

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	滝山 貴央
<p>学位論文題目</p> <p>A maternal high-fat diet induces fetal origins of NASH-HCC in mice. (母体高脂肪食はマウスにおいて胎生期起源性脂肪性肝炎-肝癌を誘発する)</p> <p>共著者名</p> <p>世良俊博、中村匡徳、星野真人、上杉健太郎、堀家慎一、目黒(堀家)牧子、別所瞭一、 滝山侑里、橋内博哉、竹田安孝、澤本一樹、八木直人、西川祐司、滝山由美</p> <p>Scientific Reports 2022 Jul 30;12(1):13136. doi: 10.1038/s41598-022-17501-8.</p> <p>研究目的</p> <p>現在、生殖可能年齢女性の約50%が肥満¹であり、出生時の女性の7人に1人が妊娠糖尿病を発症している。胎児期の過栄養状態が、成人期に引き起こす代謝異常について早急な研究が必要である。</p> <p>非アルコール性脂肪性肝疾患(Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)は、世界成人人口4人に1人が罹患し、NAFLの進行形態である非アルコール性脂肪肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は肝硬変、そして肝癌(Hepatocellular carcinoma: HCC)の主要な原疾患である²。特に、小児では診断時、全症例の半数近くがNASHに進行している。米国の若年層におけるNASH/肝硬変を対象とした肝移植率は、2002年0.53%から2012年には4.46%と年14%増加しており、出生前の栄養環境の影響増大を示唆している。そこで、本研究では、母体の高脂肪食が子孫のNAFL/NASH/HCCの発症に及ぼす影響についての検討と、NASH/HCCの新規治療標的の同定を目的とした。</p> <p>材料・方法</p> <p>1. 胎生期起源性NASH-HCCマウスモデル: C57BL/6Jマウスを用い、妊娠中、対照食(control diet; CD)または高脂肪食(High fat diet; HFD)にて飼育し、出産後は両群ともにCDで飼育した。離乳後、雄仔マウスをCDにて飼育し、母親マウスの妊娠中食餌に応じてCD群とHFD群の2群とした。</p>			

2. 生理学および生化学的検討: 15週齢雄仔マウスの空腹時血糖、HbA1c、食餌摂取量、体重、血圧、ALT、NEFAを測定した。
3. 肝臓組織学的検討: Hematoxylin-Eosin染色、Masson Trichrome染色、また、HIF-1 α 、pimonidazole、CK19、HORMAD1の抗体を用い、免疫組織化学染色法にて各蛋白発現について検討した。
4. DNAマイクロアレイ: 胎生14.5日胎仔マウス肝臓組織よりtotal RNAを抽出しSurePrint G3 Mouse GE microarray 8x60K Ver. 2.0を用い、遺伝子解析した。
5. 放射光micro-CT imaging: 大型放射光施設SPring-8で、胎仔マウスの位相CT、成体期マウス肝臓の吸収CTを用い、肝臓体積・密度、血管径を測定した。
6. マウス初代肝細胞培養(Mouse Primary Hepatocytes; MPHs): 8週齢雄C57BL/6Jマウスよりコラゲナーゼ灌流法を用いて、肝実質細胞を単離後培養し、低酸素暴露または、HIF-1 α 、HIF-2 α の各siRNAを用いknockdownし、HIF-1 α 、HORMAD1発現について検討した。
7. qRT-PCR: 肝臓組織、MPHsよりRNeasy mini kit (QIAGEN社)を用いtotal RNAを抽出し、TaqManプローブを使用し、ABI Prism 7300 software(Applied Biosystems社)にて遺伝子発現について検討した。
8. Western blotting: 肝臓組織、MPHsよりRIPA Lysis Bufferを用い、total cell lysatesを抽出し、HIF-1 α 、HORMAD1蛋白発現について検討した。
9. 統計学的解析: パラメトリック検定には、一元配置分散分析およびBonferroni法による多重比較を行い、ノンパラメトリック検定としてKruskal-Wallis検定を行い、Mann-Whitney検定により群間比較を行った。

