAFLD組織標本において、スカベンジャー受容体を介しマクロファージに取り込まれる酸化リン脂質の局在が腫瘍壊死因子産生と密接に関連することが示され、酸化ストレス悪循環回路形成の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although oxidative stress is recognized to contribute to the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), detailed pathologic mechanisms are still obscure. Ballooning degeneration, which is considered to be a manifestation of oxidative injury, is required for diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). However, identification of ballooned hepatocytes is not easy even for expert pathologists. The present study indicated usefulness of ubiquitin immunostaining as a complementary diagnostic tool for NASH/NAFLD. Furthermore, in liver specimens diagnosed as NASH/NAFLD correctly by this diagnostic procedure, a close association between macrophage scavenger receptor-mediated oxidized phospholipid accumulation and tumor necrosis factor alpha production in macrophage was shown immunohistochemically. The result suggests a possibility that a vicious circle of oxidative stress is formed in livers of NASH/NAFLD.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝疾患 酸化ストレス ユビキチン スカベンジャー受容体 酸化リン脂質 腫瘍壊死因子 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 嘗てアルコールの過剰摂取によらない肝臓の脂肪化は、全くの良性～適応反応の範疇、すなわち真の「病氣」ではないと見なされ、ほとんど注目されてこなかった。しかしながら 1980 年 Ludwig による非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の提唱以来、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の疾患概念が形作られ、メタボリックシンドローム (MS) 患者の増加も相俟って、MS の肝臓における表現型であること、即ち「病氣」としての認識が、ここ数年急速に広まっている。

(2) MS 関連疾患の代表である動脈硬化症との疾患背景の類似性から、NASH / NAFLD の進展機序には、高脂血症や高血糖に基づく諸因子の刺激により活性化したマクロファージ ($M\phi$) の関与が強く示唆されている。 $M\phi$ は細胞表面に発現するスカベンジャー受容体 (SR) を介して種々の血中物質や細胞塵などを取り込み、これら进行处理する。NAFLD においても酸化ストレスにより傷害を受けた肝細胞の処理機構に関与すると考えられるが、一方で活性化 $M\phi$ はそれ自身が酸化ストレス発生源であり、肝細胞傷害をさらに促進している可能性がある。

(3) 酸化ストレスに基づく NAFLD 特異的な肝細胞傷害の様式として風船様変性が知られており、NASH 診断の要件となっている。風船様変性は細胞質の淡明化を伴った、正常肝細胞の 1.5 倍をこえる肝細胞の変性腫大と明確に定義されているが、判別に苦慮するケースも稀ではない。この NASH 診断の難しさが NASH / NAFLD の病態および疾患機序解明を阻む大きな要因となっている。

(4) 上述の如く、酸化ストレスは NAFLD の発症・進展に中心的な役割を果たすと考えられているが、病理メカニズムへの関与の詳細は不明のままである。数多くの要因の関与が示唆されており、強力な炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF)- α は最も重要な因子の 1 つと理解されている。TNF- α による酸化ストレスが肝細胞に酸化傷害を与え、傷害細胞・細胞塵中の過酸化脂質 (酸化リン脂質; oxPL) は SR を介して $M\phi$ に取り込まれる。その結果 $M\phi$ はさらに炎症傷害性を強め、NAFLD 進展に深く関与すると推察される。

2. 研究の目的

(1) NAFLD の風船様変性肝細胞中に観察される Mallory-Denk 小体 (MDB) に着目し、その免疫組織化学的検出法であるユビキチン染色の NASH 診断における有用性を検証する。

(2) 上記により、より精緻な診断の再検討が行われた NAFLD 患者肝組織を用いて、活性化 $M\phi$ の NAFLD 病理メカニズムへの関与を、特に SR を介した $M\phi$ による oxPL 取り込みと炎症性サイトカイン TNF- α 産生を軸に、究明する。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン染色有用性の検証

NAFLD 患者 30 名 (女性 23 名, 男性 7 名; 年齢 60 ± 12 歳) から得られた肝生検組織を対象に、以下の病理組織学および免疫組織化学的検索を施行した。

