

論 文 要 旨

Therapeutic effects of vitamin A on experimental cholestatic rats with hepatic fibrosis

肝線維化を伴ったラット胆汁うっ滞モデルに対する
ビタミンAの治療効果の検討

村 上 研 一

【序論および目的】

胆道閉鎖症（以下本症）は閉塞性黄疸を来す新生児期の疾患の1つである。その病因はまだ明らかではないものの、標準的治療方法は「葛西手術」に代表される肝門部肝空腸吻合術である。この手術術式はある程度本症の患児の閉塞性黄疸を減黄することはできるが、2/3の症例では進行する肝線維化により肝不全に至り肝移植を必要とすることになる。故に本症患児の治療指針の1つとしては進行する肝線維化を如何に防ぐかにある。この10年余の間にビタミンAの抗線維化作用は注目を浴びてきている。肝臓では肝星細胞がビタミンAの大部分を脂肪滴として貯蔵している。この星細胞は障害により細胞内のビタミンAを放出すると形態的にも機能的にも変貌して線維化のメカニズムに関与していることが分かってきた。一度星細胞がビタミンAを放出すると星細胞は線維芽細胞様に変化して肝組織内の線維化を促進する役割を持っている。こうした知見からビタミンAを補充する事が肝の線維化を予防できる可能性が示唆されてきた。実施、最近の研究では四塩化炭素により障害された動物の肝障害モデルや肝硬変の臨床例にビタミンAが有効であったとする報告が示されてはいるが、本症に対するビタミンAの有効性に関する報告は乏しく、閉塞性黄疸の動物実験モデルにおいてビタミンAの効果を経験的に検証した報告は見られていない。今回の研究の目的はラットの胆管結紮による胆道閉鎖症類似モデルと四塩化炭素による薬剤性肝障害モデルを用いてビタミンAの有効性を評価すると同時に、その際の星細胞の役割について検証する事である。

【材料および方法】

100-200gのWistar系ラット(n=80)を①開腹術により総胆管を結紮した胆管結紮群(BDL群, n=40) ②四塩化炭素(1.2g/kg/日)を6週間皮下投与した薬剤性肝障害群(CC14群, n=20)、③開腹術のみを行い総胆管は結紮しなかった対照群(Sham群, n=20)、に分け、それぞれをビタミンA投与群、非投与群に分けた。いずれの群も経過を通して飼料、水分は経口摂取にて自由に与えた。

1. ビタミンA投与

ビタミンA投与群にはビタミンA(チョコラA; パルミチン酸レチノール、エーザイ、大阪)を25,000IU/回皮下投与した。BDL群, Sham群は術前、術後2日目、5日目に計3回投与した。CC14群は1回/2週、計6週間投与した。CC14群は投与終了後1週間目に、BDL群は術後7日目に犠死せしめ、灌流固定した肝組織を採取した。

2. 肝組織像の観察

両群における組織像の特徴を光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いて観察し、ビタミンA投与に伴う組織像の変化を検証した。特に星細胞については電子顕微鏡を用いてビタミンA貯蔵能の状態を中心にその形態的变化を検証した。

3. 肝線維化に関与する活性物質の観察

星細胞がビタミンAを放出して線維芽細胞に転換した際に発現するといわれる各種マーカー(Keratinocyte Growth Factor; KGF, α -Smooth Muscle Actin; α -SMA, Glial Fibrillary Acidic Protein; GFAP)を免疫組織化学染色し、光学顕微鏡を用いて観察した。また、BDL群にビタミンAを

投与した場合の各種マーカーの発現状況の変化を検討した。染色にあたっては、KGF は一次抗体として抗 KGF 抗体 (Santa Cruz 社)、 α -SMA は抗 α -SMA 抗体 (DAKO 社)、GFAP は抗 GFAP 抗体 (PROGEN 社) を用い、酵素抗体法で反応させた後、DAB (Diaminobenzidine ; ジアミノベンジジン) 発色を行い観察した。尚、本研究は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の倫理委員会の承認を得て行われた。

【結果】

1. 光学顕微鏡での組織像の変化

BDL 群では肝内の毛細胆管で胆汁のうっ滞を認め門脈周囲では炎症性変化を伴って胆管増生を認めた。CC14 群では中心静脈付近での壊死性変化と肝細胞の脂肪変性が見られた。各群にビタミン A を投与した群ではこれらの組織障害の所見が改善していた。

2. 電子顕微鏡での星細胞の観察

電子顕微鏡で各群の星細胞の形態を観察したところ、BDL 群と CC14 群での星細胞内のビタミン A を含む脂肪滴のサイズは著しく縮小していた。これに対してビタミン A を投与した各群では星細胞内の脂肪滴は正常な組織での星細胞と同等に維持されていた。

