

OPEN CONFERENCE

平成26年10月10日 開催

脂肪肝傷害および肝炎 (とくに非アルコール性脂肪性肝炎:NASH)発生・進行の 分子メカニズムに関する検討

北海道大学医学部大学院
保健科学研究院
健康イノベーションセンター
生体分子・機能イメージング部門
教授

尾崎 倫孝



我が国では、40～74歳の男性の実に4人に1人がメタボリック症候群に罹患していると推測されています。平成20年4月より特定健診が始まり、国を挙げてのメタボリック症候群克服に向けた医療体制の確立が期待される中で、様々な観点からメタボリック症候群の病因解明、治療法開発が進められています。運動不足、ストレス、過食・過栄養などにより内臓脂肪が蓄積すると、肥満に加えて、アディポサイトカインの分泌異常と遊離脂肪酸の増加が起こります。さらに、インスリン抵抗性等の病態が加わることで、全身的にはメタボリック症候群が発症すると考えられています(図1)。他方、肝臓においては、増加した遊離脂肪酸は門脈を介して肝臓の組織に到達し、そこで中性脂肪として蓄積され、脂肪肝を形成します(単純性脂肪肝)。内臓脂肪の増加は、遊離脂肪酸の分泌亢進、アディポネクチンの分泌低下、炎症性サイトカインTNF- α の分泌亢進などをきたし、さらにアディポサイトカインの分泌異常やインスリン抵抗性あるいは過剰な酸化ストレス、炎症性サイトカインが持続的に作用することで、肝細胞傷害、炎症などが慢性化し、その結果非アルコール性脂肪性肝炎(NASH: Non-Alcoholic Steato-Hepatitis)へ進展すると考えられています。NASH形成のメカニズムの詳細は不明ですが、現在最も可能性ある機序としては、two hit theoryが提唱されています。肝の単純化(1st hit)に加えて、いわゆる2nd hitと言われるストレス(酸化ストレス、種々のサイトカインなど)が加わり、持続性の肝炎・肝硬変に進展していくというものです(図2)。最終的に肝癌に至ると考えられています。しかしながら、現在提唱されているメカニズムはむしろ現象論的な研究から説明されているものであり、本質的な原因については今だ不明なままでです。

NASHは“進行性”であることがその病態の特徴のひとつであり、そのためNASHに陥ると高率に肝硬変・肝癌に進行することが明らかとなっています。そのため、NASHの予防あるいはNASHの進行阻止は、臨床的に極めて重要と考えられます。しかしながら、一般的には、「非アルコール性の脂肪肝」は可逆的であり、ダイエットなどにより正常化すると考えられています。そのため、国民の関心はいまだに低いのが現状です。医療サイドとしては、脂肪肝の予防に尽くすのみならず、「可逆性の脂肪肝の状態にとどめておく」か、あるいは「NASHへの進行を抑える」ことが重要です。

そのために、病態を制御するメカニズムの解析あるいはその責任分子を同定し、それから「NASHの程度・進行の度合いを評価すること」、あるいは「脂肪肝からNASHへの進展の可能性を予測すること」は意義深いものと考えています。さらに、NASHへの移行を抑制する薬剤・機能性食品などを見出すこと

が出来れば、医療・保健医療にも大いに貢献することでしょう。

本稿では、マウス肝細胞と肝臓をもちいた解析結果からおぼろげに見えてきたNASH進行のメカニズムについて若干説明させていただきたいと思います。

【マウス肝細胞および肝臓を使った実験の話】

脂肪肝および肥満マウスでは、慢性的な肝傷害および脂肪肝の外科的治療の直後に急性肝傷害・肝再生不全を引き起こします。また、慢性的な脂肪肝の一部は、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変・肝癌へ移行することが知られています。two hit theoryなどのメカニズムが考えられていますが、その詳細はまだ明らかではありません(図1)。

