

論 文 要 旨

Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat

〔 脂肪食よりもフルクトース食により誘導された
脂肪肝のほうが肝再生は障害される 〕

田ノ上 史郎

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

脂肪肝は肝再生が障害されることが知られているが、その機序は十分明らかにされていない。また脂肪肝の背景に脂肪酸代謝、糖代謝異常が認められることが多いが、それらの代謝異常がどのように肝再生に影響するかは十分解明されていない。本研究の目的は、異なる代謝異常によって誘導される脂肪肝における肝再生の差異とその機序を明らかにすることである。本研究では、高フルクトース食もしくは高脂肪食で誘導した脂肪肝における肝再生の差異とそのメカニズムを検討した。

【材料および方法】

(1) SD ラットに高フルクトース食(66% fructose, 11% fat; H-fruc 群)、高脂肪食(8% fructose, 54% fat; H-fat 群)を4週間投与し、脂肪肝を誘導した。普通食(10% fructose, 12% fat; CE-2)投与群をコントロール(Cont 群)とした。肝組織の脂肪化は Oil-red O 染色後の画像所見と肝組織中の中性脂肪含量で評価した。

(2) 血液生化学検査値と、ITT (intraperitoneal insulin tolerance test) を用いたインスリン抵抗性を比較検討した。

(3) 肝組織中の脂質やフルクトース代謝に関連する遺伝子 (carnitine palmitoyltransferase [CPT]-1、peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]- α 、AMP-activated protein kinase [AMPK]、fatty acid synthase [FAS]、fructokinase [FK]、cytochrome P450 2E1 [Cyp2E1]) の発現を Real time PCR 法で比較検討した。

(4) 各食餌を4週間摂取後に70%部分肝切除を行い、術後1、3、7日後の肝再生を肝重量による再生率および再生肝組織中の PCNA labeling index にて評価した。

(5) 肝切除時、肝切除後1、3、7日後の各時間で血清を採取し、肝再生に関連するサイトカイン (TNF- α 、IL-6、TGF- β 1、HGF) の血清中濃度を ELISA 法で測定した。

【結果】

- (1) 総カロリー摂取量と体重増加は H-fruc 群と H-fat 群で有意差はなかったが、共に Cont 群と比較して有意に高値であった。血清中性脂肪、空腹時血糖とインスリン抵抗性は H-fruc 群が H-fat 群および Cont 群よりも有意に高値であった。
- (2) Cont 群では肝脂肪化は認めず、H-fruc 群は Cont 群よりも有意に肝脂肪化を認めたが、H-fat 群は H-fruc 群や Cont 群よりも肝脂肪化は高度であった。
- (3) H-fruc 群では H-fat 群より FK と FAS の遺伝子発現が亢進し、CPT-1、PPAR- α 、AMPK、および Cyp2E1 は低下していた。
- (4) H-fat 群および Cont 群と比較して H-fruc 群の肝再生率は、肝切除 3 日後および 7 日後で有意に低下していた。
- (5) 血清中 TNF α 、IL-6、HGF、TGF- β 1 はいずれの時間でも 3 群間で有意差はなかった。しかし、Cont 群では肝切除 1 日後、H-fat 群では肝切除 3 日後の TGF- β 1 濃度はそれぞれ肝切除時と比較して有意に低値となっていたのに対し、H-fruc 群の TGF- β 1 濃度は肝切除後に明らかな変動はなかった。

【結論及び考察】

脂肪肝動物モデルや脂肪肝患者で肝再生が遅延することが報告されているが、今回の我々の検討では、高脂肪食よりも高フルクトース食に誘導される脂肪肝のほうが肝再生は高度に障害され、脂肪肝における肝再生障害は脂肪肝の程度よりその原因と関連することを明らかにした。

フルクトースは HFCS(High-fructose corn syrup)や砂糖として消費が増加しており、ソフトドリンクなどに多く含まれ、その消費量増加が肥満の蔓延やインスリン抵抗性の増悪と関連することが疫学研究で報告されている。また、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者では肝組織中のフルクトキナーゼ (FK) や脂肪酸合成酵素 (FAS) の発現が亢進していることが報告されている。これらのことから、今回用いた高フルクトース食投与動物の肝臓は NAFLD 患者の肝病態に類似しており、NAFLD の病態解明に有用なモデルであると考えられた。

今回の検討で、高脂肪食群と比較して高フルクトース食群では肝内 CPT-1、PPAR- α 、AMPK の発現低下を認め、肝内 FK の発現亢進を認めたことから、ATP の産生低下、および ATP の消費亢進により肝内 ATP 不足を生じていると考えられた。また、高フルクトース食群では TGF- β 1 の調節異常を認めた。

以上のことから、脂肪肝における肝再生障害は脂肪肝の程度よりその原因と関連し、高フルクトースにより誘導された脂肪肝の肝再生障害には ATP 不足や TGF- β 1 の発現調節異常が関連する可能性が示唆された。

(Biochemical and Biophysical Research Communications, in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 131 号	学位申請者	田ノ上 史郎
審査委員	主査	乾 明夫 教授	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小賤 健一郎 教授	副査 高嶋 博 教授
	副査	堀内 正久 准教授	副査 菰方 輝夫 講師

Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat.