肝組織は採取後に緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋薄切片とした。作成された切片は形態学的観察のための通常染色 (ヘマトキシリン・エオジン染色, アザン・マロリー染色) ならびに抗ユビキチン・ウサギポリクローナル抗体 (DAKO 社製; 400 倍希釈) および抗サイトケラチン 18・マウスモノクローナル抗体 (DC10, DAKO 社製; 希釈済抗体) を用いた免疫組織化学に供した。

疾患の組織学的重症度は Matteoni 分類および NAFLD 活動性スコア (NAS) により評価した。ユビキチン陽性の肝細胞内封入体は、無 (0)、少数 (1)、多数 (2) の 3 段階評価を行った。相関性の有無の分析には、ノンパラメトリック検定法であるスピアマン順位相関検定を用いた。

(2) $M\phi$ における oxPL 局在と TNF- α 産生

上記のユビキチン陽性封入体の検討により NASH / NAFLD の診断を確定でき、さらに検討に必要な十分枚数の薄切片を確保し得た肝生検標本に対し、以下の免疫組織化学染色を行った。

各種炎症細胞マーカーに加え、抗 oxPL 抗体 (Avanti Polar Lipids 社製) および抗 TNF- α 抗体 (abcam 社製) を用いた免疫組織化学単染色 / 二重染色を行った。染色陽性細胞数は画像解析ソフト (MacScope、三谷商事) を用いて計測し、NAS や臨床データとの関連性の有無を調査した。データ分析にはスピアマン順位相関検定 (R_s) を使用した。

4. 研究成果

(1) ユビキチン染色

30 症例中 22 例は Matteoni type 4 の NASH、風船様変性が典型的でなく若干不明瞭であったため NASH 疑いとされたものが 3 例、そして 4 例は Matteoni type 2 の単純性脂肪肝であった。残る 1 例は肝硬変であり、恐らく burnt-out NASH であると考えられた。NAS 平均値 (\pm SD) は $4.8 (\pm 1.8)$ 、線維化 stage の平均は $2.3 (\pm 1.1)$ であった。

形態学的に検知可能な MDB は 30 例中 6 例のみであった。対照的にユビキチン陽性封入体は、MDB よりも多くの 22 例に認められた。ユビキチン陽性封入体は症例個々においても MDB より多数、主として風船化肝細胞中に検出された (図 1 A, B)。サイトケラチン 18 陽性であり、本質的には MDB と同一物と考え

られた(図1C)。さらにユビキチン陽性封入体の存在は、肝細胞の風船様変性ときわめて密接に関連した(図2)。

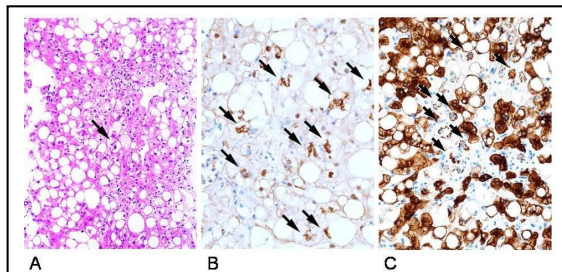


図1. MDBとユビキチン陽性肝細胞内封入体。NASH肝組織において、ユビキチン陽性肝細胞内封入体(B矢印;抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色)はMDB(A矢印;ヘマトキシリン・エオジン染色)よりも数多く観察される。同封入体はサイトケラチン18陽性(C矢印;抗サイトケラチン18抗体を用いた免疫染色)を示し、本質的にはMDBと同一物と考えられる。

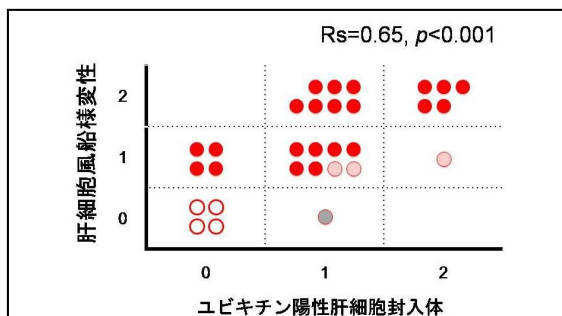


図2. ユビキチン陽性肝細胞内封入体と肝細胞風船様変性の関連性。ユビキチン陽性肝細胞内封入体と肝細胞風船様変性の間には有意な相関性が認められた($R_s=0.65$, $p<0.001$; スピアマン順位相関検定)。赤: NASH, 淡紅: NASH 疑診, 灰色: burnt-out NASH, 白: 単純性脂肪肝。