今回、レブチン受容体欠損マウス(db/dbマウス)をもちいて、過食により誘導された肥満および脂肪肝マウス(高血糖を伴なう)を用いて、肝臓を外科的に切除するモデルをもちいて研究しました。70%肝切除という肝臓にとって大きなストレスを加えることにより、脂肪肝の傷害メカニズムを浮き彫りにしようと考えたのです。(余談ですが、最近になり、肝切除などの外科的ストレスがNASHの進行を促進し、それをビタミンEなどの抗酸化剤が抑制する、といった報告もなされるようになっており、こういった実験の組み立てはあなたがち間違いではなかったと内心ほっとしています)通常状態および肝切除後の肝臓の傷害および再生を経時に評価し、肝臓組織を生化学的、分子生物学的に解析しました。小さな研究室でもあり、目的となる分子を特定するには数年を要しましたが、特定後はさらにその効果を確かめるために、その分子は脂肪化した肝細胞では低下していましたが、脂肪化肝細胞・脂肪肝に導入したり、いろいろな脂肪肝モデルでも検討したり、脂肪化のない肝細胞での意義の検討をしたりすることで、その分子の肝細胞における特異的な機能を確認しました。この分子は、脂肪化・非脂肪化肝細胞にかかわらず、また肝細胞に特定することなく、傷害から細胞を守っているいわゆる“gate keeper”的な存在であることも分かりました。

マウス脂肪肝では、肝切除直後から肝臓における強い酸化ストレスの発生(図3)とそれに引き続く強い肝傷害(アポトーシスの増加、カスパー-3活性の亢進)(図4)が認められました。他方、細胞増殖能の低下はごく軽度であったことから、細胞増殖能の低下ではなく、むしろ肝切除後の強い肝傷害が肝臓の再生を抑制していると考えされました。(肝細胞増殖能が低下するメカニズムは、図6をご参照ください)

この原因を調べてみると、大きく2つの原因が存在

することが分かりました。脂肪肝組織の解析から、細胞傷害を誘導するFasLおよびFas分子の発現が増加するとともに、一連の抗酸化分子の発現が低下していました(図5)。興味深いことに、細胞生存に重要な分子(Akt)は強く発現していましたが、肝切除後の応答性(リン酸化)の低下が認められました。さらに、アポトーシスを抑制する一連の分子群も低下していました(図5)。つまり、肝細胞への攻撃因子は増強され、他方防御因子は低下していましたために、脂肪化した肝細胞では、肝細胞生存と細胞ストレス・死のバランスが大きく細胞ストレス・死に傾いていたことになります。こういった病態を基盤として、肝切除という強いストレスの後に、急激な強い酸化ストレスが肝脂肪内に生じ、それに引き続いてアポトーシス(細胞死)が強く誘導されたと考えされました。本原稿にはお示ししておりませんが、細胞実験により、肝細胞内に急性に発生する酸化ストレスと肝細胞死(アポトーシスとネクローシス)との関係は確認をしています。

上記のような脂肪肝における酸化ストレスおよびそれによる肝傷害のメカニズムが、p62/SQSTM1を中心とした機構に起因することを突き止めました(図5)。この分子による細胞の易傷害性の機序は次のように考えられました。

1)p62/SQSTM1の低下により、Keap-1/Nrf-2経路が抑制されARE活性が低下(抗酸化分子の発現を低下)することにより、酸化ストレスなどを受けやすくなる。細胞内で生じたこの強い酸化ストレスは、以下に述べるアポトーシスよりも、むしろネクローシスを誘導する(データは提示しておりません)。

2)p62/SQSTM1の低下により、FasL/Fas分子の発現が増加しその経路が活性化するため、肝細胞に対してアポトーシスを誘導し、直接傷害を加える。経過中にFas依存性の酸化ストレスが生じるが、これは主としてネクローシスに関わる。

逆に、脂肪化肝細胞にこの分子を導入することで、酸化ストレス・傷害は軽減しました。マウスの実験でも、脂肪化した肝臓にこの分子を導入することで、肝切除後の傷害は抑制され、肝の再生も改善しました。

