

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	孟 玲童
学位論文題目			
<p><b>Decreased portal circulation augments fibrosis and ductular reaction in nonalcoholic fatty liver disease in mice</b></p> <p>(門脈血流減少はマウス非アルコール性脂肪性肝疾患モデルにおける線維化と細胆管反応を増悪させる)</p> <p>共著者名 後藤正憲、田中宏樹、上小倉佑機、藤井裕美子、岡田陽子、古川博之、西川祐司</p> <p>The American Journal of Pathology (令和3年6月3日受理, 印刷中)</p>			
研究目的			
<p>本研究で我々は、C57BL/6Jマウスに数パーセントの頻度で出現する門脈一下大静脈シャント(1)に注目し、門脈血流異常がnon-alcoholic steatohepatitis (NASH)の病態にどのような影響を与えるかを検討した。NASHを誘導するマウスモデルとしてコリン欠乏アミノ酸調整高脂肪食 (choline-deficient L-amino acid-defined high fat diet, CDAHFD) を用い、四塩化炭素急性傷害および慢性傷害に対する影響と比較した。その結果、シャントは四塩化炭素傷害を軽減するが、NASHの進展を促進することが明らかになったので報告する。</p>			
材料・方法			
<p><b>動物実験</b></p> <p>雄性成熟C57BL/6Jマウスを用い実験を行った。CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg、皮下注射) を単回 (急性肝傷害モデル)、もしくは週3回、10週間 (慢性肝傷害モデル) 投与した。CDAHFD食 (対照はregular diet, RD) を1週から12週間与え、脂肪肝もしくはNASHを誘導した。肝組織標本を作製し、シャントの有無による傷害程度の違いを検討した。また、組織酸素化状態を調べるため、一部の実験では肝組織採取2時間前に低酸素領域に特異的に結合するpimonidazoleを投与した。さらに、portal vein ligation (PVL)モデルとして、マウスの門脈本幹を麻酔下で露出し、25G針とともに縫合糸で結紮した後に針を抜去する実験を行った。PVL後2週間からCDAHFD食 (対照はRD) を開始し、8週間後にマウスの解析を行った。</p>			

## 免疫組織化学

門脈からリン酸緩衝4% paraformaldehydeで灌流した後、肝を4°Cで24時間浸漬固定し、アルコール脱水、キシレン透徹を行った後、パラフィン包埋した。切片を脱パラフィンし、Target Retrieval Solution (DAKO)で抗原を賦活化をした。Anti-cytokeratin (CK)19抗体、anti-fibrinogen抗体、anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 抗体、anti-CYP2E1抗体、anti-8-hydroxyguanine (8-OHdG)抗体、anti-connective tissue growth factor (CTGF)抗体、anti-pimonidazole抗体、anti-carbonic anhydrase (CA)9抗体、anti-VEGF抗体、anti-CD31抗体、anti-p62抗体を用い、EnVision/HRP法で3,3'-diaminobenzidine hydrochlorideにより可視化した。

## その他

CYP2E1、 $\alpha$ -SMA発現のWestern blot解析、*Acta2* mRNAの定量RT-PCR解析を行った。また、ROSA26RマウスにCre発現アデノ随伴ウイルスセロタイプ8 (AAV8) を感染するin vivo肝細胞追跡系を用い、CDAHFD食で誘導される細胆管反応の細胞起源を調べた。

## 成 績

### 門脈ー下大静脈シャント個体における肝の肉眼的・組織学的特徴

シャントがある個体では肝表面が凹凸不整で、肝縁も鈍であり、肉眼的に容易に判定可能であった。門脈から墨汁を注入すると肝内には入らずに、下大静脈から流出した。肝組織の連続切片による検討で、門脈と下大静脈が静脈管（開存）を介して連続していることが確認された。グリソン鞘に強い壁肥厚を伴うよく発達した肝動脈が認められた。グリソン鞘から逸脱し、小葉内に局在する細胆管が多く存在したが、小葉内の線維化はほとんどみられなかった。