先述の NASH 疑診3例および burnt-out NASH 肝硬変の1例では、ユビキチン陽性封入体の検出により、NASH の診断をより確定的なものとすることができた(図3, 4)。

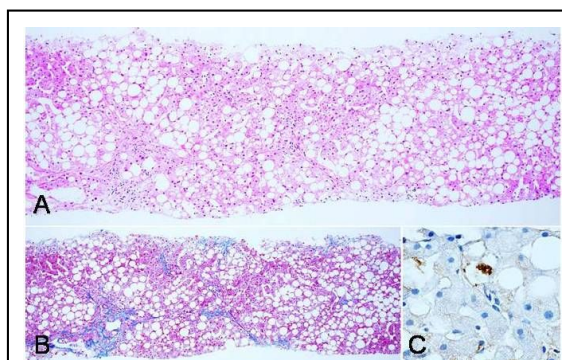


図3. NASH 疑診例。通常染色(A:ヘマトキシリン・エオジン染色, B:アザン・マロリー染色)ではNASHと診断確定できなかった症例。脂肪化, 炎症反応, 線維化は見られるものの肝細胞風船様変性が明瞭でなく, 疑診にとどまったが, ユビキチン陽性肝細胞内封入体の検出(C:抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色)により最終的にNASHと診断し得た。

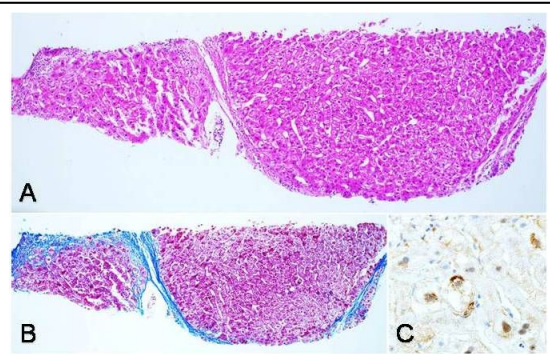


図4. 肝硬変/burnt-out NASH 症例。完成した肝硬変(B:アザン・マロリー染色)であり, 脂肪化も消褪しているため(A:ヘマトキシリン・エオジン染色)肝硬変の原因を特定出来なかったが, ユビキチン陽性肝細胞内封入体の検出(C:抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色)により burnt-out NASH であることが強く示唆された。

(2) oxPL と TNF-

NAFLD 肝組織において oxPL は、脂肪化肝細胞および $M\phi$ /クッパー細胞(図5A)にその局在が観察され、脂肪化肝細胞の酸化傷害過程および血中酸化脂質の取り込み・細胞内蓄積を反映すると考えられた。oxPL 陽性細胞数($41 \pm 21/\text{mm}^2$)は NAS との間に有意な相関を示した(図5B)。

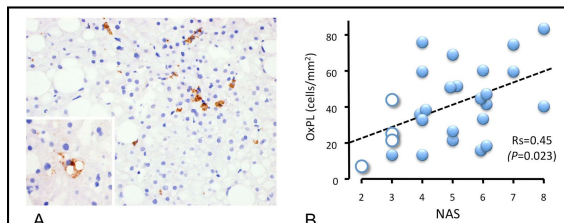


図5. NAFLD 肝組織における oxPL 局在。A: 抗 oxPL 抗体を用いた免疫染色。脂肪化肝細胞(inset)および $M\phi$ /クッパー細胞が陽性(茶色)を呈している。B: oxPL 陽性細胞数と NAS の関連性($R_s=0.45$, $p=0.023$; スピアマン順位相関検定)。青: NASH, 白: 単純性脂肪肝。

TNF- は $M\phi$ /クッパー細胞に発現しており(図6A) 陽性細胞数($5.1 \pm 3.3/\text{mm}^2$)は NAS (図6B) および血中アミノトランスフェラーゼ値 [ALT ($R_s=0.60$; $p=0.002$) / AST ($R_s=0.55$; $p=0.005$)] と相関した。

