

氏名	秋山 健太郎		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8689号		
学位授与年月	平成 30年 3月 23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<i>p62:Nrf2</i> 二重欠損マウスは非アルコール性脂肪性肝炎を自然発症する		
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	古川 宏
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	松坂 賢
副査	筑波大学講師	博士（医学）	金子 剛

論文の内容の要旨

秋山健太郎氏の博士学位論文は、近年本邦でも増加している非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の病態解析研究や治療法開発研究に有用な動物モデル作製を目指して *p62:Nrf2* 二重欠失マウスを樹立し、その詳細な解析結果を示したものである。本マウスが過去にない、目的に叶う動物モデルであることが示されている。その要旨は以下の通りである。

（背景と目的）

近年、運動不足と食生活の欧米化によって本邦の肥満人口が増加しており、それに伴って非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が顕著な増加を示している。本邦では 200 万人以上が NASH を罹患していると推定され、今後も増加することが予想されている。そして、NASH の一部は肝硬変や肝臓まで進行するため、NASH は慢性肝疾患における最大の問題になると考えられている。従来から、NASH モデル動物としてメチオニン・コリン欠乏食投与による食餌誘導性モデルや、肝細胞特異的 *Pten* 欠失マウスなどが知られてきた。しかし、これらのモデル動物は肥満やインスリン抵抗性を示さない、不自然な体重の減少や急激な症状の進行を認める、NASH の病態形成に重要な肝の線維化や腫瘍形成を伴わないなど、生活習慣病を基盤として発症するヒト NASH とは乖離していると指摘されてきている。また、NASH の病態形成に重要な過食肥満を呈するモデル動物の報告は少なく、線維化および腫瘍形成を伴うモデルの報告はなかったことに著者は注目している。このため、ヒト NASH において観察される基本的病態である過食肥満、インスリン抵抗性、炎症、線維化および腫瘍形成を伴うモデルマウスの開発が望まれていた、とし

ている。

(対象と方法)

そこで著者は、過食肥満を呈する *p62* 欠失マウスと、種々の炎症発症傾向を呈する *Nrf2* 欠失マウスとを交配し、*p62:Nrf2* 遺伝子二重欠失 (DKO) マウスを樹立した。そしてまず、過食肥満を呈する新たな NASH モデルマウスとして適しているかを検討することとした。また、この検証ののち、過食肥満および腸肝連関を中心に解析し、DKO マウスの NASH 発症機序における両者の関連性を解析することを計画した。

具体的には、著者はまず、野生型、*Nrf2* 単独欠失、*p62* 単独欠失、DKO マウスそれぞれについて、肝臓、腸管、脂肪組織の病理学的解析を経時的に行っている。また、各遺伝子型マウスの臓器から mRNA を抽出し、遺伝子発現レベルを解析している。腸管の解析手段としては、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢の解析、腸管透過性試験、糞便中リポ多糖 (LPS) 濃度の測定を行っている。また、肝臓のマクロファージである Kupffer 細胞における炎症性サイトカインの発現量解析や食食能試験も行っている。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて、Caco-2 細胞 (腸管上皮細胞) および RAW264.7 細胞 (マクロファージ) から、それぞれ *Nrf2* あるいは *p62* のいずれかの遺伝子欠失細胞を樹立し、Caco-2 ではバリア機能を、RAW264.7 では LPS による炎症反応を評価し、NASH 発症における各遺伝子欠失の意義を検討している。さらに、DKO マウスに摂餌制限を行い、過食肥満と NASH 病態を比較している。

(結果)

著者は、DKO マウスが、通常食飼育下において加齢とともに著明な体重増加をきたし、ヒト NASH と同様にインスリン抵抗性、2 型糖尿病、高レプチン血症を背景とする NASH 病態進展モデルとなることを示している。また、30 週齢において肝脂肪蓄積、炎症細胞浸潤、肝線維化といった NASH 病理組織像を呈することを示している。一方、それぞれの遺伝子の単独欠失マウスでは、NASH 発症が認められなかったとしている。

一方、DKO マウスは、グラム陰性菌 (*Porphyromonadaceae* および *Paraprevotellaceae*) の割合が増加する、といった腸内細菌叢の変化を引き起こし、糞便中の LPS が増加することを見出している。また、腸の透過性がタイトジャンクションタンパク質 Zo-1 の発現レベル低下と相関しつつ上昇し、それに伴って血清中の LPS が増加することを見出している。

さらに著者は、DKO マウス由来 Kupffer 細胞において異物食食能が有意に低下し、さらに DKO マウスでは M2 表現型ではなく M1 表現型 Kupffer 細胞が増加することを見出している。また、*in vitro* において Kupffer 細胞に対し低用量の LPS を添加した際、*Nrf2* 欠失細胞において TLR4 シグナル伝達の活性化を介して炎症反応が強力に促進されることも見出している。また、DKO マウスにおいては、摂餌制限することにより糞便および血清 LPS が低下し、これと共に NASH の肝臓状態が改善することを見出している。

(考察)

著者は、DKO マウスが過食肥満を呈する新たな NASH モデルであると考察している。そして、DKO マウスにおける NASH 様病態の成立機序として、以下のようなメカニズムを想定している。すなわち、過食

肥満により腸内細菌叢が変化し、腸管透過性が亢進する。これによって腸由来の LPS が肝臓に流入する。一方、Kupffer 細胞における TLR4 シグナル伝達の活性化を介した腸由来の LPS に対する肝臓の過炎症反応の結果、脂肪性肝炎および線維症が進行する、というものである。最後に著者は将来展望として、過食肥満、腸内細菌叢、腸管バリア機能および Kupffer 細胞の TLR4 シグナル伝達等を標的とすることにより、画期的な NASH の治療的アプローチの開発につながる可能性を挙げている。

審査の結果の要旨

(批評)

著者の博士学位論文は、*p62:Nrf2* 二重欠失マウスが、過食肥満、腸内細菌叢の変化、腸管透過性亢進による LPS の肝流入、Kupffer 細胞の活性化を介した炎症の活発化などを呈し、脂肪性肝炎および線維症が進行するなど、ヒト非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) で想定される病態を模倣する動物モデルである可能性を示している。これまでにない有用な NASH の動物モデルであることを示しており、画期的な NASH の治療的アプローチの開発につながる貢献をした点で、高く評価される。

平成 29 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。