

# 論 文 内 容 要 旨

Depletion of hepatic stellate cells inhibits hepatic steatosis in mice

(肝星細胞のアポトーシス誘導による肝脂肪化進展抑制効果の検討)

Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2022,  
in press.

主指導教員：伊藤 公訓 教授  
(広島大学病院 総合診療医学)

副指導教員：松尾 裕彰 教授  
(広島大学病院 病院薬剤学)

副指導教員：菅野 啓司 准教授  
(広島大学病院 総合診療医学)

河原 章浩

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

肝臓はエネルギーの貯蔵、供給、生体構成成分の生合成、解毒、胆汁生成など多彩な機能をつかさどる。肝細胞を筆頭にクッパー細胞、血管内皮細胞、肝星細胞 (Hepatic Stellate Cells: HSCs) などの非肝実質細胞の相互作用により、生命活動が維持されている。非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリック症候群の増加に伴い罹患率が上昇している。その 10~20%が長期経過のなかで非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を経て、肝硬変、肝癌に進展する。NAFLD/NASH の治療は、食事療法、運動療法による生活習慣の改善が第一とされ、基盤となる糖尿病、脂質異常症などの背景疾患に対する薬物療法はある程度確立されているが、NAFLD/NASH のために認可された薬剤は未だ存在せず、治療戦略の確立が急務である。HSC は正常な肝臓において、肝類洞側 Disse 腔に静止状態 (quiescent HSCs: qHSCs) で存在する。そして肝障害時に活性化し筋線維芽細胞様に形質変換する。この活性化 HSCs (activated HSC: aHSCs) はコラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの主な産生源として、肝線維化の進展において中心的な役割を果たす。そのため、肝線維症の治療ターゲットとして以前より検討がされてきた。aHSCs は様々なサイトカイン・ケモカインなどの液性因子を産生する。我々はこれまで、肝星細胞の産生する細胞外マトリックス蛋白であるペリオスチンが肝脂肪化に寄与することを報告した(J Gastroenterol Hepatol. 2020)。さらに、肝星細胞由来のケモカイン Ccl5 も肝脂肪化を誘導することが報告されている(Sci Rep. 2018)。液性因子の個々においては肝脂肪化に関し、促進的/抑制的に作用するか検討されているが、aHSCs 由来の液性因子全体として肝脂肪化に与える影響について検討した報告はない。

はじめに細胞実験で aHSCs 由来液性因子の肝細胞脂肪化に与える影響について検討を行った。ヒト不死化肝細胞株 Hc3716 およびヒト不死化肝星細胞株 LX2 をポアサイズ 3mM の Transwell®用いて共培養した。肝細胞の脂肪化は培養液に 300mM の脂肪酸 (オレイン酸: パルミチン酸=2:1) を添加し 72 時間後に BODIPY 染色および細胞内中性脂肪量定量にて評価した。Hc3716 単独培養群では肝細胞脂肪化は軽微に留まったが、LX2 との共培養下では脂肪化の増強が認められ、肝細胞中性脂肪量は 32%増加した。肝細胞脂肪化の機序を検討したところ、脂肪化関連核内受容体 PPAR $\gamma$  の発現とその下流分子で脂肪酸の取り込みに関与する CD36 の蛋白発現の増加が認められた。以上より aHSCs の存在は肝脂肪化に促進的に働いていることが示唆された。

さらに動物実験において、肝脂肪化進展における aHSCs の役割について検討する目的で、マウス NASH モデルに aHSCs のアポトーシスを誘導する Gliotoxin を投与した。8 週齢 C57/Bl6J マウスにコリン欠乏高脂肪食 (choline deficient, L-amino acid defined, high-fat diet: CDAHFD) を 4 週間投与し NASH モデルマウスを作成した。Gliotoxin は体重あたり 1mg/kg を週 1 回、腹腔内投与した。まず Gliotoxin が aHSC を特異的に減少させているか免疫染色を行った。NASH モデルマウスの肝臓内には  $\alpha$ SMA 陽性である aHSCs が顕著に増加していたが、Gliotoxin を投与した NASH モデルマウスにおいて、aHSCs は有意な減少がみられた。F4/80 陽性となる Kupffer 細胞も NASH モデルマウスにて増加がみられたが、Gliotoxin の投与による影響は受けなかった。また、aHSCs のマーカーである  $\alpha$ SMA、desmin の遺伝子発現は Gliotoxin の投与で

低下したが、*qHSCs* マーカー *GFAP*、*Kupffer* 細胞マーカー *ADGRE1*、*CLEC4E*、内皮細胞マーカー *eNOS* に変化はみられなかった。以上から、本動物モデルによる実験において *Gliotoxin* の投与は *aHSCs* を特異的に減少させることが示唆された。肝脂肪化に関して *HE* 染色、*Oil Red O* 染色にて組織学的に検討したところ、*NASH* モデルマウスでは著明な脂肪化がみられたが、*Gliotoxin* の併用群では脂肪化は抑制されていた。組織学的な所見と一致して、肝組織中の中性脂肪量が約 50% 低下し、血清 *ALT* 値も有意に改善した。*aHSCs* の減少に伴う脂肪化改善の機序を明らかにする目的で *real time-PCR* にて脂質代謝関連遺伝子に発現について検討したところ、*Gliotoxin* 投与にて *PPAR $\gamma$*  の発現低下あり、その下流遺伝子で肝臓への脂肪酸の取込みに関与する *FATP1*、*Ap2*、*CD36* の発現が低下した。以上の結果から、*aHSCs* 由来の液性因子の枯渇により、肝臓への脂肪酸取込みが抑制されることが肝脂肪化の抑制のメカニズムと考えられた。*aHSCs* の減少から予測されたとおり、*Gliotoxin* の投与にて組織学的に肝線維化も抑制され、線維化マーカーである *Col1A1*、*TGF- $\beta$*  の遺伝子発現の低下もみられた。

本論文では、*aHSCs* 由来の液性因子は肝細胞脂肪化を促進し、*aHSCs* のアポトーシスを誘導する *Gliotoxin* は肝線維化のみならず、肝脂肪化進展を予防することを示した。以上から、*NAFLD/NASH* の治療において *aHSCs* は治療戦略上で効果的・効率的な治療標的になりうるものと考えられた。