

学位論文

Doctor's Thesis

非アルコール性脂肪肝炎における Macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO)の発現とエンドトキシンの関与
(Induction of macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO) and possible involvement of endotoxin in nonalcoholic steatohepatitis)

吉 松 美 佳

Mika Yoshimatsu

指導教官名

熊本大学大学院医学研究科博士課程病理学第二

竹屋 元裕 教授

2004年度

1. 要旨

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) は肝疾患の一つで、肝不全に至ることもあり、高脂血症を含む代謝性疾患を合併することが多いが、その病態発生機序は未だ明らかにされていない。高脂血症と高脂肪食が NASH の原因となりうるかどうかを検討するため、野生型マウス (C57BL/6 マウス) と高脂血症モデルマウス (LDLR^{-/-}マウス、ApoE^{-/-}マウス) を用いて、普通食と高脂肪食にて飼育し、比較検討した。LDLR^{-/-}と ApoE^{-/-}マウスは、普通食で非常に高い血清コレステロール値を示し、その値は高脂肪食で飼育された野生型マウスの血清コレステロール値より、はるかに高い値を示した。しかし、これらの高脂血症モデルマウスでは、血清 ALT 値や脂肪肝炎の程度は野生型と明確な違いはみられなかった。高脂肪食群では、野生型及び高脂血症モデルマウスはいずれも普通食群と比べて、血清 ALT 値の上昇や、脂肪肝炎の形成がみられ、エンドトキシンにより発現が誘導されることが知られている MARCO の発現増加が肝に顕著にみられた。エンドトキシン半定量試験で、ApoE^{-/-}マウスの門脈血清のみが、エンドトキシン陽性となり、下大静脈血ではエンドトキシンは陰性であった。これらの結果から、長期高脂肪食飼育は、NASH を引き起こすが、高脂血症のみでは NASH の原因にはならないことが示された。また、肝を主体とする MARCO の発現や高脂肪食飼育 ApoE^{-/-}マウスでの門脈血のエンドトキシンの存在は、NASH の病因にエンドトキシンが関与している可能性が考えられた。

Summary

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is one of the life-threatening hepatic diseases; however, its pathogenesis is still unknown. To evaluate the causative role of hyperlipidemia and high-fat diet, we compared C57BL/6 mice with inherited hyperlipidemic model mice (LDLR^{-/-} mice and ApoE^{-/-} mice) fed a normal or a high-fat diet. LDLR^{-/-} and ApoE^{-/-} mice fed the normal diet showed significantly higher serum cholesterol level than that of C57BL/6 mice fed the high-fat diet. These mice, however, have shown neither significant elevation of serum ALT level nor histopathologic features of steatohepatitis. Whereas, high-fat diet groups of all three strains showed histopathological characteristics of steatohepatitis with elevated serum ALT levels and high expression of macrophage scavenger receptor MARCO mRNA in the liver. Semiquantitative endotoxin analysis showed an elevated serum endotoxin level in the portal vein but not in the vena cava in ApoE^{-/-} mice fed the high-fat diet. These results indicate that long-term feeding of a high-fat diet induces NASH, whereas hyperlipidemia alone is not enough to induce NASH. Liver-restricted induction of MARCO in mice with high-fat diet and portal endotoxemia in ApoE^{-/-} mice fed the high-fat diet suggest the possible involvement of endotoxin in pathogenesis of NASH.

2. 発表論文リスト

参考論文①

Mika Yoshimatsu, Yasuhiro Terasaki, Naomi Sakashita, Emi Kiyota, Hiroo Sato, Luc J.W. van der Laan and Motohiro Takeya

Induction of macrophage scavenger receptor MARCO in nonalcoholic steatohepatitis indicates possible involvement of endotoxin in its pathogenic process

International Journal of Experimental Pathology. in press.

参考論文②

高橋潔、森孝志、吉松美佳、坂下直実

マクロファージのエンドサイトーシスにおけるマクロファージスカベンジャー受容体の細胞内輸送経路。

生命の科学 50(6):581-587 1999

Takahashi K, Takeya M, Sakashita N, Yoshimatsu M, Jinnouchi K

The role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis.

Seminars in Clinical Immunology 19(1):29-38, 2000

高橋潔、吉松美佳

マクロファージの取り込みと細胞内消化機構

生命を支えるマクロファージ, A. 基礎編 (高橋潔、内藤眞、竹屋元裕編)

文光堂、 pp109-126 2001(分担)

3. 謝辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科病理学第二講座、竹屋元裕教授の指導の下行いました。研究においては勿論、他面にわたりご指導をいただきましたことに深く感謝致します。

研究全般において直接のご指導とご助言をいただきました熊本大学大学院医学研究科病理学第二講座、寺崎康弘助手、坂下直実講師に深く感謝致します。

熊本大学大学院医学研究科病理学第二講座の教室員の皆様には日頃からご助言、ご協力をいただきました。

皆様に心より感謝致します。

4. 略語一覽

MARCO: macrophage receptor with a collagenous structure

LDL: low-density lipoprotein

ApoE: apoprotein E

HRP: horseradish peroxidase

LPS: lipopolysaccharide

PBS: phosphate buffer saline

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

PCR: polymerase chain reaction

mRNA: messenger RNA

5. 研究の背景と目的

非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) は 1980 年に、らによって、アルコール既往歴のない患者で脂肪肝炎を示す疾患として報告された[1]。 NASH はアルコール性肝障害と類似の組織を示し、肝細胞への脂肪沈着、種々の程度の炎症細胞浸潤がみられ、また、線維化を示す場合もある[1,2]。 NASH は、肝硬変や肝不全に至ることもあり、近年では移植肝での肝機能不全の原因の一つとして注目されている[3,4]。罹患率が高く、肥満、糖尿病、高脂血症を合併していることが多く、これらの代謝疾患は NASH の危険因子として考えられている[5-7]。近年、糖尿病や肥満と NASH の関連については様々な実験的報告がなされているが[8,9]、高脂血症と NASH に関する報告はほとんどなされておらず、NASH の病態発生機序についても未だ解明されていない。

アルコール性脂肪肝炎に関しては、アルコール摂取により腸管の血管の透過性が高まり、腸管細菌叢由来のエンドトキシンが肝に流入することで Kupffer 細胞を活性化が引き金となり、肝細胞への脂肪沈着が起こることが報告されている[10-14]。近年、NASH の患者では腸内細菌叢の増殖や[15]、動物モデルで乳酸菌等のプロバイオティクス経口投与での脂肪肝炎抑制等の報告がなされており[16]、アルコール性脂肪肝炎と同様に腸内細菌由来エンドトキシンが病態発生に関与する可能性がある。

クラス A スカベンジャー受容体に属する macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO)は、エンドトキシン、バクテリアをリガンドとし、他のエンドトキシン受容体が通常状態でも発現しているのに対し、MARCO はエンドトキシンにより、発現が誘導される[17-21]。

