

論文内容の要旨

Excess fructose enhances the cytotoxicity of unsaturated fatty acid
via reactive oxygen species production in hepatocytes

(フルクトースの過剰摂取が活性酸素産生を介して肝細胞に対する
不飽和脂肪酸の細胞毒性を増強させる)

(米澤剛広, 柿坂啓介, 鈴木悠地, 金沢条, 滝川康裕)
(岩手医学雑誌, 2020年12月掲載予定)

I. 研究目的

肥満, インスリン抵抗性を基盤としたメタボリックシンドローム, および肝表現型である非アルコール性脂肪肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) の罹患率が世界的に増加し, 重要な健康問題となっている. NAFLD のうち炎症・線維化を伴い肝硬変へ進展する非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) はウイルス性肝炎に代わる肝硬変, 肝細胞癌の原因として対策が急がれている.

NASH の分子機序として, パルミチン酸に代表される飽和脂肪酸が肝細胞におけるアポトーシスを誘導する作用や, フルクトースが活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) 産生を介して肝細胞ネクロシスを引き起こす作用などが想定されているが, 包括的な理解は得られていない.

本研究では, 脂肪とフルクトースの複合的な肝細胞毒性を評価するために, *in vivo* の実験で高脂肪食とスクロースを与えたマウスと高脂肪食のみを与えたマウスの比較を行った. さらに, 脂肪酸毒性に対するフルクトースの影響を明らかにする目的で, 飽和脂肪酸 (パルミチン酸)・不飽和脂肪酸 (オレイン酸) がフルクトース存在下で細胞にどのような影響があるかを検証した.

II. 研究対象ならび方法

1. *in vivo* 実験

雄の4週齢 C57BL/6J マウス (Charles River, 横浜, 日本) に, 通常食 (対照群), スクロース添加及び無添加の高脂肪食 (HFDS/HFD) を16週与えた後, 血液検体および肝組織を採取し, 以下の評価を行った. 全ての動物実験は, 岩手医科大学動物実験委員会 (盛岡市, 承認番号 28-001) 承認後に行った.

- 1) 血液生化学: 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), 総コレステロール (TC).
- 2) 肝組織学的評価: ヘマトキシリン・エオシン染色, マッソン・ゴールドナー染色.
- 3) 免疫組織化学検査: ヘモシアゲナーゼ-1 (HO-1)

- 4) 肝組織遺伝子発現: α -smooth muscle actin (α SMA), III型コラーゲン (リアルタイムPCR)
2. in vitro 実験
培養肝細胞として Huh7 (高分化型ヒト肝癌由来細胞株), HepG2 (高分化型ヒト肝癌由来細胞株) を用いた。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) にグルコースまたはフルクトースを添加した培養条件にパルミチン酸及びオレイン酸を添加して, 細胞増殖アッセイ, アポトーシス/ネクローシス/健常細胞検出キット (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) を用いた細胞死アッセイを行った。ROS の検出は CellROX グリーン試薬細胞 (cat. no. 10422; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加し, 蛍光顕微鏡検査法で評価した。細胞内シグナル蛋白の発現は免疫ブロッティング分析で確認した。さらに抗酸化物質 N-アセチルシステイン (NAC) を添加し, 細胞死における ROS の影響を評価した。
3. 統計解析
全てのデータは少なくとも 3 回の独立した実験結果を使用し, 連続変数は mean \pm s. d. で表した。群間の差は student's t-test と post-hoc Dunnett's test を使用した一元配置分散分析で検定した。

