

氏名 (本籍)	向 井 強 (岐阜県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	乙第 1415 号
学位授与日付	平成 18 年 11 月 15 日
学位授与要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon- γ
審 査 委 員	(主査) 教授 森 脇 久 隆 (副査) 教授 高 見 剛 教授 石 塚 達 夫

論文内容の要旨

背景と目的

コラーゲンは細胞外マトリックスの主要成分として重要な働きをしているが、過剰な沈着は臓器の線維化を引き起こす。コラーゲンの産生はサイトカインをはじめとする生理物質によって複雑な調節を受けており、その調節機構の解明は線維化臓器の治療を考える上で重要である。肝硬変は肝炎ウイルス、アルコール、nonalcoholic steatohepatitis (NASH) 等が誘因となって発症するが、肝線維化の進行には、hepatic stellate cells (HSCs) が重要な役割を果たしていることが報告されている。HSCs は、活性化されると形質転換して筋線維芽細胞 (myofibroblast) となり、コラーゲン産生の増加、肝内の蓄積を促進する。また、肝線維化には、さまざまなサイトカインと細胞外マトリックスとの相互作用が重要であり、transforming growth factor- β (TGF- β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interferon- α (IFN- α), interferon- γ (IFN- γ) によって複雑な調節機構が作られている。近年、レプチンが TGF- β 産生増強を介して肝線維化を促進することが報告され、II 型糖尿病モデル (ob/ob ラット等) においては、レプチンあるいはレプチン受容体の欠如により肝線維化が抑制される。一方、I 型糖尿病モデルである Nonobese Diabetes マウス (NOD マウス) は、自己免疫学的な機序により膵 β 細胞が破壊されて糖尿病を発症し、その機序には、TNF- α や IFN- γ 等のサイトカインの関与が推察されている。また、NOD マウスは TNF- α による肝細胞アポトーシスに抵抗性であるとの報告もみられる。しかしながら、現在のところ I 型糖尿病モデルと肝線維化との関係についての報告はない。そこで今回、NOD マウスに Dimethylnitrosamine (DMN) を腹腔内投与することにより肝硬変を作成し、本モデルにおける肝線維化について検討した。

方法

- (1) NOD マウスおよびコントロールとして ICR マウスに DMN ($1\mu\text{l}/100\text{g body weight}$) を3日間連日腹腔内投与後、4日間休薬。最長6週間継続して肝硬変を作成した。肝細胞障害 (血清 ALT 値) および肝細胞アポトーシス (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end-labeling: TUNEL 染色) について、DMN 投与 2, 4, 6 週後にそれぞれ評価した。さらに、肝線維化 (Azan-Mallory 染色, 肝組織中 hydroxyproline 値) および HSCs の活性化 (α -smooth muscle actin: α -SMA 染色) について検討した。肝線維化の機序に関して、RNase protection assay 法 (RPA) にて、サイトカイン messenger RNA (mRNA) の発現を検討した。また、IFN- γ を産生する細胞の同定を目的に、FACS にて肝内浸潤単核球を解析した。
- (2) 抗 IFN- γ モノクローナル抗体 ($200\mu\text{g}/\text{body}$) を静脈内投与して IFN- γ の作用を中和した NOD マウスおよびコントロールとして γ グロブリン ($200\mu\text{g}/\text{body}$) を投与した NOD マウス・ICR マウスに対して、同様に DMN を4週間継続投与し、肝線維化について評価した。また、IFN- γ ノックアウトマウス (IFN- $\gamma^{-/-}$ マウス) および野生型マウス (IFN- $\gamma^{+/+}$ マウス; C57BL/6) に対しても、同様に DMN を4週間継続投与し、肝線維化について評価した。

結果

- (1) DMN 6 週間投与後の生存率は NOD マウスで有意に高かった (NOD 81.4% vs ICR 12.5% $p < 0.001$)。血清 ALT 値ならびに TUNEL 染色における肝細胞アポトーシスの程度には両マウス間に有意差は認められず、生存率の差は肝細胞障害や肝細胞アポトーシスによるものではないと考えられた。一方、