本研究の目的

上述のように、NASH で高頻度の合併をみる高脂血症は、体質性の高脂血症あるいは食餌性の高脂血症がその病態に関与している可能性が考えられる。また、NASH においても、アルコール性脂肪肝炎の発症機序に係わる腸内細菌由来のエンドトキシンが、発症機序に関与している可能性が推測される。本研究では、高脂血症及び高脂肪食と NASH の関係を明らかとするため、野生型マウスと遺伝性高脂血症モデルマウスを用いて、普通食または高脂肪食飼育による肝の変化を病理組織学的に解析し、また、エンドトキシン受容体である macrophage receptor with a collagenous structure (MARCO)の発現及び門脈血中エ

ンドトキシンを測定し、NASHにおけるエンドトキシンの関与を検討した。

6. 材料と実験方法

6-1. 動物と飼料

野生型マウスとして8週齢メスの C57BL/6 を日本クレア（東京）より購入し用いた。遺伝性高脂血症モデルマウスとして C57BL/6 を背景とする LDL 受容体欠損マウス及び apoprotein E 欠損マウスを The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, United States)から購入し、8週齢メスの LDL 受容体欠損マウス及び8週齢オスの apoprotein E 欠損マウスを使用した。

普通食としてマウス用餌（CE-2、日本クレア、東京）を用い、高脂肪食はコレステロール 1.25%含有の餌（コレステロール 1.25%、グラニュー糖 50%、ミルクカゼイン 20%、コーンオイル 1%、コール酸ナトリウム 0.5%、DL-メチオニン 0.3%、ココアバター 5%、ビタミンミックス 1%、ミネラルミックス 5%、セルロース 4.95%（日本クレア、東京）を使用した。マウスは普通食群と高脂肪食群に分け、上記普通食または高脂肪食、および水を自由に与えて 12 時間の明/暗サイクル下で熊本大学動物資源開発研究センター内で飼育した。

6-2. 普通食群、高脂肪食群マウスモデルの作成

普通食群及び高脂肪食群マウスは、普通食または高脂肪食を用いて 12 週間飼育し、ジエチルエーテル麻酔を用いて屠殺後、体重を測定し、門脈及び下大静脈よりそれぞれ血液を、また全身臓器より肝、脾、腹腔リンパ節、胸腺、肺、胃、小腸、大腸、腎、心、脳を採取した。肝は採取後重量を測定した。血清サンプルは標準的酵素測定による血清総コレステロール及び ALT を測定するまで-80℃で保存した。

6-3. LPS 投与マウスの作成

エンドトキシン陽性コントロール群として野生型マウスに LPS (O111; Sigma-Aldrich 社, St.Louis, Missouri, United States) 100µg を尾静脈より投与し、投与後 24 時間経過後、ジエチルエーテル麻酔を用いて屠殺し、門脈及び下大静脈より血液を採取後、肝、脾、腹腔リンパ節、胸腺、肺、胃、小腸、大腸、腎、心、脳を採取した。

6-4. 病理組織学的解析

採取した肝は 10% の中性ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋した。包埋した組織は 3 μ m の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。肝内線維形成を確認するため Elastica Masson-Goldner 染色を行った。また、肝内脂肪沈着を同定するため、採取した肝組織を 2% の periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 溶液にて 4 $^{\circ}$ C、4 時間固定後、10%、15%、20% のスクロース溶液でそれぞれ 4 時間洗浄し、OCT compaund (Miles, Elkhart, Indiana, United States) にて包埋し、液体窒素で凍結した。包埋組織はクリオスッタト (Microm, Waldorf, Germany) を用いて 6 μ m に薄切し、Oil red O 染色を行った。

6-5. 免疫組織化学

免疫組織化学の一次抗体は、抗マウスマクロファージモノクローナル抗体である F4/80 (Serotec, Oxford, United Kingdom)、抗マウス好中球モノクローナル抗体である Gr-1 (LY-6G) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, United States)、抗マウス MARCO モノクローナル抗体である ED31 (van der Laan 氏より供与) を使用した。二次抗体は、HRP-labeled goat anti-rat IgG (Serotec, Oxford, United Kingdom) を用いた。F4/80 陽性細胞内の脂肪滴を確認するため、F4/80 抗体による免疫組織化学と Oil red O 染色の重染色を行った。

6-6. RNA 精製、cDNA 合成と reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay

採取した臓器を Lysing Matrix D と FastPrep (Qbiogene, Carlsbad, California, United States) で破碎し、QiaShredder (Qiagen, Valencia, California, United States)、RNeasy kit (Qiagen, Valencia, California, United States) を用いて RNA を精製した。RNA (1 μ g) は、Omniscript RT kit (Qiagen, Valencia, California, United States) を用いて、逆転写を行った。逆転写した cDNA 1 μ l に 0.2mmol/l dNTPs、PCR buffer、2.5U HotStarTaq DNA polymerase (以上 Qiagen, Valencia, California, United States)、0.5 μ mol/l のセンスとアンチセンス PCR プライマー、RNase-free water を加えた 20- μ l を反応液とした。使用した MARCO、TLR 2、GAPDH に対するセンス、アンチセンスの PCR プライマーは表 1 に示す配列を Invitrogen

社へ合成を依頼、購入した。PCR 反応条件は表 1 のとおりに行った。PCR 反応は iCycler (Bio-Rad Laboratories、Hercules、California、United States) にて行った。PCR 産物は 2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動し、Gel Doc 2000 analyzer (Bio-Rad Laboratories、Hercules、California、United States) を用いて解析した。

表 1 RT-PCR のプライマー配列と反応条件

target mRNA (PCR product)	Primer (sense) (antisense)	cycle		
			← 30 cycles →	
MARCO (277bp)	5'-GAAACAAAGGGGACATGGG-3' 5'-TCCACACCTGCAATCCCTG-3'	95°C→ 15min	94°C→55°C→72°C 30s 30s 1min	72°C 10min
TLR 2 (380bp)	5'-TGGAGACGCCAGCTCTGGCTCA-3' 5'-CAGCTTAAAGGGCGGGTCAAGAG-3'	95°C→ 15min	94°C→60°C→72°C 30s 30s 1min	72°C 10min
GAPDH (392bp)	5'-GGAAAGCTGTGGCGTTGGCGTGAT-3' 5'-CTGTTGCTGTAGCCGATTC-3'	95°C→ 15min	94°C→55°C→72°C 30s 30s 1min	72°C 10min

6-7. 半定量エンドトキシン測定

C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスの門脈血清及び下大静脈血清を 75°C 10 分でエンドトキシン抑制蛋白を失活させた後、血清を 2 倍希釈し、*Limulus* Amebocyte Lysate test kit (和光純薬、東京) を用いて 37°C 60 分静置し、半定量エンドトキシン測定を行った。凝固したものを 0.06EU/ml 以上のエンドトキシン濃度として判断した。実験操作は全て無菌操作にて行った。