3. 免疫染色による線維化マーカーの発現

免疫染色では BDL 群では KGF や α -SMA の発現が認められていたが、BDL+VitA 群では両者の発現は減弱していた。CC14 群でもビタミン A を投与した CC14+VitA 群では KGF と α -SMA の発現はやや減弱していた。GFAP は BDL 群の増生した胆管周囲や門脈周囲に強く発現していたが、BDL+VitA 群ではその発現が減弱しており、この GFAP の分布を電子顕微鏡レベルで観察すると星細胞の核内に集簇している事が判明した。この核内の GFAP の局在を定量化すると BDL 群に対して BDL+VitA 群では統計学的に有意に GFAP の発現が減少している事が明らかになった ($p < 0.0005$)。

以上の事より、ビタミン A の投与は BDL 群での星細胞内での GFAP の発現を抑制している事が示唆された。

【結論及び考察】

星細胞は肝組織内で約 4% を占める細胞であるが、体内のビタミン A の約 70% をその細胞質内の脂肪滴に貯蔵しているといわれる。正常肝において通常ビタミン A を貯蔵している状態では星細胞は静止期にあり、肝類洞の組織骨格に関与しているが、障害肝においてはビタミン A を含んだ脂肪滴を細胞外に放出して線維芽細胞様に変化して活性化する。活性化した星細胞は種々のサイトカインを放出すると同時に線維化の原因となるコラーゲン I α などの細胞外基質を産生することが明らかになっている。しかし、ビタミン A と肝線維化の関連についてはビタミン A を投与することで肝の線維化を予防できるという報告と、逆に肝の線維化を助長するという報告があり、統一した見解が得られていないのが現状である。今回の研究ではビタミン A を投与した群では非投与群に比べて閉塞性黄疸と薬剤性肝障害の 2 つの組織障害モデルにおいてその障害の程度が軽減していた。更に両障害モデルでの星細胞内の脂肪滴が減少しているのに対し、ビタミン A を同時に投与した同モデルでは星細胞内の脂肪滴は対照群と同様に維持されていた。この所見はビタミン A の投与が星細胞の脂肪滴内への貯蔵を促し、その形態を正常肝に見られるような静止期の星細胞の形態と同様に保つことで星細胞の活性化に伴う組織障害を抑制できる可能性を示唆している。また、一般にヒトの肝線維化においては初期に GFAP などのマーカーが出現し、その後肝線維化が進むにつれて KGF や α -SMA などのマーカーが強く発現するといわれている。今回の実験ではこれらの線維化マーカーの発現がビタミン A 投与により減弱されており、このことからビタミン A が肝線維化を抑制する事が示唆された。一方でビタミン A と並んで肝線維化を抑制する効果が期待される薬剤はカテキンやビタミン E 等の抗酸化剤を始めとしてシリマリン等のフラボノイド、プラスミン阻害剤、漢方薬等があり、近年になり多くの研究が行われている。これらの薬剤は星細胞が活性化して線維芽細胞に形質転換した際に産生される TGF- β 等のサイトカイン放出を抑制したり、星細胞の増殖を抑制するなどの効果に着目して肝線維化に対する効果が検証されている。本症患者において術後閉塞性黄疸が持続して胆汁うっ滞性肝障害を呈する症例のみでなく、黄疸がなく脂肪吸収障害も存在しない症例でも肝線維化が進行することを考慮すると、適切なビタミン A 投与により星細胞の線維芽細胞への転換を抑制することが出来れば肝線維化を防止できるのではないかと考えている。今回は組織学的観察を主体とした検証しか出来なかったため、今後は肝線維化に伴って産生される TGF- β やコラーゲン等の線維化関連物質の定量的分析を行って行く事でビタミン A の抗線維化作用をより詳細に検証する必要があると思われる。

論文審査の要旨

報告番号	総論第 4 号	学位申請者	村上 研一
審査委員	主査	坪内 博仁	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査 井戸 章雄
	副査	米澤 傑	副査 上野 真一

Therapeutic effects of vitamin A on experimental cholestatic rats with hepatic fibrosis

(肝線維化を伴ったラット胆汁うっ滞モデルに対するビタミンAの治療効果)

胆道閉鎖症では、肝門部の毛細胆管から排出される胆汁を腸管へと誘導する葛西手術が行われるが、手術により減黄が得られた症例でも、肝線維化が進行し肝硬変・肝不全に至ることも少なくない。肝星細胞は細胞内のビタミンAを含んだ脂肪滴を放出して活性化し、線維化に重要な役割を果たしていることが知られている。学位申請者らはビタミンA投与が肝星細胞の活性化を抑制することで抗線維化療法に繋がると考え、胆管結紮によるラット胆汁うっ滞モデルを作成し、同モデルに対するビタミンAの治療効果を検証した。