### 四塩化炭素肝傷害に対するシャントの影響

四塩化炭素を単回投与し、3日後に肝組織を観察すると、小葉中心部にフィブリノーゲン陽性の壊死組織があり、 $\alpha$ -SMA陽性の活性化肝星細胞が多数認められた。しかし、シャントがある個体では、対照と比較し、血漿ALTの上昇レベルが低く、傷害の程度も軽度であった。四塩化炭素のラジカル化に関わるCYP2E1は小葉中心領域の肝細胞に発現するが、染色強度はシャントマウスにおいてより強く認められ、この結果はWestern blot解析によっても確認された。一方、8-OHdG免疫組織化学では、対照マウスに較べシャントマウスで染色性が弱かった。また、四塩化炭素慢性傷害モデル（10週間投与）では、シャントマウスにおける線維化、肝星細胞活性化、細胆管反応は対照マウスに較べ軽度であった。

### NASHモデルでの肝線維化に対するシャントの影響

シャントの有無にかかわらずCDAHFD食により高度の肝脂肪化が誘導された。対照マウスでは脂肪化はゾーン1から始まり、ゾーン3に次第に進展していったが、シャントマウス

では初めからゾーン3に強い脂肪化が認められた。また、CDAHFD食により上昇する血漿ALTのレベルに差はなかったが、ALP と総ビリルビンのレベルはシャントマウスにおいて高値であった。RD食、CDAHFD食いずれにおいてもシャントマウスでは総胆汁酸（TBA）レベルが上昇していた。CDAHFD食によりゾーン2・3を中心とする線維化が進行したが、その程度はシャントマウスで対照マウスに較べ強かった。

#### **NASHに伴うCTGF発現および細胆管反応に対するシャントの影響**

NASHモデルでは対照肝、シャントマウス肝いずれにおいても $\alpha$ -SMA陽性の活性型肝星細胞はほとんどみられなかった。しかし、脂肪を蓄積した肝細胞はCTGFを発現し、その数および染色性はシャントマウス肝においてより顕著であった。

NASHモデルではグリソン鞘から連続する高度の細胆管反応が認められたが、その程度はシャントマウス肝で強く、定量解析でも有意差が確認された。In vivo肝細胞追跡系（AAV8-Cre感染ROSA26Rマウス）を用い、細胆管反応の細胞由来を検討したところ、細胆管反応はX-gal陰性であり、細胆管反応は既存胆管上皮の増殖とこれらの小葉中心部への移動により起こることが明らかになった。

#### **肝組織酸素化状態に与えるシャントの影響**

Pimonidazoleを投与した後に肝組織標本を作製し、抗pimonidazole染色を行い、組織酸素化状態を検討した。対照マウス肝では肝小葉全体にわたり、弱陽性に染色された。一方、シャントマウス肝では、ゾーン1の染色性が対照肝と比較し減弱していたのに対し、ゾーン3は強陽性であり、シャントがあると、ゾーン1、2が高酸素化される一方、小葉中心部ではむしろ低酸素状態となることが示唆された。CDAHFD食を8週間与えたNASH肝では小葉全体に染色性が増強されたが、シャントマウス肝の方が対照肝より強く染色され、シャントマウス肝において組織低酸素化がより強いことが推定された。低酸素マーカーである CA9 の免疫組織化学では、NASH肝でより強い染色性がみられ、その程度はシャントによって増強された。さらに低酸素により発現が誘導されることが知られているVEGFは、脂肪を蓄積する肝細胞で陽性となったが、その発現レベルは シャントマウスにおいてより高かった。シャントマウスのNASH肝の小葉中心領域には、CD31陽性の内皮細胞を持つ微小血管が多数観察された。肝細胞におけるp62の発現はシャントマウス肝においてより強く、シャントによる循環障害でオートファジー障害が誘導されることが示唆された。

#### **NASH病態に対するPVLの影響**

PVL後に8週間CDAHFDを与えたNASH肝組織を観察すると、肝動脈の拡張および壁肥厚がみられた。脂肪化の程度には明らかな差は認められなかったが、Sirius redで染色される結合織の量はPVLにより有意に増加した。また、細胆管反応の程度もPVLにより増強した。