6-8. 統計処理

普通食群と高脂肪食群の血清総コレステロール値、血清 ALT 値については、Student's-t test を用いて行い、解析ソフトとして、StatView Ver 5.0 (Macintosh Edition) を用いた。

7. 実験結果

7-1. 血清総コレステロール値

表 2 に普通食または高脂肪食飼育による飼育を初めて 12 週間後の血清総コレステロール値を示した。血清総コレステロール値は C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスのいずれも高脂肪食群で増加したが、普通食群で LDLR^{-/-}と ApoE^{-/-}マウスは、野生型の C57BL/6 マウスと比べて (C57BL/6 mice; 16.7 ± 4.6 mg/dl)、すでに非常に高い値を示した (LDLR^{-/-} マウス; 290 ± 81.1 mg/dl, ApoE^{-/-} マウス; 1093.0 ± 24.4 mg/dl)。高脂肪食群の血清総コレステロール値は C57BL/6 マウスで普通食群の約 4 倍の 68.0 ± 9.2mg/dl に、LDLR^{-/-}マウスでは普通食群の約 8 倍の 2466.7 ± 277.9 mg/dl に、ApoE^{-/-}マウスでは、1466.7 ± 58.4 mg/dl に増加した。

表 2. 血清総コレステロール値

Mouse strain	Total cholesterol level (mg/dl)	
	Normal diet	High-fat diet for 12 weeks
C57BL/6	16.7 ± 4.6	68.0 ± 9.2 *
LDLR ^{-/-}	290.6 ± 81.1	2466.7 ± 277.9 *
ApoE ^{-/-}	1093.0 ± 24.4	1466.7 ± 58.4 *

* $p < 0.01$.

7-2. 体重

体重は、C57BL/6 及び ApoE^{-/-}マウスでは、それぞれ普通食群と高脂肪食群との間に差はみられなかった (図 1A、1C)。LDLR^{-/-}マウスでは、高脂肪食群は普通食群より体重が軽度減少した (図 1B)。これらのマウスでは高脂肪食は肥満をおこさなかった。

7-3. 肝/体重比

普通食群の肝体重比は、C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスいずれも約 4%であったが、高脂肪食群では、C57BL/6 マウスで 10%、LDLR^{-/-}マウスで 8.8%、ApoE^{-/-}マウスで 6%に増加した (図 2A-C)。

7-4. 血清 ALT 値

肝障害の指標として血清 ALT 値を測定した。普通食群では、血清 ALT 値は C57BL/6 マウスで 15.7 ± 4.6 U/l、LDLR^{-/-}マウスで 18.7 ± 2.7 U/l、ApoE^{-/-}マウスで 25.7 ± 7 U/l であった (図 3A-C)。高脂肪食群では、それぞれの普通食群と比較して C57BL/6 マウスは約 4.3 倍の 68.0 ± 9.2 U/l に、LDLR^{-/-}マウスは約 2.8 倍の 51.7 ± 6.0 U/l であった (図 3A, 3B)。ApoE^{-/-}マウスは普通食群と高脂肪食群に統計的有意差はみられなかったが、高脂肪食群の血清 ALT 値は増加している傾向があった (図 3C)。

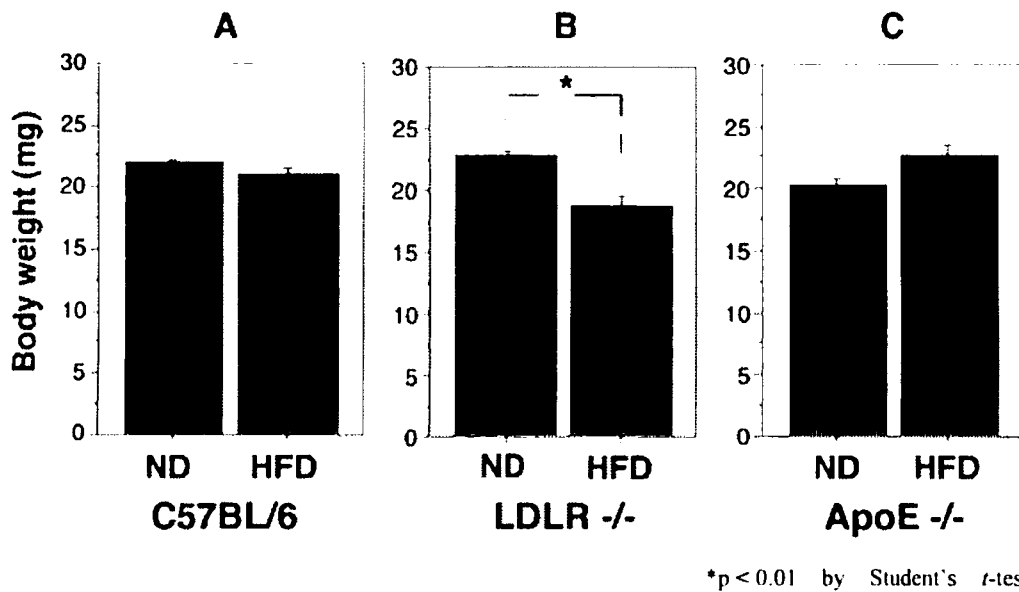
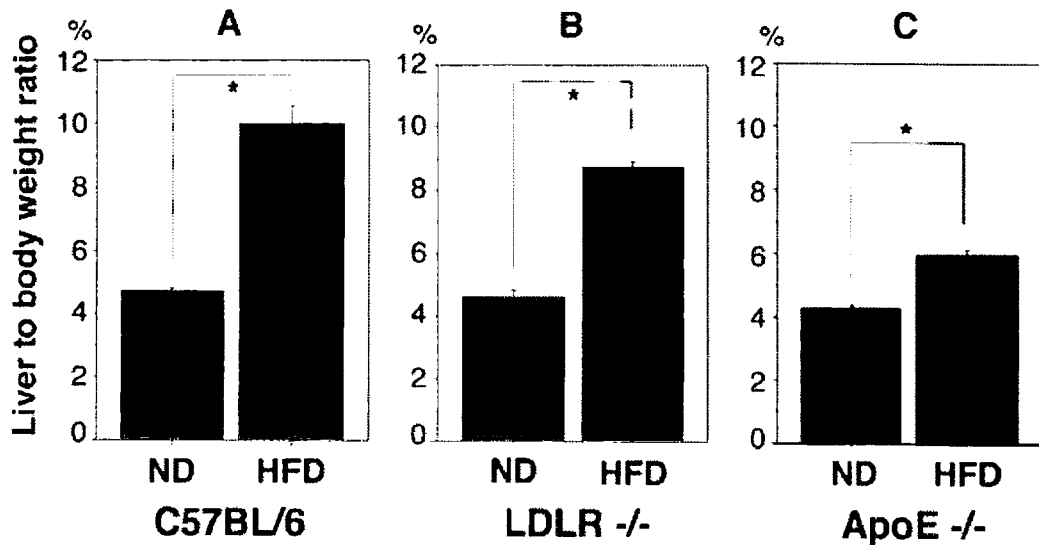