Wistarラットを用いて、開腹術のみ(対照群)、肝外胆管結紮群(BDL群)、ビタミンAを投与した胆管結紮群(BDL+VitA群)、四塩化炭素投与肝障害群(CCl₄群)、ビタミンAを投与した四塩化炭素肝障害群(CCl₄+VitA群)を作成した。これらの各群から肝組織を採取し、肝星細胞の形態的・機能的変化を光学顕微鏡、電子顕微鏡にて観察した。肝線維化の指標として、Keratinocyte Growth Factor (KGF)、 α -smooth muscle actin(SMA)、Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) に対する免疫染色を行った。GFAPによる免疫染色については電子顕微鏡での観察も加えた。

その結果、本研究により以下の知見が得られた。

- 1) HE染色による観察では、BDL群では門脈域を中心に胆管増生を伴った炎症性変化を、CCl₄群では中心静脈を中心として壊死性変化や脂肪変性を認めたが、いずれにおいてもビタミンAを投与した群ではそれらの組織障害が軽減していた。
- 2) 電子顕微鏡による観察では、BDL群、CCl₄群ともに対照群に比べて肝星細胞中のビタミンAの脂肪滴が減少していたのに対し、ビタミンAを投与した群では対照群と同等に脂肪滴を保持していた。
- 3) 免疫染色では、KGF、 α -SMAともに炎症性変化の強いBDL群の門脈域に強い発現が見られたが、BDL+VitA群ではその発現が減弱していた。同様に、GFAPもBDL群の門脈域ならびに増生した胆管部分に強く発現していたが、BDL+VitA群では発現が減弱していた。肝星細胞を電子顕微鏡で観察すると、GFAPは核内に局在していた。GFAPの肝星細胞核内での発現量は、有意にBDL+VitA群の方がBDL群よりも低かった。

本研究は、ビタミンA投与が肝星細胞の活性化を抑制することで胆管結紮モデル動物における肝線維化を軽減することを明らかにし、抗線維化療法としての可能性を示唆した点では意義の大きい研究である。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	総論第	4号	学位申請者	村上 研一
審査委員	主査	坪内 博仁	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	河野 嘉文	副査	井戸 章雄
	副査	米澤 傑	副査	上野 真一

主査および副査の5名は、平成23年6月21日、学位申請者 村上研一 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。

質問1) 実験動物としてラットを胆道閉鎖症のモデルとして用いる理由はなぜか。

(回答) マウスでは手技的に困難で、文献的にも一般的なラットを用いた胆管結紮モデルを選択した。

質問2) 総胆管を結紮するだけでは肝内胆管は閉塞しないが、それで胆道閉鎖症と同じ病態といえるか。

(回答) 胆道閉鎖症では肝内外の主要な胆管は閉塞し、肝内グリソン域には毛細胆管が増生する。しかし、このような動物モデルは存在せず、胆管結紮モデルでは、術後に肝内胆管は徐々に拡張するので、胆道閉鎖症の病態に類似していると考えた。

質問3) 胆管結紮モデルでは犠死させる時期を術後7日目と統一しているが、その理由はなぜか。

(回答) 術後14日目まで経過をみると、死亡するラットが多く、肝組織が採取できなかったため、生存している術後7日目に犠死させた。

質問4) ビタミンAは皮下注射しているが、ヒトで同様な投与方法を検証した文献はあるか。

(回答) 胆道閉鎖症患児の肝組織中のビタミンA濃度を検討した報告では、ビタミンAを筋注で投与している。

質問5) BDL群とCCl₄群とでビタミンAの投与方法が異なる理由はなぜか。

(回答) CCl₄群では組織障害が生ずるまで時間がかかるため、ビタミンAは数週単位での長期投与が必要で、BDL群では生存期間が1週間前後と短いため、ビタミンAは術前から投与した。

質問6) 免疫染色でGFAPが肝星細胞の核内に存在するメカニズムはなにか。

(回答) 肝星細胞の核内のGFAP陽性物質は、GFAPそのものでなく、GFAP類似物質が染色された可能性がある。文献的にも抗GFAP抗体が核内物質であるラミンと結合する事が報告されている。