成 績

1. HFD群仔マウスは、CD群仔マウスと比較し、摂食量の増大($p<0.05$)、空腹時血糖・HbA1cの低下($p<0.05$)、また血清ALT、NEFAの高値を認めた($p<0.01$)。15週齢HFD群仔マウスは、脂肪肝を背景とし小葉中心性に進行する線維化病変をzone 3 (中心静脈領域)に認め($p<0.01$)、再生結節から腫瘍形成となる肝癌発生を認めた。15週齢HFD群仔マウス肝臓では、zone 3にHIF-1 α 、pimonidazoleが有意に増強しCK19陽性の細胆管反応増強を伴っていた。
2. DNA microarrayでHFD群においてCD群と比較し発現増強を認めた146遺伝子中、HORMAD1が4倍発現増強していた (fold change $\log_2=2.037$, $p=0.0006$)。
3. HORMAD1蛋白は、HFD群仔マウス肝臓組織において、胎生期から成体期にわたり、HIF-1 α 蛋白とともに発現増強していた。

4. MPHsにおいて低酸素曝露(1% O₂)はHormad1のmRNA、蛋白発現ともに有意に増強した。Hif-1 α siRNAは低酸素誘導Hormad1 mRNA発現を僅かに減少させた($p < 0.05$)。一方、抗酸化剤N-acetylcysteine (NAC)は有意に低酸素誘導Hormad1発現を抑制した($p < 0.01$)。ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体I阻害薬rotenoneが、正常酸素、低酸素状態ともにHormad1発現に影響を与えないことから、ミトコンドリア以外での活性酸素種生成によるHormad1発現誘導が示唆された。
5. 吸収CTでは、HFD群33週齢マウス肝腫瘍にbasket patternを認め、位相差CTでは、HFD群において胎生期より組織密度低下を呈する脂肪肝とともに、肝動脈拡張と門脈狭窄からなる肝血管異常構築を検出した。
6. HFD群では胎生14.5日において、肝臓体積の増大($p < 0.05$)を認めたが、臍帯静脈径はCD群と比較し有意差を認めなかった。Murrayの最小エネルギー仮説によると、血流量は供給する血管径によって決定される。肝臓体積当たりの血流量を比較するために、臍帯静脈径の3乗を肝臓体積で除した結果、HFD群では有意に減少していた($p < 0.01$)。HFD群胎仔マウス肝臓では、肝腫大を代償する血流不足から相対的低酸素状態に陥っていることが示唆された。

考 案

本研究において、母親マウスへの妊娠期高脂肪食負荷が仔マウスの成体期にNASHを背景病変としたHCCを誘発することを明らかとした。HFD群胎仔マウスにおいて、代償的血液供給を伴わない肝腫大を認め、肝臓に相対的な低酸素状態を引き起こし、血管remodelingを惹起したと考えられる。

また、胎生期過栄養状態誘発NAFL/NASH/HCC関連分子として同定したHORMAD1は、がん細胞におけるDNAミスマッチ修復に関与し、その過剰発現はゲノム不安定化を生じる³。HORMAD1の発現は、低酸素で誘導され、抗酸化剤NACで抑制されることから、低酸素によって発生する活性酸素種によることが示唆された。HORMAD1は、組織内低酸素状態とともに活性酸素種産生増大を呈示するとともに、NASH/HCCの新規biomarker、更には胎生期起源の代謝栄養関連慢性疾患の治療標的としての可能性が期待される。