図 1. 普通食群と高脂肪食群のマウス体重

普通食 (ND) または高脂肪食 (HFD) で 12 週間飼育したマウス体重。
A: C57BL/6 マウス, B: LDL 受容体欠損マウス, C: ApoE 欠損マウス

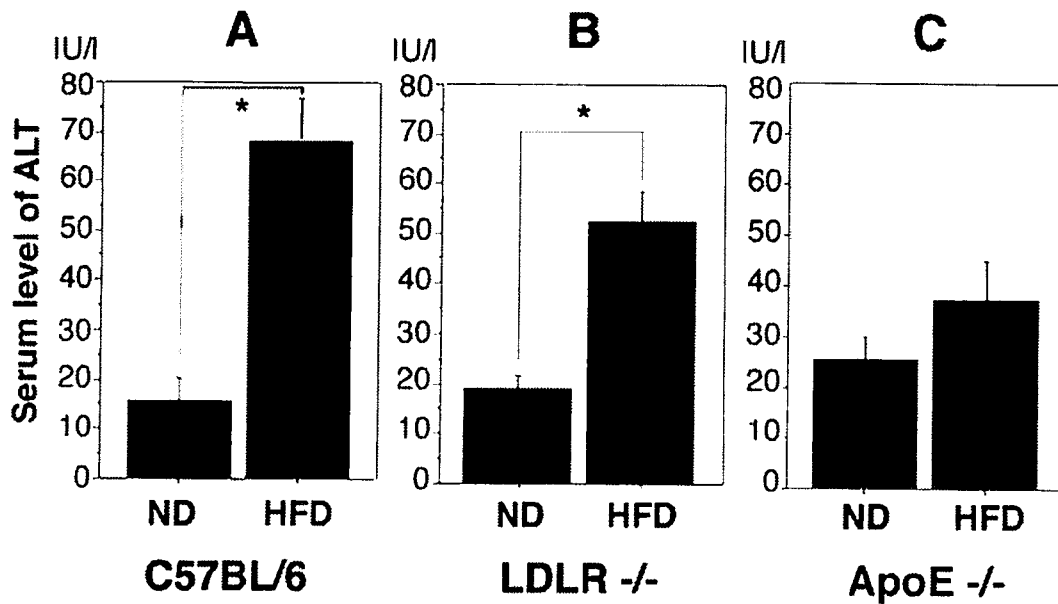


*p < 0.01 by Student's *t*-test.

図 2. 普通食群と高脂肪食群の肝体重比

普通食 (ND) または高脂肪食 (HFD) で 12 週間飼育したマウス肝体重比。

A: C57BL/6 マウス, B: LDL 受容体欠損マウス, C: ApoE 欠損マウス



*p < 0.01 by Student's *t*-test.

図 3. 血清 ALT 値

普通食 (ND) または高脂肪食 (HFD) で 12 週間飼育したマウスの血清 ALT 値。

A: C57BL/6 マウス, B: LDL 受容体欠損マウス, C: ApoE 欠損マウス

7-5. 病理組織学的所見

図 4 に普通食または高脂肪食 12 週間飼育した C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスの病理組織学的変化を示した。普通食飼育では、3 種のマウスに病理組織学的な違いはみられない (図 4A-C)。高脂肪食飼育では、3 種のマウスともに脂肪肝がみられ (図 4D-F)、肝細胞の風船化変性が認められる (図 4G-I)。脂肪染色にて、肝への脂肪沈着が確認できる (図 4J-L)。また、Elastica Masson-Goldner 染色にて中心静脈周囲に線維化も認められる (図 4M-O)。

7-6. 普通食または高脂肪食飼育肝における免疫組織化学による炎症細胞の同定

抗マウス好中球抗体である Gr-1 を用いた免疫組織化学では、普通食飼育の C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスともに、好中球の浸潤は殆どみられない (図 5A-C)。しかし、高脂肪食飼育の 3 種のマウスでは、好中球の浸潤が散見されるようになる (図 5D-F)

抗マウスマクロファージ抗体である F4/80 を用いた免疫組織化学では、普通食飼育 (図 6A-C) と比較して、高脂肪食飼育マウスの肝では、マクロファージ数の増加がみられ、泡沫細胞化がみられた (図 6D-F)。脂肪染色と F4/80 を用いた免疫組織化学との二重染色により、これら泡沫細胞化マクロファージに脂肪滴の沈着が確認できた (図 6G-I)。

