

氏 名	石 川 英 樹
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 623 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	非アルコール性脂肪性肝疾患における I κ B ζ の役割
論 文 審 査 委 員	(委員長) 武 藤 弘 行 教 授 (委 員) 海老原 健 准教授 坂 下 英 司 講 師

論文内容の要旨

1 研究目的

近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) が増加の一途をたどっており公衆衛生上の重要な問題となっている。NAFLD は病態の進行が稀な非アルコール性脂肪肝 (Nonalcoholic fatty liver : NAFL) と炎症・線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis : NASH) に分類される。従来、慢性肝疾患の多くはウイルス性肝炎が占めていたが、抗ウイルス薬の開発によるウイルスの制御・克服により減少傾向にある。今後は NASH が慢性肝疾患の多くを占めることが予想されている。NASH は予後不良な肝硬変や肝癌に至ることがあり、さらに心血管イベントや肝外悪性腫瘍の合併の頻度が高いと報告されており治療介入が必要な疾患である。しかし、NAFLD/NASH の発症機序に関してはいまだ不明な点が多く、有効な治療薬もないのが現状である。NAFLD 発症には慢性炎症が深く関与しており、その中核を担うのが転写因子 NF- κ B である。Toll-like receptorなどを介して活性化された NF- κ B は転写因子 I κ B ζ (遺伝子名 : *Nfkbiz*) を産生し、I κ B ζ と協調して IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を促し、炎症を増幅させる。NF- κ B が NASH の病態進展において重要な役割を担っていることは明らかであるが、その下流分子の I κ B ζ がどのような役割を演じているかはわかっていない。そこで、NASH 発症過程において I κ B ζ が炎症を増幅し、NASH 進展に寄与していると仮説を立て、肝細胞特異的に I κ B ζ を欠損あるいは過剰発現したマウスを用いて肝細胞における I κ B ζ の役割を検討した。

2 研究方法

肝細胞特異的 I κ B ζ 欠損マウス (*Alb-Cre;Nfkbiz^{fl/fl}*) は、C57BL/6 をバックグラウンドとした *Nfkbiz^{fl/fl}* マウスと肝細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Alb-Cre マウスを交配させ作製した。対照には *Nfkbiz^{fl/fl}* マウスを使用した。これらのマウスに通常食 (Normal chow diet : NCD) および超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) を給餌して NAFLD モデルとし、肝臓を摘出した。肝細胞における *Nfkbiz* の mRNA 発現量は realtime PCR 法で定量した。また、肝臓の表現型、体重および肝臓重量、肝組織における脂肪沈着 (Hematoxylin&Eosin 染色)、線維化 (Sirius Red 染色)、アポトーシス (TUNEL 染色)、血中リポ蛋白質を解析した。さらに、肝線維化、アポトーシス、炎症・免疫応答に関連する遺伝子の発現およびタンパク質の発現を解析した。

上記とは逆に、肝細胞に I κ B ζ を過剰発現したマウスにおいて NASH 進展過程を検討するために、肝細胞特異的に *Nfkbiz* を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV8) ベクターを作製し、C57BL/6 マウスに経静脈的に投与した。AAV8 ベクター投与による肝細胞での *Nfkbiz* 過剰発現は realtime PCR 法で確認した。また、AAV8 ベクター投与後に CDAHFD 給餌し、肝臓の表現型、および脂肪沈着を組織学的に解析した。さらに、I κ B ζ 過剰発現によりどのような遺伝子の発現が変動したのかを調べるために網羅的な遺伝子発現解析を行った。

3 研究成果

CDAHFD 給餌条件下では、*Nfkbiz*^{fl/fl} マウスは全例脂肪肝であったが、*Alb-Cre;Nfkbiz*^{fl/fl} マウスでは約半数で肝硬変の肉眼所見があり、組織学的および生化学的解析からも肝線維化の進行や肝機能の悪化がみられた。こうした *Alb-Cre;Nfkbiz*^{fl/fl} マウスの病態は、当初の仮説に反する結果であった。また、肝細胞における炎症性のサイトカインやケモカインの産生は、*Nfkbiz*^{fl/fl} マウスと *Alb-Cre;Nfkbiz*^{fl/fl} マウス間で有意差はなかった。CDAHFD を 4 週間給餌した *Alb-Cre;Nfkbiz*^{fl/fl} マウスでは有意な TUNEL 陽性細胞の増加を認めたが、アポトーシスに関連する mRNA やタンパク質の発現に関しては有意差がなかった。続いて、肝臓の脂肪沈着を検討したところ、*Alb-Cre;Nfkbiz*^{fl/fl} マウスは早期に脂肪沈着をきたしていることが明らかになった。また、血中の VLDL 濃度が低下していることも判明した。