(脂肪食よりもフルクトース食により誘導された脂肪肝のほうが肝再生は障害される.)

脂肪肝では肝再生が障害されるため、生体肝移植時のドナー肝としては適さないが、脂肪肝の肝再生障害機序は十分には明らかにされていない。また、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は糖尿病や脂質異常症が主な原因であるが、脂肪肝の原因の相違と肝再生障害との関連も明らかでない。学位申請者らは、高脂肪食および高糖質食による脂肪肝ラットを作成し、その肝再生を比較検討し、肝再生障害の相違のメカニズムを解析した。具体的には、(1) SD ラットに普通食 (10% fructose, 12% fat)、高フルクトース食 (66% fructose, 11% fat)、もしくは高脂肪食 (8% fructose, 54% fat) を 4 週間投与し、脂肪肝を誘導した。(2) 肝脂肪化は Oil-red O 染色と肝組織中の中性脂肪含量で評価した。(3) 肝組織中の脂質やフルクトース代謝に関連する遺伝子 (carnitine palmitoyltransferase [CPT]-1、peroxisome proliferator-activated receptor [PPAR]- α 、AMP-activated protein kinase [AMPK]、fatty acid synthase [FAS]、fructokinase [FK]、cytochrome P450 2E1 [Cyp2E1]) の発現は Real time PCR 法で比較検討した。(4) 各食餌を 4 週間摂取後に 70% 部分肝切除を行い、術後 1、3、7 日後の肝再生を肝重量量による再生率および再生肝組織中の PCNA labeling index で評価した。(5) 肝再生に関連するサイトカインの血清中濃度を ELISA 法で測定した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 高フルクトース食群は高中性脂肪血症、インスリン抵抗性を認め、高脂肪食群と比較し肝脂肪化は軽度であった。
- 2) 高フルクトース食群は高脂肪食群と比較し肝再生、肝細胞増殖能は低下していた。高フルクトース食群は高脂肪食群と比較し、肝内の FK、FAS の遺伝子発現亢進を認め、CPT-1、PPAR α 、AMPK および CYP2E1 の遺伝子発現は低下していた。
- 3) 血中 TNF- α 、IL-6、HGF レベルは各群で経時的な変化に差はなかったが、TGF- β 1 は高フルクトース食群のみ術後早期より高値で、コントロール群や高脂肪食群で認められた経時的変化を示さなかった。

肝内遺伝子発現の検討から、高脂肪食群と比較して高フルクトース食群では、脂肪酸合成は亢進しているものの、分解 (β 酸化) は低下していると思われ、肝内の ATP 消費は亢進し、かつ ATP の産生は低下し、肝内 ATP は不足していると考えられた。また、高フルクトース食群では TGF- β 1 の発現調節異常を認めた。以上のことから、高フルクトースにより誘導された脂肪肝の肝再生障害には ATP 不足や TGF- β 1 の発現調節異常が関連する可能性が示唆された。