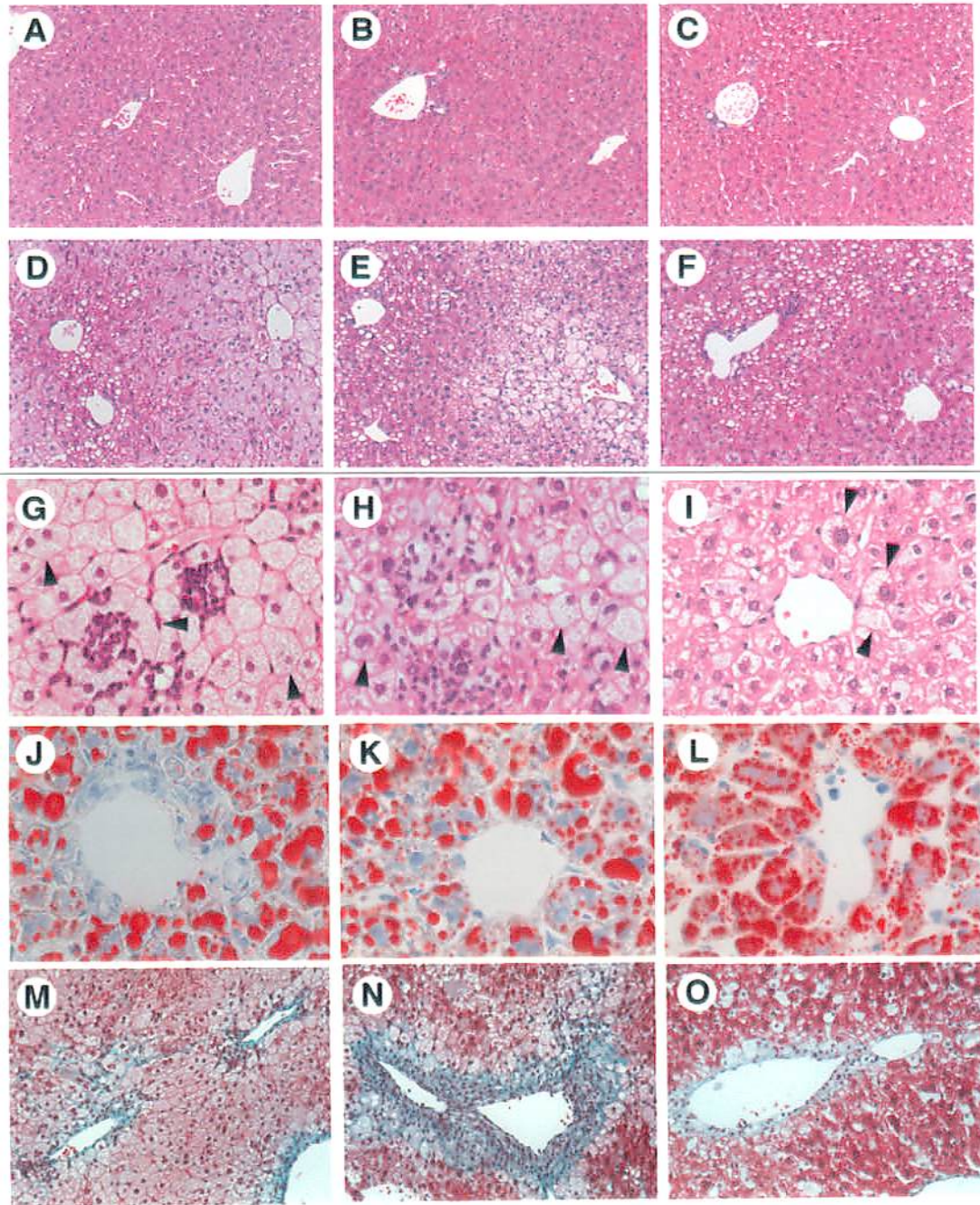


図4 普通食と高脂肪食飼育による病理組織学的変化

(A,D,G,J,M: C57BL/6 マウス、B,E,H,K,N: LDL 受容体欠損マウス、C,F,I,L,O: ApoE 欠損マウス、A-C: 普通食、HE 染色、×100、D-F: 高脂肪食、HE 染色、×100、G-I: 高脂肪食、HE 染色、×400、矢印：肝細胞の風船化、J-L: 高脂肪食、Oil red O 染色、×400、M-O: 高脂肪食、Elastica Masson-Goldner 染色、×200)

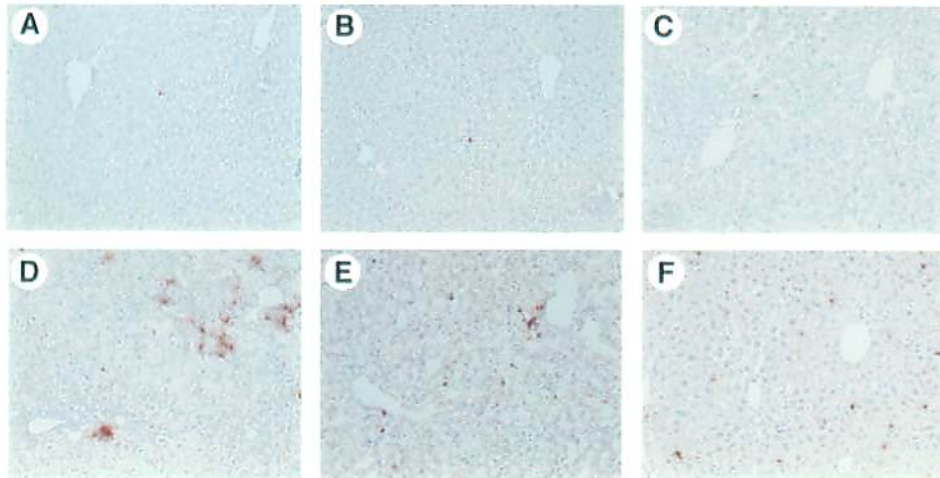


図5. 普通食または高脂肪食飼育肝における好中球浸潤
(A,D: C57BL/6 マウス、B,E: LDLR^{-/-}マウス、C,F: ApoE^{-/-}マウス、
A-C: 普通食、D-F: 高脂肪食、Gr-1、×100)

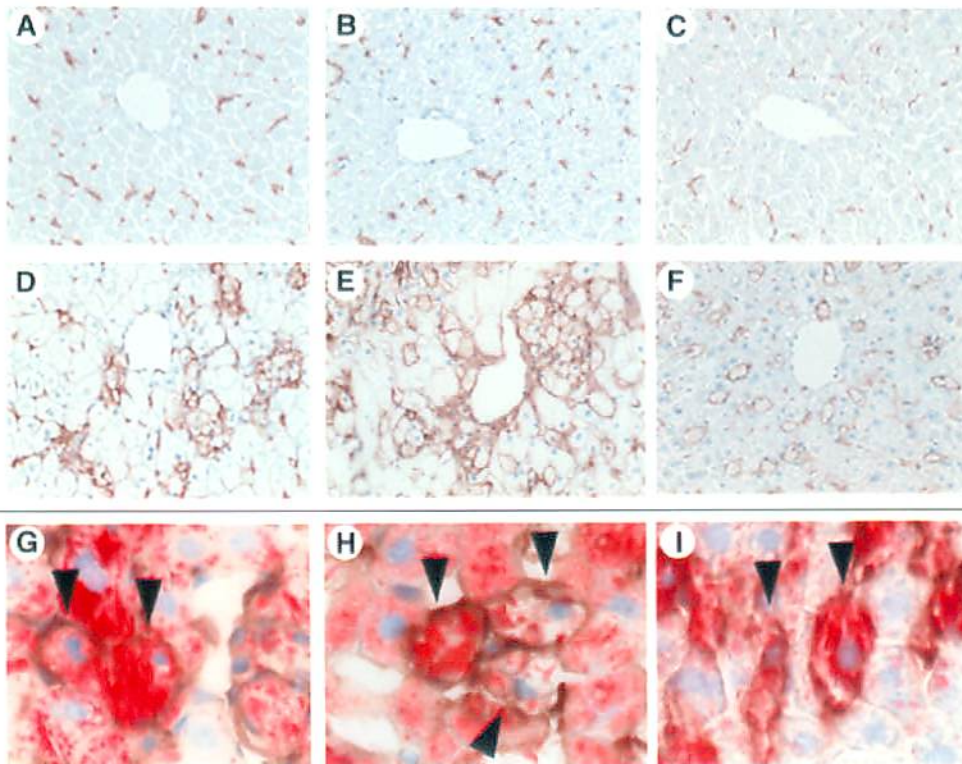


図6. 普通食または高脂肪食飼育肝におけるマクロファージ
(A,D,G: C57BL/6 マウス、B,E,H: LDLR^{-/-}マウス、C,F,I: ApoE^{-/-}マウス、
A-C: 普通食、D-F: 高脂肪食、F4/80、×200、G-H: 高脂肪食、二重染色 (F4/80+
Oil red O)、×1000、黒矢印：脂肪滴を含む泡沫細胞化マクロファージ)

