

氏名	大和田 洋平		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 9181 号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25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	Novel non-alcoholic steatohepatitis model with histopathological and insulin-resistant features (病理組織学的特徴およびインスリン抵抗性を有する新規非アルコール性脂肪性肝炎モデルの開発)		
主査	筑波大学教授	医学博士	正田 純一
副査	筑波大学教授	医学博士	谷中 昭典
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	鈴木 浩明
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	加野 准子

## 論文の内容の要旨

大和田 洋平氏の博士学位論文は、マウスに高脂肪食、四塩化炭素、肝臓 X 受容体アゴニストを投与して、新しい非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 動物モデルを作製した。病理組織学的にヒト NASH の特徴を有する組織像を呈し、かつ、インスリン抵抗性を伴う新規 NASH モデル動物の開発に成功した内容である。その要旨は以下のとおりである。

### (研究目的)

NASH の成因は不明な点が多く有効な治療法もない。その背景にはヒト NASH の臨床病型と病態を反映する動物モデルがなく研究の障壁となっている。そこで著者は肝臓 X 受容体アゴニスト (T0901317) に着目し、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を併用投与することで、肝臓の病理組織学的特徴を有し、インスリン抵抗性を随伴するヒト NASH に類似した新規動物モデルを開発し、その病態の解析をおこなった。

### (方法)

著者は 7 週齢の C57BL/6J 雄性マウスに高脂肪 (High Fat : HF) 食の給餌を開始し (day 0)、次に示す 4 群に群分けした (各群 n = 5)。HF 群 : HF 食を 25 日間給餌、HF+CCl<sub>4</sub> 群 : HF 食を 25 日間給餌+CCl<sub>4</sub> (0.1 mL/kg) を計 4 回腹腔内投与 (day 14, 17, 21, 24)、HF+T0901317 群 : 高脂肪食を 25 日間給餌+T0901317 (2.5 mg/kg) を計 5 回腹腔内投与 (day 20, 21, 22, 23, 24)、新規 NASH モデル群 : 高脂肪食を 25 日間給餌+CCl<sub>4</sub> を計 4 回腹腔内投与 (day 14, 17, 21, 24) +T0901317 を計 5 回腹腔内投与 (day 20, 21, 22, 23, 24)。全群 day 25 に犠牲死させサンプルを採取した。各サンプルについて、病理組織学検査 (HE 染色、Masson trichrome 染色、Sirius red 染色、Oil red O 染色)、血液生化学検査、インスリン負荷試験、RT-PCR、microarray analysis を実施した。

(結果)

肝臓の肉眼病理所見では、新規 NASH モデル群は肝表面が凹凸不整となり白色調を呈していた。肝重量、肝体重比はいずれも新規 NASH モデル群は他群と比較して有意に増大していた ( $P < 0.01$ )。病理医による盲検下病理組織学的評価では、新規 NASH モデル群で肝細胞の脂肪沈着、風船様変化、マロリー小体(ヒト NASH に特徴的な所見)、炎症細胞浸潤、線維化を認め、5 匹全てが NAFLD activity score で NASH の診断基準を満たし、強い線維化を認めた。HF 群と新規 NASH モデル群の 2 群間で施行した Microarray assay では新規 NASH モデル群で酸化ストレス、脂質生成、肝線維化、肝脂肪化に関与する遺伝子発現の上昇を認めた。血液生化学検査では肝逸脱酵素 (ALT、AST) は HF+CCl<sub>4</sub> 群と新規 NASH モデル群で有意に上昇し ( $P < 0.01$ )、中性脂肪は新規 NASH モデル群のみで有意に上昇していた ( $P < 0.01$ )。血清中の炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6) は新規 NASH モデル群のみで有意に上昇していた ( $P < 0.01$ )。RT-PCR では、T0901317 を投与した 2 群において脂質生成に関与する *Srebp-1c* と *Fas* の遺伝子発現が有意に上昇し ( $P < 0.01$ )、新規 NASH モデル群で中性脂肪の輸送に関与する *ApoB* の遺伝子発現が有意に低下していた ( $P < 0.01$ )。インスリン負荷試験では新規 NASH モデル群でインスリン抵抗性を認めた。

(考察)

著者は新規 NASH モデル群の肝病変は、HF 食の給餌と T0901317 の投与による肝脂質生成の亢進による脂肪蓄積と *ApoB* 遺伝子発現の低下により肝内の遊離脂肪酸の増加が生じ、さらに、これに伴う遊離脂肪酸の酸化、さらに CCl<sub>4</sub> の投与により生じた酸化ストレスが増大した結果として NASH 病変が形成されたものと判断した。炎症・酸化ストレス病態より、肝線維化、炎症細胞浸潤が生じ、病理組織学的にヒト NASH に類似した組織像を呈し、また、病態生理学的にインスリン抵抗性が誘導されたものと推測された。今後に登場する NASH 治療薬の治療効果、また、NASH 肝癌に関する発がんメカニズムの解明において有用なモデルであると考えられた。

## 審査の結果の要旨

(批評)

NASH モデルはこれまでに多数報告されてきたが、ヒト NASH の臨床病型と病態に懸け離れているものが多かった。肥満、内臓脂肪型肥満、メタボリック症候群の表現型を呈するモデルはごく僅かである。これらの背景により NASH 研究の進捗が遅れている現状がある。本論文において著者は、NASH の発症機序としてこれまで指摘されてきた病因の中で、脂質代謝異常と酸化ストレス負荷に重点を置いて、ヒト NASH に類似した新しい NASH モデルを作製した点が評価できる。また、著者は肝病理組織において、脂肪沈着、風船様変化、炎症細胞浸潤、線維化に加えて、ヒト NASH に特徴的な所見であるマロリー小体の病変形成を発見した点も評価できる点である。今後に登場してくる NASH 治療薬の治療効果判定のためのモ動物モデルとして、また、NASH 肝癌に関する発がんメカニズムの解明においても有用なモデルであると考えられた。本モデルの活用による NASH 研究の今後の進捗を大いに期待したい。

平成 31 年 1 月 8 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。