AZAN-Mallory 染色において、NOD マウスでは ICR マウスに比し肝線維化が有意に軽減していた。また、肝線維化の指標である肝組織中 hydroxyproline 値も、DMN 投与 2, 4, 6 週後のいずれにおいても、NOD マウスが ICR マウスに比し有意に低値であった (2, 4, 6 週; NOD=164.5, 257.9, 353.7 vs ICR=204.0, 318.5, 477.1 μ g/g wet liver)。また、肝線維化の進展に関与する HSCs の活性化を α -SMA 染色にて検討したところ、NOD マウスでは α -SMA 陽性細胞が少なく、HSCs の活性化が軽度であることが確認された。次に、NOD マウスにおいて肝線維化が抑制された機序について、RPA にて肝線維化に関与するサイトカインの発現を検討したところ、DMN を投与した NOD マウスにおいて肝内 IFN- γ mRNA の発現が、ICR マウスに比し有意に亢進していた。また、FACS によって IFN- γ は肝内 T-cell (CD3⁺) から産生されていることが確認された。

- (2) 抗 IFN- γ モノクローナル抗体を投与して IFN- γ の作用を中和した NOD マウスでは、肝線維化の増強を認め、肝組織中 hydroxyproline 値も増加していた。また、HSCs の活性化も亢進していた。IFN- $\gamma^{-/-}$ マウスにおいても同様に、DMN 投与により肝線維化の増強と HSCs 活性化の亢進が確認された。以上より、NOD マウスにおける肝線維化の抑制に IFN- γ が重要な役割を果たしていることが証明された。

考案・結語

DMN を腹腔内投与して作成した肝硬変モデルでは、約 4 週間で肝小葉構造の破綻と再生結節形成を伴うヒト肝硬変の病理学的特徴に類似した像がみられ、さらに腹水の貯留や黄疸といった肝不全徴候が出現し、DMN 投与開始から 45 日目にはすべてのコントロールマウスは肝不全により死亡する。しかし、I 型糖尿病モデルである NOD マウスは、コントロールである ICR マウスより高い生存率が得られた。肝細胞アポトーシスは、多くの肝細胞毒性による肝疾患の進行や肝線維化における最初の反応であるが、今回の実験において、両マウス間で肝細胞アポトーシスに有意差は認められず、肝細胞障害の程度にも差異はなかった。

次に、肝線維化について検討すると、NOD マウスは ICR マウスより肝線維化が軽度であった。つまり、NOD マウスでは、肝線維化が抑制されて肝硬変への進展が抑制され、その結果、生存率の改善が得られたと推察した。TGF- β は、HSCs を活性化して肝線維化を促進する中心的なサイトカインであるが、TNF- α や IFN- γ は HSCs の活性化を抑制してコラーゲンの産生を阻害する。そこで、肝線維化に関与するサイトカインの発現を RPA にて検討したところ、TGF- β や TNF- α の発現には差異はなかったが、DMN を投与した NOD マウスにおいて IFN- γ mRNA の発現が亢進していた。この結果より、NOD マウスにおける肝線維化抑制の機序として、肝組織内の IFN- γ 産生亢進が関与していることが示唆された。IFN- γ の肝線維化抑制効果は数多くの実験的肝線維化モデルで証明されており、その効果は強力に IFN- α の 10 倍程度とされる。また、FACS の解析により IFN- γ が肝内 T-cell から産生されていることが確認された。NOD マウスにおける膵 β 細胞の破壊が、同様に T-cell から産生された IFN- γ が関与しているという報告があり、興味深い結果であった。

さらに、中和抗体の投与により IFN- γ の効果を阻害した上で DMN を投与すると、コントロールマウスと同程度の肝線維化が起こることが確認された。この結果は、NOD マウスにおける肝線維化抑制に IFN- γ が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

以上より、IFN- γ の投与または肝内の IFN- γ 産生亢進を促す治療は、肝線維化の抑制に有効であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

申請者 向井 強は、肝障害に続発する肝線維化には遺伝的背景によって規定される差異があること、その少なくとも一部は T 細胞からの IFN- γ 産生能に依存することを証明した。本研究の成果は消化器病学、肝臓病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Prevention of hepatic fibrosis in nonobese diabetic mice: a critical role for interferon- γ
Liver International 26, 1006-1014(2006).