7-7. 普通食、高脂肪食飼育肝における MARCO 蛋白と mRNA の発現

MARCO は LPS をリガンドとし、LPS によって発現が誘導されることが報告されている。普通食または高脂肪食飼育マウス肝での MARCO の発現を、免疫組織化学および RT-PCR にて検討した。抗マウス MARCO モノクローナル抗体である ED31 を用いた免疫組織化学では、普通食飼育肝では、C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスのいずれも MARCO 陽性細胞はほとんどみられない (図 7A-C)。しかし、高脂肪食飼育肝では、いずれのマウスでも MARCO 陽性細胞が出現した (図 7D-F)。

普通食または高脂肪食飼育マウス肝における MARCO mRNA は、高脂肪食飼育肝で顕著に発現増加を認めた。陽性実験として C57BL/6 に LPS を投与したのもので、肝に MARCO mRNA が増加することを確認した (図 8)。

普通食または高脂肪食飼育 C57BL/6, LDLR^{-/-}, ApoE^{-/-}マウス、また LPS を投与した C57BL/6 マウスにおける全身主要臓器における MARCO mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて解析した (図 9)。MARCO は通常状態で、脾とリンパ節に発現が限局しており、LPS 投与により全身多臓器に発現が誘導されることが、報告されている。今回の研究で、普通食飼育の C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスでは、報告同様、脾とリンパ節に MARCO 発現がみられたのみで、LPS 投与では、脳を含む様々な臓器に発現誘導が確認された (図 9)。高脂肪食飼育では、いずれのマウスも MARCO mRNA の強い発現が肝にみられ、肺には弱く認められた。その他の臓器での発現はみられなかった (図 9)。

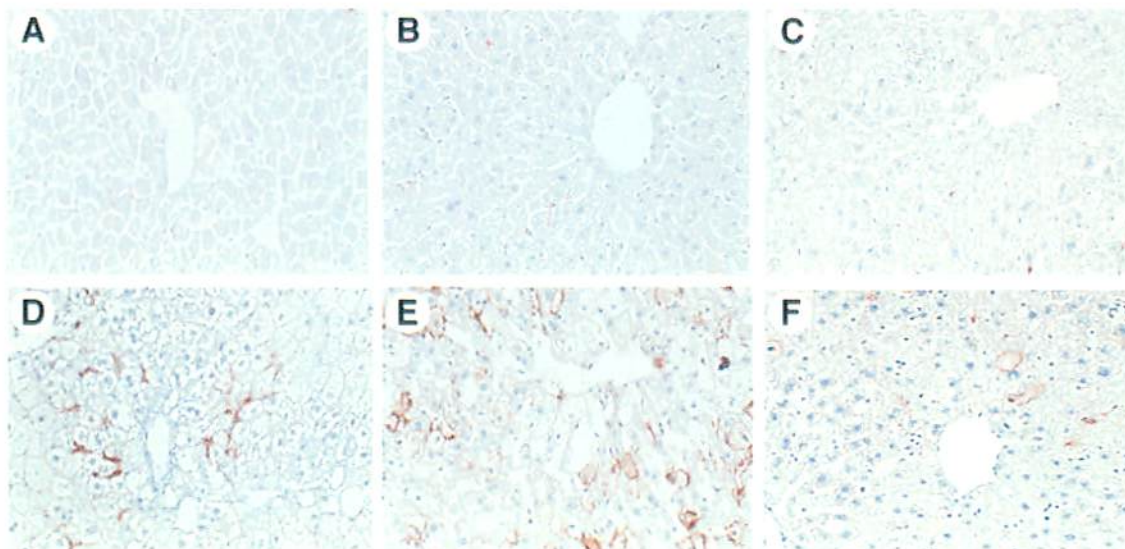


図 7. 普通食または高脂肪食飼育肝における MARCO 陽性細胞

(A,D: C57BL/6 マウス、B,E: LDLR-/-マウス、C,F: ApoE-/-マウス、
A-C: 普通食、D-F: 高脂肪食、ED31、×200)

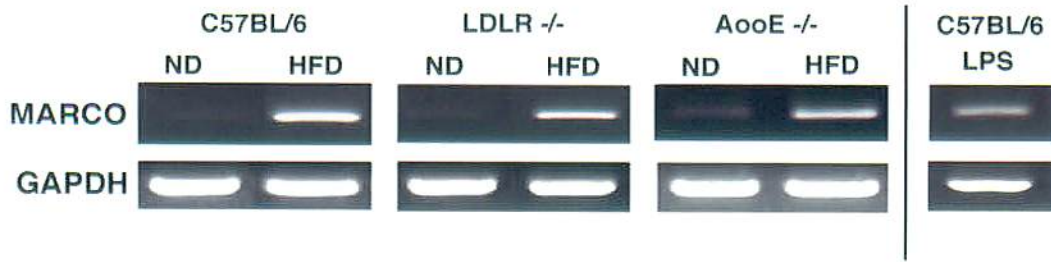


図 8. 普通食または高脂肪食飼育肝における MARCO mRNA の発現

(RT-PCR、ND: 普通食飼育、HFD: 高脂肪食飼育、LPS: LPS 投与)