## 考 案

シャントは門脈血流の一部もしくはすべてが肝を經由せずに、体循環に流入する血管異常であり、傍門脈分路の存在、門脈血管構造の数の増加、肝動脈壁の肥厚などの特徴が認められる。ヒトではきわめて頻度が低いとされるが、C57BL/6Jマウスではしばしば観察される(約5%) (1)。また、同様のシャントはNrf2ノックアウトマウス(2)やFut2ノックアウトマウスにおいて高頻度に認められることが報告されているが、シャントが形成されるメカニズムは不明である。

シャントがある場合、四塩化炭素投与による急性肝傷害が軽減されることが報告されている(2)。本研究でも同様の傾向が認められ、慢性肝傷害での線維化や細胆管反応もシャントで減弱することが明らかになった。その原因を先行研究(2)は四塩化炭素を代謝するCYP2E1の発現低下で説明しているが、本研究での実験結果ではシャントでのCYP2E1は対照と同程度であり、我々は、シャントによる四塩化炭素傷害減弱は小葉中心部の低酸素状態が四塩化炭素のラジカル化を抑制するためであると推定している。

本研究で我々は、CDAHFD食によるNASHの病態がシャントで増悪することを初めて示した。これは、NASHの進展に門脈循環障害が重要な意義を持つことを示唆している。類似したNASH病態の増悪はPVLモデルでも確認された。NASH肝では組織の低酸素化が起こるが、シャントがある場合、さらに強い低酸素化が起こっており、低酸素マーカーの発現もこれに合致した変化を示した。門脈循環障害が肝組織低酸素化を介して病態を悪化させている可能性が考えられる。

CDAHFD食によるNASHモデルでは肝線維化の進展とともに細胆管反応が認められることが報告されている(3)。本研究は、シャントがある場合に細胆管反応が増強することを明らかにした。また、細胆管反応の細胞起源については諸説があるが、我々はNASHでの細胆管反応が既存細胆管上皮細胞の増殖および小葉中心部への移動によって起こることを初めて証明した。

四塩化炭素慢性傷害モデルと異なり、NASHの線維化病巣では $\alpha$ -SMA陽性の活性化肝星細胞はほとんど出現せず、線維化の機序が異なると考えられる。我々は脂肪を蓄積する肝細胞にCTGF陽性所見があり、その発現がシャントでより強くなることから、CTGFによる肝線維化がNASHの進展に重要ではないかと推測している。

## 結 論

門脈血流の減少と組織低酸素化がNASHの病態の進行に寄与することが示唆された。ヒトでのシャントの頻度は低いが、NASHを含む慢性肝疾患では種々の程度の肝内シャントが起こることが知られており、ヒトNASHの病態にも関連している可能性がある。

## 引 用 文 献

1. Cudalbu C et al., The C57BL/6J mouse exhibits sporadic congenital portosystemic shunts. PLoS One 2013, 8:e69782
2. Skoko JJ et al., Loss of Nrf2 in mice evokes a congenital intrahepatic shunt that alters hepatic oxygen and protein expression gradients and toxicity. Toxicol Sci 2014, 141:112-119
3. Paradis V et al., High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2001, 34:738-744

## 参 考 论 文

1. Hagiwara M et al., Applicability of Combined Use of Extracorporeal Support and Temperature-Controlled Machine Perfusion Preservation for Liver Procurement of Donors After Cardiac Death in Pigs. Transpl Proc, 2016, 48:1234–1238
2. Meng L et al., Scanning Electron Microscopy Findings of Machine Perfused Liver Graft After Warm Ischemia Between Hypothermic and Rewarming Machine Perfusion in Pigs. Transpl Proc, 2016, 48:2467–2470
3. Kanazawa H et al., Impact of Machine Perfusion on Sinusoid Microcirculation of Liver Graft Donated After Cardiac Death. J Surg Res, 2020, 245: 410–419
4. Liu Y et al., Generation of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma through transdifferentiation and dedifferentiation in p53-knockout mice. Cancer Sci 2001 (in press)