一方、I κ B ζ 過剰発現マウスでは肉眼的に脂肪肝の抑制が認められ、組織学的にも肝臓の脂肪沈着が抑制されていた。そこで、肝組織における遺伝子の発現変動を網羅的に解析したところ、I κ B ζ 過剰発現マウスでは脂質代謝に関連する遺伝子の発現に変化が見られた。とくに、中性脂肪合成に関連する *Lpin* や *Vldlr* の発現が低下しており、I κ B ζ が脂質代謝を制御していることが明らかになった。

4 考察

I κ B ζ は NF- κ B の下流に存在することから炎症を増幅させ NASH 進展を促進すると仮説を立てたが、この仮説に反して、NAFLD モデルマウス実験では I κ B ζ の欠損が線維化を亢進させ、肝硬変を誘導する要因になった。また、肝細胞における I κ B ζ の役割は、炎症・免疫応答、およびアポトーシスとは関連性が薄いことが、遺伝子やタンパク質の発現解析により示唆され、別の機序で NASH が増悪したと考えられた。CDAHFD 給餌早期のマウスを用いた解析から、NASH の増悪は I κ B ζ 欠損により肝細胞内への脂肪沈着が亢進することで誘導されると推測された。肝細胞における I κ B ζ の役割を検証するため、AAV8 ベクターを用いてマウスの肝細胞に I κ B ζ を過剰発現させたところ、肉眼的・組織学的に肝臓への脂肪沈着が抑制されていた。さらに、網羅的な遺伝子発現解析から、肝細胞内での中性脂肪合成に関連する遺伝子の mRNA が変化していることを見出した。肝細胞の I κ B ζ は、これらの遺伝子発現を介して肝細胞内での脂肪代謝を制御し恒常性を維持していることが示唆された。

5 結論

本研究は、転写因子 I κ B ζ が肝細胞における中性脂肪合成に関わる遺伝子の発現を制御し、NASH 進展に対して抑制的に働くことを明らかにした。本研究の成果は、社会的な健康問題となってい

る NAFLD/NASH の発症機序の解明や治療標的となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

本研究では、当初は、NF- κ B の下流に存在する I κ B ζ が炎症を増幅させ、NASH 発症を促進するとの仮説を立て、肝細胞特異的に Nfkbiz を欠損させたマウスを用いて NASH 発症過程における I κ B ζ の役割を検討した。しかしながら、結果は仮説に反して、肝細胞特異的 Nfkbiz 欠損マウスでは脂肪沈着が亢進し、肝線維化の進行および肝硬変への進展がみられ、I κ B ζ の欠損が NASH 進展の要因になることが明らかになった。次いで、I κ B ζ を過剰発現させたマウスを作製したところ、脂肪沈着の減弱を認め、I κ B ζ が肝細胞の脂質沈着を制御していることが明らかになった。以上から、本研究は、転写因子 I κ B ζ が肝細胞における中性脂肪合成に関わる遺伝子の発現を制御し、NASH 進展に対して抑制的に働くことを明らかにした。

肝細胞にける I κ B ζ の発現低下が脂肪肝に関与することは新たな知見であるが、今後、臨床においても同様の機序が働いているか否かを検証していくことが肝要である。

NASH における星細胞やクッパー細胞の関与と今回の研究との関係は考察で述べてもらった。また、脂肪肝誘導のために用いた超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (choline-deficient, L-amino acid-defined, high fat diet : CDAHFD) (60kcal% 脂肪含有量、ラード使用、コリン欠乏、メチオニン減量(0.1%))という特殊な食餌で脂肪肝を誘導したことの影響についても考察で言及してもらった。

実験は丁寧になされており訂正された論文は、本学学位論文としてふさわしいと 3 人の審査委員が全員一致で判断されたため合格とする。

最終試験の結果の要旨

本研究では、当初は、NF- κ B の下流に存在する I κ B ζ が炎症を増幅させ、NASH 発症を促進するとの仮説を立て、肝細胞特異的に Nfkbiz を欠損させたマウスを用いて NASH 発症過程における I κ B ζ の役割を検討した。しかしながら、結果は仮説に反して、肝細胞特異的 Nfkbiz 欠損マウスでは脂肪沈着が亢進し、肝線維化の進行および肝硬変への進展がみられ、I κ B ζ の欠損が NASH 進展の要因になることが明らかになった。次いで、I κ B ζ を過剰発現させたマウスを作製したところ、脂肪沈着の減弱を認め、I κ B ζ が肝細胞の脂質沈着を制御していることが明らかになった。以上から、本研究は、転写因子 I κ B ζ が肝細胞における中性脂肪合成に関わる遺伝子の発現を制御し、NASH 進展に対して抑制的に働くことを明らかにした。以上の内容に対して、論文およびプレゼンテーションは背景・目的・方法・結果・考察が明瞭であった。

NASH の機序の一つとして肝細胞における I κ B ζ の役割について明らかにした。今後は臨床における NAH で同様の機序が起きているか否かを確認するとともに治療方法の確立へと研究が進展することを期待する。

プレゼンテーションでは詳細な質疑応答が行われ十分な知識を有しており学位授与にふさわしい能力を備えていることが確認され、学位授与に値すると判断された。