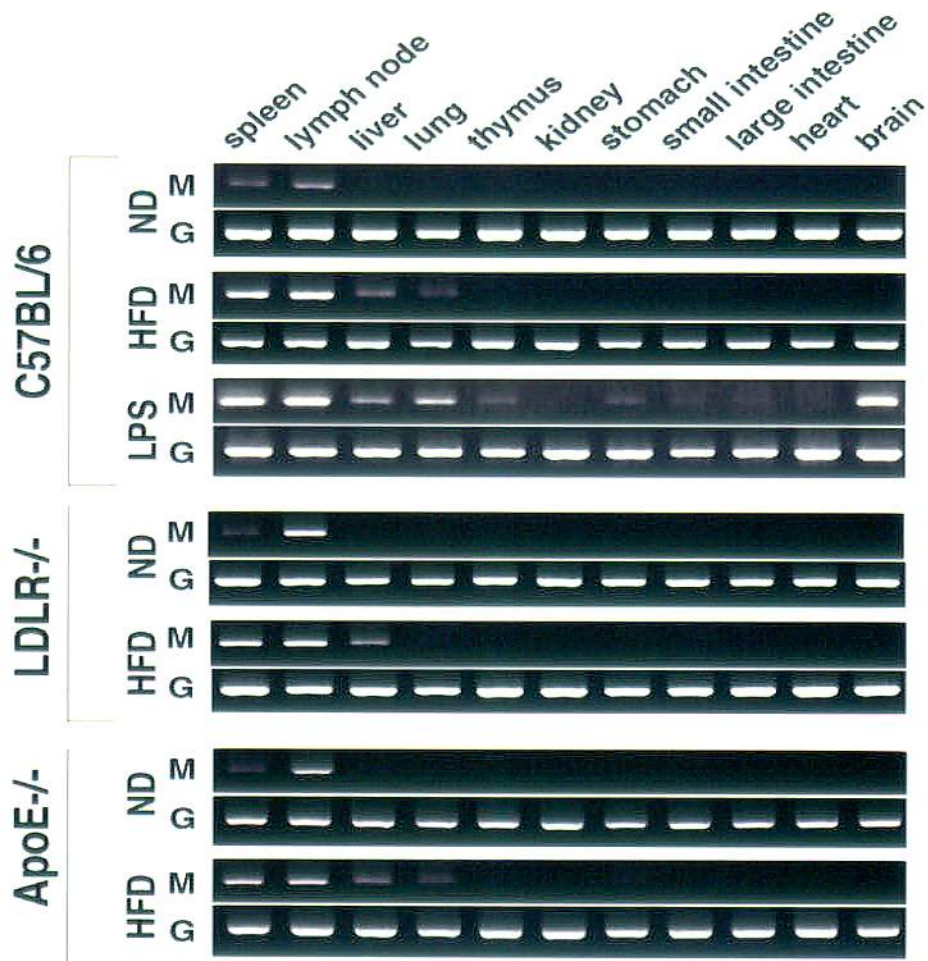


図 9. 普通食または高脂肪食飼育マウスにおける MARCO mRNA の発現

(RT-PCR により MARCO mRNA の全身主要臓器での発現、ND: 普通食飼育、HFD: 高脂肪食飼育、LPS: LPS 投与、M: MARCO, G: GAPDH)

7-8. 門脈血清および下大静脈血清におけるエンドトキシン量測定

血清中のエンドトキシンを測定するため、リムルステストを用いた半定量測定を行った。普通食または高脂肪食飼育 C57BL/6 および LDLR^{-/-}マウスでは、門脈血清および下大静脈血清のエンドトキシンは測定感度以下であった。ApoE^{-/-}マウスでは、普通食飼育では門脈血清および下大静脈血清はエンドトキシンは検出できなかったが、高脂肪食飼育では門脈血清にのみエンドトキシンが検出された (図 10A,B)。

A

	Portal vein	IVC
ND	-	-
HFD	+	-
LPS	+	+

B

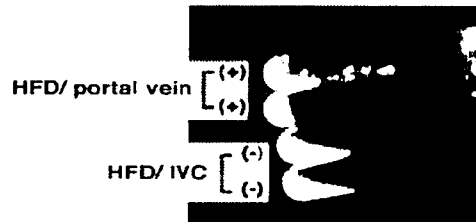


図 10. 普通食または高脂肪食飼育 ApoE^{-/-}マウスにおける門脈血清および下大静脈血清エンドトキシン

(A: リムルステスト結果表、portal vein: 門脈血清、IVC: 下大静脈血清、ND: 普通食飼育、HFD: 高脂肪食飼育。B: リムルステスト結果写真。 +: 0.06EU/ml 以上)

8. 考察

高脂血症は、肥満や糖尿病同様、NASH の危険因子と考えられている⁽⁵⁻⁷⁾。本研究において、LDLR^{-/-}マウスや ApoE^{-/-}マウスでは、普通食飼育ですで非常に高い血清総コレステロール値を示し、野生型マウスである C57BL/6 マウスの高脂肪食飼育時の血清総コレステロール値よりも顕著に高い値であった。しかし、これらの高脂血症モデルマウスでは、普通食飼育時に、血清 ALT 値の上昇や、肝腫大、脂肪肝炎の所見はみられなかった。一方、高脂肪食で長期飼育した C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスでは、血清総コレステロール値がそれぞれ顕著な違いがみられるにもかかわらず、血清 ALT 値の上昇、肝腫大、肝細胞への脂肪沈着、炎症細胞浸潤等の脂肪肝炎の所見が認められた。これらの結果から、高脂血症のみでは、脂肪肝炎を起こさず、高脂肪食を摂取することが、脂肪肝炎を起こすのに必要な因子であると考えられる。

アルコール性脂肪肝炎では、その脂肪肝炎の発生に、腸内細菌叢由来エンドトキシンの肝への流入が重要な因子であることが、明らかとされたが⁽¹⁰⁻¹⁴⁾、NASH におけるエンドトキシンの関与については、解明されていない。本研究で、高脂肪食飼育マウスでは、C57BL/6、LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスのいずれも、肝に MARCO 発現誘導がみられた。MARCO はクラス A スカベンジャー受容体に属する 1 回膜貫通型の受容体で、アセチル LDL、グラム陰性菌、陽性菌、および LPS をリガンドとする^(17-21,29,30)。他のエンドトキシン受容体が通常状態でも発現しているのに対し、MARCO は、通常状態では、脾の辺縁帯およびリンパ節の辺縁洞のマクロファージにのみ発現が限局しており、他の臓器に発現はみられない⁽¹⁷⁻²⁰⁾。しかし、敗血症やエンドトキシンの投与により、肝 Kupffer 細胞を含む全身のマクロファージに MARCO 発現が誘導される^(17,19,20)。本研究では、高脂肪食飼育により、通常状態で発現している脾とリンパ節に加えて、肝に有意に MARCO 発現がみられ、発現は高脂肪食飼育期間に比例して増加した。これらの結果から、高脂肪食飼育肝における MARCO 発現は、肝内のエンドトキシンにより誘導された可能性が示唆された。

肝内に流入するエンドトキシンを測定するため、門脈血清におけるエンドトキシンを測定し、全身血との比較のために下大静脈血清も同様に測定した。LDLR^{-/-}マウスと C57BL/6 マウスでは、門脈血清および下大静脈血清のいずれもエンドトキシンは検出できなかったが、ApoE^{-/-}マウスでは、高脂肪食飼育群

の門脈血清にのみエンドトキシンが検出された。高脂肪食飼育により門脈血エンドトキシンが増加する機序については、本研究で明らかにすることは出来なかったが、高脂肪食飼育肝に有意に MARCO 発現誘導がみられること、ApoE-/-マウスでは高脂肪食飼育により、門脈にエンドトキシンが検出されたことから、高脂肪食飼育による脂肪肝炎の病因として、エンドトキシンが関与する可能性が考えられた。今後、NASH の病態機序を明らかにするために、NASH 患者での MARCO 発現や、門脈血のエンドトキシンの定量的測定を施行する必要がある。

9. 結語

本研究では、高脂血症および高脂肪食の NASH への関与を高脂血症モデルマウスである LDLR^{-/-}、ApoE^{-/-}マウスおよび野生型マウスを用いて検討し、また、その病因として、エンドトキシンの関与について、MARCO 発現解析および門脈血、下大静脈血清中のエンドトキシン測定を行った。高脂血症モデルマウスでは、普通食飼育で、すでに高い血清総コレステロール値を示したが、肝に変化はみられなかったが、高脂肪食飼育により、血清総コレステロール値の違いにかかわらず、野生型マウスおよび高脂血症モデルマウスは、脂肪肝炎を呈した。また、高脂肪食飼育肝では、エンドトキシン受容体であり、エンドトキシンにより発現誘導がみられることが知られる MARCO の発現が認められ、ApoE^{-/-}マウスでは高脂肪食群で、門脈血清中にのみエンドトキシンが検出された。