質問7) 肝の線維化の評価にAZAN染色やcollagenの免疫染色は行わなかったか。

(回答) 今回は行っていない。

質問8) 今回対照群としているSham群とは開腹術のみを行ったモデルか。

(回答) BDL群におけるSham群は、開腹操作のみで胆管結紮は行っていない群である。

質問9) 胆管結紮モデル作成時の胆管結紮の位置はかなり末梢側のように見えるが、膵管を同時に結紮している可能性はないのか。

(回答) 膵組織を確認して可能なかぎりそのようなことのないように結紮したが、合流形態によっては膵管を結紮した可能性は否定できない。

質問10) BDLモデルにおけるビタミンAの組織修復作用は、抗線維化だけでなく、抗酸化作用も関係している可能性はないのか。

(回答) ビタミンAの持つ抗酸化作用の関与が線維化防止につながっている可能性は否定できない。

質問11) 線維化の初期反応をとらえるために、今回の3つの線維化マーカーを選択した理由はなぜか。

(回答) 線維化に特異的なマーカーとして線維化の初期から増加する事が文献的に報告されている KGF、 α -SMA、GFAP を選択した。

質問 12) 胆管結紮モデルではビタミン A は術前から投与されているが、前投与を行う群と行わない群で有効性に差があるか。

(回答) 前投与しない群では、有効性が低い可能性があるが、多くの実験でビタミン A は前投与されている。

質問 13) ビタミン A は 1 回 25,000 単位投与しているが、その際のビタミン A の血中濃度は測定したか。また、ラットにおいて 25,000 単位という投与量は適切か。

(回答) 今回ビタミン A の血中濃度は測定していない。投与量はこれまでの文献を参考に 25,000 単位とした。

質問 14) 引用文献でヒトにおけるビタミン A の筋注がビタミン A の血中濃度を上昇させていたとの事だが、それによって肝組織に抗線維化作用をもたらす事は難しいのか。

(回答) どんな投与方法であれ、最終的に肝組織でのビタミン A レベルが上昇すれば抗線維化作用が期待できると思われる。

質問 15) ヒトにおいてはビタミン A の筋注により血清のビタミン A レベルが上昇するというデータが実際にあるが、これをふまえた胆道閉鎖症に対するビタミン A の臨床試験はどこかで行われているのか。

(回答) 筋肉内投与の有効性を報告した症例報告はあるものの、調べた範囲ではそのような臨床試験は確認できなかった。

質問 16) ビタミン A による抗線維化作用は、障害を契機にした肝星細胞の活性化により一旦放出したビタミン A を過剰に投与して再度貯蔵させることで、肝星細胞の活性化を抑制できると解釈して良いのか。

(回答) 肝星細胞におけるビタミン A 貯蔵のメカニズムは不明であるが、ビタミン A を過剰に投与すると肝星細胞の脂肪滴が維持されるので、ビタミン A の放出より貯蔵が上回って、肝星細胞の形態が維持され、その活性化を抑制すると考えられる。

質問 17) 肝星細胞の脂肪滴を維持すると活性化が抑制されるメカニズムはなにか。

(回答) 一般に胞体内に脂肪滴が充満している肝星細胞ではその核が偏在/変形しており、この核の形態が核内の活性化につながる形質発現を抑制しているという説がある。

質問 18) 胆道閉鎖症の発生頻度は 10,000 人に 1 人との事だが、この頻度は、例えば 30 年前と比べて同じか。

(回答) 胆道閉鎖症についてはその発生頻度はあまり変化していない。

質問 19) 胆道閉鎖症の病因に遺伝子異常が疑われるが、この観点から病因を調べた研究はないか。

(回答) 遺伝子異常の関与を示唆する研究はあるが、明確にその遺伝子を解明したものはない。

質問 20) 今回のビタミン A の有効性を検証する上で形態的評価だけでなく、血清中のビリルビン値や AST/ALT 等の肝機能検査値の検証は行っていないのか。

(回答) 今回は行っていない。

質問 21) ビタミン A 投与により肝星細胞が活性化しないことが抗線維化作用に結びついているのか。

(回答) 前投与により活性化そのものを抑制している可能性と、一旦は活性化した肝星細胞がビタミン A の投与により再び静止状態に戻された可能性が考えられる。

質問 22) 今回のビタミン A の肝組織に与える有効性は「抗線維化作用」ではなく、「抗炎症作用」である可能性はないのか。ビタミン A の抗線維化作用を立証するには、肝硬変に対するビタミン A 投与の有効性を検証した方がよいのではないか。

(回答) 文献的にも線維化の初期段階ではビタミン A は、抗酸化作用だけでなく各種サイトカインの放出抑制など抗炎症作用もあると言われている。四塩化炭素モデルにおいては肝硬変に移行した組織をビタミン A が正常な肝組織に修復したという報告がある。

質問 23) 今回は胆汁うっ滞モデルとして外科的な胆管結紮モデルを選択しているが、内科的胆汁うっ滞を起こさせる α -Naphthylisothiocyanate (ANIT) による胆汁うっ滞モデルもある。このモデルにおけるビタミン A の有効性も検討してはどうか。

(回答) 検討したいと思う。

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同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。