本研究は、脂肪肝における肝再生障害は、肝脂肪化の程度だけでなく、その原因も関連することを明らかにし、そのメカニズムを解明した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 131 号		学位申請者	田ノ上 史郎
審査委員	主査	乾 明夫 教授	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小賤 健一郎 教授	副査	高嶋 博 教授
	副査	堀内 正久 准教授	副査	菰方 輝夫 講師
<p>主査および副査の 5 名は、平成 23 年 6 月 13 日、学位申請者田ノ上 史郎君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 動物モデルの肝切除で死亡するラットはいるのか。手技的に難しい点はあるのか。 (回答) 手技的な訓練は必要だが、手技を十分習得すれば 70%部分肝切除では死亡しない。</p> <p>質問 2) フルクトースや脂肪以外の食餌エネルギーはどうなっているのか。 (回答) Casein や starch がエネルギーとして含まれている。</p> <p>質問 3) 肝内 ATP 不足が肝再生障害と関連しているのか。過去の報告はあるか。 (回答) 直接的な関連の報告はないが、フルクトースと肝内 ATP 不足の報告はある。</p> <p>質問 4) 群間で、脂肪肝の病理組織学的な違い、脂肪の蓄積部位の違いなどはあったのか。 (回答) 中心静脈周囲を中心に脂肪沈着し、群間での病理組織学的な相違はなかった。</p> <p>質問 5) 高脂肪食群と高フルクトース食群で肝切除後の肝再生に差があるが、メカニズムの面で HGF などの ligand に対する反応の違いはあるのか。 (回答) 今回は検討していないが、TGF-β などに対する反応性は違う可能性はある。</p> <p>質問 6) 脂肪食として用いている脂肪の種類はどうか。脂肪酸の種類の影響などはないのか。 (回答) 今回の脂肪は大豆油を用いている。脂肪酸の種類による相違は検討していない。</p> <p>質問 7) 高フルクトース食群で脂質合成の亢進、代謝は亢進しているというパターンだが、NADPH の供給経路は見るべきで、検討はしているか？ (回答) 今回は検討していない。</p> <p>質問 8) ITT でコントロール群でもインスリンに対するレスポンスが悪いがこれでよいのか？高フルクトース食群で血糖上昇しているがそれはなぜか。 (回答) 今回の ITT はインスリンに対する反応が不十分だった可能性はあるが、各群間で比較して有意差はある。また、高フルクトース食群でインスリン投与後血糖上昇しているのは、高フルクトース食群でグリコーゲン蓄積が多い可能性や、同群でインスリン拮抗ホルモンが多い可能性などとの関連を考えたが、十分検討できていない。</p> <p>質問 9) アルコール性脂肪肝も肝再生が障害されるか。 (回答) アルコールも脂肪肝の大きな原因の一つであり、同様に肝再生が障害されると予想される。</p> <p>質問 10) 脂肪酸の代謝酵素 CPT-1、PPARα、AMPK などに差があったが、臨床的に測定して、肝再生不全を予測できる指標となりうるか。HGF、TGFβ などは患者血清で測定できるが、ATP の産生に関連して、臨床の場でなにか測定できるものがあるか。</p>				

最終試験の結果の要旨

(回答) 遺伝子発現は、肝移植ドナーの選別時に、肝生検組織を用いた評価に応用可能かもしれない。また、フルクトース摂取過剰かどうかの問診は臨床的に重要と思われるが、ATP 産生に関する臨床応用できる測定系は、現状ではない。

質問 1 1) 非 B 非 C 型肝癌肝切除例が増えている。術前に脂肪肝の原因が高脂肪食摂取によるものか、高フルクトース摂取によるものかを見分ける血中マーカーはないか。

(回答) 血中マーカーはないが、問診による清涼飲料水などのフルクトース類の摂取歴は鑑別法の一つである。血中ではないが、肝生検組織中のフルクトキナーゼ発現などを調べると鑑別に有用かもしれない。

質問 1 2) 肝移植する際のドナー肝の脂肪肝の評価として macro、microvesicular steatosis の%評価などは一般的に行うが、今回の研究から、それだけでは不十分な可能性があるということにもなるが、なにか移植肝に対する評価として提言はあるか。

(回答) 術前に脂肪肝がある場合、脂肪肝の程度が軽度であっても、原因によっては高リスクとなることが考えられ、ドナーの適格基準に食事内容の問診も必要と思われる。

質問 1 3) 肝切除時の全肝重量はどうやって計測しているのか。

(回答) 肝切除時肝重量を 70%とし、逆算して 100%へ換算している。

質問 1 4) 脂肪化した肝細胞の分布と PCNA 陽性細胞の分布の関連を検討していないか。

(回答) 今回は検討していない。

質問 1 5) 一般生化学検査で ALT に、群間で差があったのはなぜか。

(回答) コントロールと高フルクトース食群に比較して高脂肪食群で ALT が低かった理由は不明である。

質問 1 6) 高フルクトース食群での食餌に占めるフルクトースの割合を 66%にした理由はなにか。

(回答) これまでのフルクトース食の報告では 60%前後が多かったため、66%とした。

質問 1 7) 人の食事で、一般にフルクトースの占める割合はどの程度か。

(回答) 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者の一日当たりのフルクトース摂取量を調べた成績では、健常者は平均 170Kcal で、NAFLD 患者では平均 365kcal で、後者で約 2 倍多いと報告されている。

質問 1 8) 高脂肪食+フルクトース食で肝線維化の報告があったが、今回のモデルでは線維化はどうだったか。

(回答) 4 週間の高脂肪食もしくはフルクトース食のみでは肝線維化は明らかではなかった。

質問 1 9) 4 週間よりもっと長期の、例えば 3 か月間脂肪食もしくはフルクトース食で飼育後に肝切除をした場合は、今回と同様の肝再生の違いがでるのか。

(回答) 今回検討していないが、同様の結果になると思われる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・見識を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。