以上の実験結果から、NASH の病態発生に、高脂血症が直接関与するのではなく、高脂肪食を摂取することが重要と結論された。さらに、高脂肪食摂取による脂肪肝炎には、腸内細菌由来のエンドトキシンが関与している可能性が示唆された。高脂肪食摂取および腸内細菌由来エンドトキシンの関与の解析は、NASH における発病、進展機序の解明にとって今後の重要な課題である。

10. 参考文献

- [1] J. Ludwig, T.R. Viggiano, D.B. McGill, et al., Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease, *Mayo. Clin. Proc.* 55 (1980) 434-438.
- [2] E.M. Brunt, Nonalcoholic steatohepatitis: definition and pathology, *Semin.Liver. Dis.* 21 (2001) 3-16.
- [3] S.A. Harrison, S. Torgerson, P.H. Hayashi, The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a clinical histopathological study, *Am. J. Gastroenterol.* 98 (2003) 2042-2047.
- [4] J.M. Hui, J.G. Kench, S. Chitturi, A. Sud, G.C. Farrell, K. Byth, P. Hall, M. Khan, J. George, Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C, *Hepatology* 38 (2003) 420-427.
- [5] S. Chitturi, S. Abeygunasekera, G.C. Farrell, J. Holmes-Walker, J.M. Hui, C. Fung, R. Karim, R. Lin, D. Samarasinghe, C. Liddle, M. Weltman, J. George, NASH and insulin resistance: Insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome, *Hepatology* 35 (2002) 373-379.
- [6] J.B. Dixon, P.S. Bhathal, P.E. O'Brien, Nonalcoholic fatty liver disease: predictors of nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis in the severely obese, *Gastroenterology* 121 (2001) 91-100.
- [7] C. García-Monzón, E. Martín-Pérez, O.L. Iacono, M. Fernández-Bermejo, P.L. Majano, A. Apolinario, E. Larrañaga, R. Moreno-Otero, Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity, *J. Hepatol.* 33 (2000) 716-724. Erratum in: *J. Hepatol.* 34 (2001) 180.
- [8] V. Paradis, G. Perlemuter, F. Bonvoust, D. Dargere, B. Pargait, M. Vidaud, M. Conti, S. Huet, N. Ba, C. Buffet, P. Bedossa, High glucose and

- hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 34 (2001) 738-744.
- [9] E. Santamaría, M.A. Avila, M.U. Latasa, A. Rubio, A. Martín-Duce, S.C. Lu, J.M. Mato, F.J. Corrales, Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as target of S-adenosylmethionine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 3065-3070.
- [10] I. Bjarnason, T.J. Peters, R.J. Wise. The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds, *Lancet* 1 (1984) 179-182.
- [11] N. Enomoto, K. Ikejima, B. Bradford, C. Rivera, H. Kono, D.A. Brenner, R.G. Thurman, Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin, *Gastroenterology* 115 (1998) 443-451.
- [12] T. Uesugi, M. Froh, G.E. Arteel, B.U. Bradford, M.D. Wheeler, E. Gäbele, F. Isayama, R.G. Thurman. Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice, *J. Immunol.* 168 (2002) 2963-2969.
- [13] Y. Adachi, L.E. Moore, B.U. Bradford, W. Gao, R.G. Thurman, Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol, *Gastroenterology* 108 (1995) 218-224.
- [14] A.A. Nanji, U. Khettry, S.M. Sadrzadeh, Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205 (1994) 243-247.
- [15] A.J. Wigg, I.C. Roberts-Thomson, R.B. Dymock, P.J. McCarthy, R.H. Grose, A.G. Cummins, The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 48 (2001) 206-211.

- [16] Z. Li, S.Y.H. Lin, J. Huang, P.A. Watkins, A.B. Moser, C. DeSimone, X. Song, A.M. Diehl, Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 37 (2003) 343-350.
- [17] O. Elomaa, M. Kangas, C. Sahlberg, J. Tuukkanen, R. Sormunen, A. Liakka, I. Thesleff, G. Kraal, K. Tryggvason, Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages, *Cell* 80 (1995) 603-609.
- [18] K. Takahashi, M. Takeya, N. Sakashita, Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in human and experimental animals, *Med. Electron. Microsc.* 35 (2002) 179-203.
- [19] L.J.W. van der Laan, M. Kangas, E.A. Döpp, E. Broug-Holub, O. Elomaa, K. Tryggvason, G. Kraal, Macrophage scavenger receptor MARCO: In vitro and in vivo regulation and involvement in the anti-bacterial host defense, *Immunol. Lett.* 57 (1997) 203-208.
- [20] L.J.W. van der Laan, E.A. Döpp, R. Howorth, T. Pikkarainen, M. Kangas, O. Elomaa, C.D. Dijkstra, S. Gordon, K. Tryggvason, G. Kraal, Regulation and functional involvement of macrophage scavenger receptor MARCO in clearance of bacteria in vivo, *J. Immunol.* 162 (1999) 939-947.
- [21] M. Sankala, A. Brännström, T. Schulthess, U. Bergmann, E. Morgunova, J. Engel, K. Tryggvason, T. Pikkarainen, Characterization of recombinant soluble macrophage scavenger receptor MARCO. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 33378-33385.
- [22] C.C. Allain, L.S. Poon, C.S. Chan, W. Richmond, P.C. Fu, Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20 (1974) 470-475.
- [23] W. Richmond, Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin.*

Chem. 19 (1973) 1350-1356.

- [24] H.U. Bergmeyer, P. Scheibe, A.W. Wahlefeld. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase, Clin. Chem. 24 (1978) 58-73.
- [25] H.U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press: New York, 1988
- [26] D.A. Hume, S. Gordon, The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and juxtaglomerular complex, J. Exp. Med. 157 (1983) 1704-1709.
- [27] C.M. Dubois, R. Neta, J.R. Keller, S.E. Jacobsen, J.J. Oppenheim, F. Ruscetti, Hematopoietic growth factors and glucocorticoids synergize to mimic the effects of IL-1 on granulocyte differentiation and IL-1 receptor induction on bone marrow cells in vivo, Exp. Hematol. 21 (1993) 303-310.
- [28] J. Levin, F.B. Bang, Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin, Thromb. Diath. Haemorrh. 19 (1966) 186-197.
- [29] S. Ito, M. Naito, Y. Kobayashi, H. Takatsuka, S. Jiang, H. Usuda, H. Umezu, G. Hasegawa, M. Arakawa, L.D. Shultz, O. Elomaa, K. Tryggvason, Roles of a macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) in host defense and heterogeneity of splenic marginal zone macrophages, Arch. Histol. Cytol. 62 (1999) 83-95.
- [30] O. Elomaa, M. Sankala, T. Pikkarainen, U. Bergmann, A. Tuuttila, A. Raatikainen-Ahokas, H. Sariola, K. Tryggvason, Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacterial-binding region. J. Biol. Chem. 273 (1998) 4530-4538.