このような現象は、脂肪肝であれば、外科的ストレスのない通常の状態でも起こっていることが確かめられ、(たとえ軽度であっても)脂肪肝では慢性的に細胞への傷害が持続していることが分かりました。つまり、単純性脂肪肝でも軽度傷害は持続しており、脂肪肝の状態が長期に渡ったり、何らかの付加的なストレス(今回は外科的ストレス)が加わることで、肝傷害・脂肪性肝炎に進みうる(あるいは肝炎に進行させる)ことを示し

ています。これは、“NASHにおける2nd hit”的病態を説明するものかもしれません。過食が原因ではないそれ以外の原因による脂肪肝(高脂肪食による脂肪肝など)でも同様の現象が観察されました。また、薬剤などによる急性肝傷害モデルでは、p62/SQSTM1分子は一時的に増加しました。さらに、脂肪化していない肝細胞においても、p62/SQSTM発現を高めることで、細胞の生存能(抗ストレス能)は高まりました。

また、肝の傷害性の促進に大きく影響していると考えられたのは、細胞の生存にとって重要なAkt分子の不応性です。通常は、大きなストレスに反応して、細胞の生存能を高め細胞を守っていると考えられていますが、今回の検討では肝切除前から常に強く発現してお

りストレスに対しても反応が悪い状態でした。こう言った状態が常に持続していると、肝臓は常に易傷害性にあると考えられます。実は、糖尿病などで高インスリン状態が続けば、Aktにも常に刺激が入っていると考えられますので、やはり脂肪肝からNASHへの移行のベースにはこういった病態の存在が必要なのではないかしら、と思っています。

これら一連の実験結果から、私達はp62/SQSTM1は、ストレス・傷害から細胞を守る“gate keeper的な分子”と考えていますが、肝細胞が脂肪化することによりこの分子の発現が低下し、傷害を受けやすくなり肝傷害が遷延し肝炎(NASH)に移行するものと考えています。

発現が抑制されており、細胞の反応性増殖に影響しており、これも肝再生不全の一因となっていると考えています。

今回の成果は、「脂肪肝における外科治療後の肝傷害・再生不全の病態解明」というのみならず、「脂肪肝から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH:Non-alcoholic Steato-Hepatitis)への移行病態の解明」、「持続性肝炎・肝硬変・肝癌への進行予防ための治療法の開発」にとっても重要なものと考えています。一過性の脂肪肝ではなく、「脂肪肝の状態が持続するによりNASH病態へ移行する」の可能性を示していますが、これは日々の食生活などへの警鐘となり、また単純な脂肪肝がNASHに進行することを予防する創薬の助けにもなります。ひいては、肝硬変、肝癌の予防にもつながるかもしれません。p62/SQSTM1分子は、“gate keeper分子”として、肝臓(あるいはそれ以外の臓器)における様々なストレス、病態からの回避・抑制という意味で重要な役割を担っている可能性があり、将来内科的・外科的医療あるいは保健医療分野への応用が考えられます。

運動不足・ストレス・過食など

内臓脂肪の蓄積・肥満

脂肪組織

- ①アディポサイトカイン分泌異常
- ②遊離脂肪酸分泌亢進

インスリン抵抗性

糖尿病、動脈硬化・高血圧、高脂血症が引き起こされ、血栓等が起きやすい状態となる。

メタボリック症候群

NASH

炎症・局所の酸化ストレスなど

肝における遊離脂肪酸の蓄積

単純性脂肪肝

図 1

脂肪肝から脂肪性肝炎・肝硬変・肝癌への移行

1st Hit

過食・肥満

肝の脂肪化

可逆的

持続する2nd Hit

代謝ストレス

インスリン抵抗性

肝細胞の脂肪化など

肝の易傷害性

増強

持続

不可逆的変化

へと進行

肝炎への移行

NASH

(

)

肝硬変

癌化

図 2

マウス脂肪肝切除直後に誘導される酸化ストレス

70%肝切除後(hr)

酸化状態

正常肝

db/db脂肪肝マウス

コントロール正常肝マウス

db/db脂肪肝マウス

*p<0.05

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr

70%肝切除後

酸化状態

70%肝切除後

酸化スコア(相対)

0 0.5 1 2 4 8 hr