III. 研究結果

1. in vivo 実験
体重は対照群 (29.2 \pm 0.6g) に比して HFD 群 (45.6 \pm 2.4g) および HFDS 群 (50.9 \pm 2.0g) で有意に増加したが, HFD 群・HFDS 群間に差は無かった。AST は対照群 (66 \pm 5.7 mg/ml) よりも HFDS 群 (174 \pm 11.3 mg/ml) において有意に高かった。ALT 及び TC は対照群 (24 \pm 0 mg/ml), (96 \pm 10.6 mg/ml) よりも HFD 群 (122 \pm 32.7 mg/ml), (190 \pm 5.2 mg/ml) 及び HFDS 群 (138 \pm 19.8 mg/ml), (190 \pm 5.2 mg/ml) で有意に高値であった。組織学的評価では対照群に比して HFD 群, HFDS 群で脂肪滴を有する肝細胞が増加していた。リンパ球浸潤は HFDS でのみ観察された。 α SMA 及びコラーゲン III の mRNA 発現は, 対照群と比較して HFDS 群で増加していた。免疫組織学的検査で, HO-1 は HFDS で有意に発現亢進していた。
2. in vitro 実験
ヒト培養肝癌細胞株 Huh7, HepG2 細胞において, グルコース添加培養液を用いた場合, パルミチン酸のみで強く細胞増殖が抑制された。一方, フルクトース添加培養液では, パルミチン酸とオレイン酸で細胞増殖が抑制された。それぞれの培養条件で観察された増殖抑制を細胞死アッセイで確認したところ, パルミチン酸の細胞増殖抑制はいずれの培養条件下でもアポトーシスが主体であったが, フルクトース添加培養条件下では, オレイン酸による細胞増殖抑制はネクローシスが主体であった。HepG2 細胞において詳細な細胞内シグナル伝達を評価したところ, フルクトース添加培養条件下でのオレイン酸添加では, JNK リン酸化・カスパーゼ 3 活性化をみとめなかった。一方で, 同条件では, 細胞内 ROS が増加を示した。この ROS 増加はパルミチン酸添加では認めなかった。ROS 抑制の目的で NAC を投与したところ, フルクトース添加培養条件下オレイン酸添加で増強した ROS 産生が抑制され, ネクローシスが減少した。

IV. 結 語

高脂肪食によるマウス脂肪肝は、フルクトースを加えることにより脂肪性肝炎を誘発し、肝臓内の HO-1 発現を増加させた。また、肝細胞に対するフルクトース添加は、本来肝細胞保護的とされるオレイン酸負荷でも ROS 産生を介してネクローシスを誘導した。フルクトースの過剰摂取は、肝細胞における不飽和脂肪酸の脂肪毒性を増強する可能性がある。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 佐々木 章 (外科学学講座)

副査 准教授 宮坂 昭生 (内科学講座消化器内科肝臓分野)

副査 講師 王 挺 (医療開発研究部門)

非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)は、ウイルス性肝炎に代わる肝硬変や肝細胞癌の原因として早急な対策が必要である。NASH の分子機序として、飽和脂肪酸が肝細胞におけるアポトーシスを誘導する作用やフルクトースが活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)産生を介して肝細胞壊死を引き起こす作用などが想定されているが、包括的な理解は得られていない。本研究論文は、脂肪とフルクトースの複合的な肝細胞毒性を評価するために、マウスを用いた動物実験で、高脂肪食投与・スクロース負荷群と高脂肪食投与群との比較、さらに、脂肪酸毒性に対するフルクトースの影響を明らかにする目的で、*in vitro* 実験で飽和脂肪酸・不飽和脂肪酸がフルクトース存在下で細胞にどのような影響があるかを検証した。その結果、動物実験では高脂肪食によるマウス脂肪肝は、スクロース添加によりNASHを誘発し、肝臓内のヘムオキシゲナーゼ1を増加、また、*in vitro* 実験による肝細胞に対するフルクトース添加は、本来肝細胞に保護的とされるオレイン酸負荷でもROS産生を介して肝細胞壊死を誘導することを立証した。今後の研究で非アポトーシス細胞死の機序とその制御法の解明は、NASHの新規治療法の開発に寄与することが期待できる。

本論文は、フルクトースの過剰摂取がROS産生を介して肝細胞に対する不飽和脂肪酸の細胞毒性を増強させることについての有益な知見を示した研究であり、学位に値する論文である。

試験・試問の結果の要旨

フルクトースの肝細胞障害機序とその制御法、脂肪毒性に関する知識、実験手法、データ解析とその手法について試問を行い、適切な解答を得た。学位に値する学識を有していると考えられる。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

参考論文

- 1) Unfavorable prognosis of patients with acute liver injury due to drug-induced liver injury and acute exacerbation of hepatitis B virus infection (柿坂啓介, 他8名と共著). *Hepatology Research*, 49巻, 11号(2019): Dec 27. doi: 10.1111/liv.14338.
- 2) ステロイドが著効した Cronkhite-Canada 症候群の1例 (米澤剛広, 他5名と共著). 八戸赤十字病院紀要, 13巻, 1号(2019): p5-12.