

学位論文要旨

氏名 兼光 梢

論文名 非アルコール性脂肪肝炎の肝線維化における
B細胞活性化因子の役割

学位論文要旨

【背景と目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患/脂肪肝炎 (NAFLD/NASH) は生活習慣の変化に伴い世界中で急増し、その治療法の確立が急務である。しかし、疾患特異的な薬物療法は存在せず、代謝、炎症、線維形成の複数の経路を標的とした薬剤を開発する必要がある。特に線維化の進行は肝細胞癌、肝硬変などの予後に密接に関連している。これまで B 細胞の分化・生存を促進する B 細胞活性化因子 (BAFF) に着目して研究してきた。その結果、BAFF は NAFLD 患者の重症度と相関し、高脂肪食誘導肥満マウスでは血清 BAFF 濃度が上昇すること、BAFF 欠損マウスでは肝脂肪化が軽減していることを明らかにした。しかし同モデルの肝組織では明らかな炎症や線維化は見られず、BAFF の線維化への関与は不明であった。そのため、炎症、線維化を誘導する新たな NASH モデルマウスを作製し、BAFF の肝線維化への影響を明らかにすることを研究の目的とした。

【材料と方法】

1. オス C57BL6/J (WT) 並びに B6.129S2-Tnfsf13b^{tm1Msc}/J (BAFF 欠損) マウスを、6 週齢から高脂肪高コレステロール食 (20 g%脂肪; 18 g%コレステロール) で飼育し、9 週齢から 4 週間、週 2 回 0.4 ml/kg の四塩化炭素を腹腔内に注射し、13 週齢で血清、脂肪、肝臓を採取した。本動物実験は、愛媛大学大学院医学系研究科等遺伝子組換え実験安全委員会及び愛媛大学動物実験倫理委員会によって承認されている(承認番号 05TI70-16)。
2. 肝組織をオスミウム染色し、脂肪量を定量化した。血清中の AST、ALT、肝内の中性脂肪、コレステロールを測定した。組織標本より NAFLD 活動性スコア (NAS) を算出した。
3. 肝組織において脂肪蓄積により細胞死に陥った肝実質細胞をマクロファージ(Mφ)が取り囲んで貪食・処理する構造と考えられる crown-like structure (CLS) 数を算出した。炎症、Mφ に関する遺伝子発現を real-time RT-PCR で、浸潤する Mφ 分画の割合をフローサイトメトリーで解析した。肝組織を iNOS で染色し、陽性細胞の面積を Image J を用いて解析した。

氏名 兼光 梢

4. 線維化を検討するため、Sirius Red (SR) 染色による陽性面積を測定した。また、肝組織中のコラーゲン含有量を測定し、肝臓における線維化に関連する遺伝子の mRNA 発現を評価した。
5. マウス Mφ 様細胞である RAW264.7 細胞に BAFF を添加し、炎症関連遺伝子の mRNA 発現と NF-κB の活性を評価した。一部の実験では BAFF の結合を阻害する目的で BAFF 受容体 Fc キメラ(BAFF-R Fc)も添加して解析した。
6. C57BL6/J マウスから単離した肝星細胞(HSC)に BAFF を添加し、遺伝子発現の変化を解析した。次に、RAW264.7 細胞に BAFF と LPS を加えて 20 時間培養した。培養上清を単離した HSC に添加し、遺伝子発現の変化を解析した。また、培養上清中の NO、TNFα 濃度を ELISA で解析した。

【結果と考察】

1. 今回作成したモデルは肝臓において、広範囲の脂肪化に加えて、線維化と強い炎症を伴っており、ヒト NASH と類似の組織学的特徴を示した。
2. BAFF 欠損マウスでは WT と比較して、肝脂肪沈着が著明に少なく、肝内中性脂肪・コレステロール含量も少なかった。血清 AST、ALT や肝組織の活動性も低かった。
3. BAFF 欠損マウスは WT と比較して、肝組織における CLS 形成が少なかった。また、浸潤する Mφ に占める CD11c 陽性細胞の割合が少なく、iNOS 発現 Mφ 数も低下していた。TNFα や MCP-1 などの炎症に関する遺伝子発現も弱かった。
4. BAFF 欠損マウスは SR および αSMA 染色陽性面積とコラーゲン含有量は WT に比べて有意に少なかった。また、線維化に関する遺伝子発現も有意に弱かった。
5. RAW264.7 細胞に BAFF を添加すると NF-κB non-canonical 経路が活性化し、TGF-β1、iNOS などの遺伝子発現が増加した。これらは BAFF-R Fc の添加により低下した。
6. RAW264.7 細胞を BAFF+LPS で刺激した培養上清を HSC に作用させると、LPS のみの培養上清に比べて TGF-β1、αSMA などの発現が増加した。BAFF+LPS を添加した培養上清中の NO、TNFα 濃度は LPS のみの培養上清より有意に高かった。

【結論】 NASH マウスモデルにおいて BAFF 欠損は脂肪化、炎症、線維化進展を低下させた。BAFF は Mφ を活性化し、NO や TNFα などの炎症性サイトカインの産生を促すことによって HSC を活性化し、線維化進展に寄与していた。BAFF は NASH の治療標的になりうると考えられる。

キーワード (3~5)	B細胞活性化因子 (BAFF) 非アルコール性脂肪性肝疾患 肝線維化 肝炎症 マクロファージ
-------------	--