結 論

母体の高脂肪食は、胎生期起源性NASH-HCCを誘発し、その新規治療標的としてHORMAD1を同定した。

引 用 文 献

1. Before the beginning: nutrition and lifestyle in the preconception period and its importance for future health. Stephenson J, Heslehurst N, Hall J, Schoenaker DAJM, Hutchinson J, Cade JE, Poston L, Barrett G, Crozier SR, Barker M, Kumaran K, Yajnik CS, Baird J, Mishra GD. *Lancet*. 2018 May 5;391(10132):1830-1841. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30311-8.
2. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention. Huang DQ, El-Serag HB, Loomba R. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021 Apr;18(4):223-238. doi: 10.1038/s41575-020-00381-6.
3. Aberrantly expressed HORMAD1 disrupts nuclear localization of MCM8-MCM9 complex and compromises DNA mismatch repair in cancer cells. Liu K, Wang Y, Zhu Q, Li P, Chen J, Tang Z, Shen Y, Cheng X, Lu LY, Liu Y. *Cell Death Dis*. 2020 Jul 9;11(7):519. doi: 10.1038/s41419-020-2736-1.

参 考 论 文

1. Hypoxia-inducible factor-1 α is the therapeutic target of the SGLT2 inhibitor for diabetic nephropathy. Bessho R, Takiyama Y, **Takiyama T**, Kitsunai H, Takeda Y, Sakagami H, Ota T. *Sci Rep*. 2019 Oct 14;9(1):14754. doi: 10.1038/s41598-019-51343-1.
2. Impacts of Diabetes and an SGLT2 Inhibitor on the Glomerular Number and Volume in db/db Mice, as Estimated by Synchrotron Radiation Micro-CT at SPring-8. Takiyama Y, Sera T, Nakamura M, Ishizeki K, Saijo Y, Yanagimachi T, Maeda M, Bessho R, **Takiyama T**, Kitsunai H, Sakagami H, Fujishiro D, Fujita Y, Makino Y, Abiko A, Hoshino M, Uesugi K, Yagi N, Ota T, Haneda M. *EBioMedicine*. 2018 Oct;36:329-346. doi: 10.1016/j.ebiom.2018.09.048.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	滝山 貴央
審査委員長 中山 恒 			
審査委員 川辺 淳一 			
審査委員 谷野 美智枝 			
学 位 論 文 題 目			
A maternal high-fat diet induces fetal origins of NASH-HCC in mice. (母体高脂肪食はマウスにおいて胎生期起源性脂肪性肝炎—肝癌を誘発する。)			
掲載雑誌 : Scientific Reports 12:12136; 2022			
(本論文が評価される点及び審査結果を600字から800字以内で簡潔に記載すること。)			
非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) は慢性的な肝疾患であり、世界の 4 人に 1 人が罹患している。NAFLD は、NASH、肝硬変へと進行し、肝がんに至るリスクを高めるため、早期に治療することが重要であるが、その発症に関わる分子機序には不明な点が多く残されている。申請者は、胎仔期の過栄養が NAFLD 発症に与える影響を検証するため、母マウスの妊娠期間中 (約 20 日) のみ、高脂肪食を与える飼育を行った。その結果生まれた胎仔は、高頻度で脂肪肝を発症していることが明らかになった。脂肪肝では炎症が惹起され、炎症部位は低酸素に陥り、低酸素誘導性因子 HIF-1 α が高発現していた。申請者は、この肝病変で誘導される遺伝子の同定を試み、 <i>HORMAD1</i> を同定した。 <i>HORMAD1</i> の発現誘導は、HIF には依存せず、低酸素下で発生する ROS に依存することが明らかになった。さらに、シンクロトロン放射光マイクロ CT を用いた解析から、脂肪肝は胎生期 14.5 日目には既に認められることが判明した。この時に肝肥大も認められたが、それに伴う血流量の増加は認められず、胎生肝の低酸素化が脂肪肝を誘導する一要因であることが考察された。			
個別に実施した試問において、申請者は研究の背景、手法、結果、今後の展望を発表し、質疑に明確に答えることができた。論文発表会では、胎生期低酸素環境の NAFLD 形成における役割、NASH・肝がん治療における <i>HORMAD1</i> を標的とするものの有効性、NASH と HIF-1 α の相互作用の可能性などの質問が出たが、いずれも適切に回答・考察がなされた。			
以上から、滝山氏は本学博士号 (医学) を授与するのにふさわしい学識を持つと本審査委員会は判断した。			