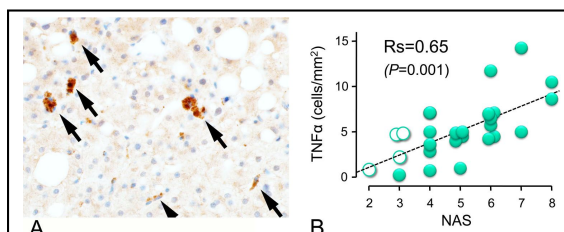
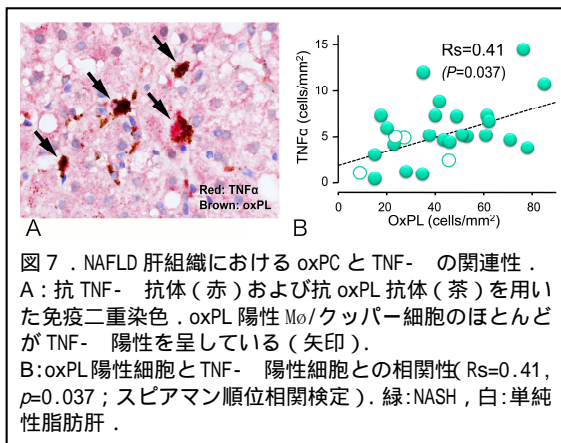


図6. NAFLD 肝組織における TNF- 局在。A: 抗 TNF- 抗体を用いた免疫染色。 $M\phi$ /クッパー細胞が陽性(茶色; 矢印)を呈している。B: TNF- 陽性細胞と NAS の関連性($R_s=0.65$, $p=0.001$; スピアマン順位相関検定)。緑: NASH, 白: 単純性脂肪肝。

TNF-陽性細胞数はまた、oxPL陽性細胞数との間にも有意な相関(図7B)を示し、TNF-発現マクロファージ/クッパー細胞のほとんどがoxPL局在を伴い免疫染色二重陽性像を呈した(図7A)。



以上の研究結果は、NAFLD肝組織におけるoxPL局在とTNF-α発現との密接な関連性を明らかにし、さらに両因子の相互連関による酸化ストレス悪循環回路形成がNAFLD/NASHの発症・進展プロセスに関与している可能性を示していると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Ikura Y. Transitions of histopathologic criteria for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease in the past three decades. *World J Hepatol* 2014 (in press) (査読有)

伊倉義弘, 金守良, 中島英信, ほか. 非アルコール性脂肪性肝炎の病理診断におけるユビキチン陽性封入体検索の意義について. *愛仁会医学研究誌* 2013;45:53-57. (査読有)

[学会発表](計6件)

伊倉義弘, 大須賀達也, 中島英信, ほか. 非アルコール性脂肪性肝疾患における酸化リン脂質の局在とTNF-α発現の関連性について. 第50回日本肝臓学会総会(東京)2014年5月30日

Ikura Y, Iwai Y, Muragaki Y. A close association between localization of oxidized phospholipids and expression of TNF-alpha in livers of patients with nonalcoholic fatty liver disease. 第49回欧州肝臓学会総会(ロンドン)2014年4月11日

金守良, 伊倉義弘, 井本勉, ほか. C型肝炎著効後、新規NASH発症が組織学的検索により強く疑われた非肥満患者の一症例. 第40回日本肝臓学会西部会(岐阜)2013年12月6日

金守良, 井本勉, 伊倉義弘, ほか. 高血圧症、糖尿病を伴い、NASは4点であったがユビキチンの免疫染色が陽性でNASHと

診断した、80歳非肥満女性に発生したHCCの1例. 第40回日本肝臓学会西部会(岐阜)2013年12月6日

伊倉義弘, 金守良, 中島英信, ほか. 非アルコール性脂肪性肝炎の病理診断におけるユビキチン陽性封入体検索の意義について. 第49回日本肝臓学会総会(東京)2014年6月6日

Ikura Y, Kim SR, Iwai Y, et al. Diagnostic values of ubiquitin-positive hepatocellular inclusions in pathologic diagnosis of nonalcoholic steatohepatitis. 第48回欧州肝臓学会総会(アムステルダム)2013年4月27日

[図書](計1件)

伊倉義弘, ほか. 南江堂(東京)肝臓を診る医師のための肝臓病理テキスト. 2013; 315(p.95-110)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊倉 義弘 (IKURA, Yoshihiro)

和歌山県立医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号: 00240953