

論文内容の要旨

Excess fructose enhances oleic cytotoxicity via reactive oxygen species production and causes necroptosis in hepatocytes

(果糖の過剰摂取は活性酸素種産生を介してオレイン酸の細胞毒性を増強し、肝細胞にネクロプトーシスを誘発する)

(金沢条, 柿坂啓介, 鈴木悠地, 米澤剛広, 阿部弘昭, 王挺, 滝川康裕)

(The Journal of Nutritional Biochemistry 107 巻, 2022 年 9 月掲載)

I. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患(Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)のうち非アルコール性脂肪肝炎(Non-alcoholic steatohepatitis: NASH)は脂肪毒性による肝細胞死とそれに続いて惹起される炎症と線維化により肝硬変へ進展する。NASH 肝ではアポトーシスやフェロプトーシスなど様々な肝細胞死が生じていると報告されているが、いずれが最も NASH の病態に寄与しているかは未だ不明である。

一方、フルクトースの摂取量増加に伴う肥満人口の増加は社会問題となっている。フルクトースの摂取量増加は脂質合成、動脈硬化、インスリン抵抗性の悪化と直結するが、肝細胞における脂質とフルクトースの毒性は十分に解明されていない。本研究は、脂肪毒性におけるフルクトースの細胞障害機序解明とその病態における治療標的分子の同定を目的とした。

II. 研究対象ならび方法

1. in vitro 実験

HepG2(高分化型ヒト肝癌由来細胞株), マウスから単離した初代培養肝細胞を用いた。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(PA)及びオレイン酸(OA)を添加して、細胞増殖アッセイ, 細胞死アッセイ, 活性酸素種(Reactive oxygen species:ROS)の検出を行い、細胞死の様式をウェスタンブロッティング法(カスパーゼ 3, カスパーゼ 1, p-MLKL)で確認した。さらに ROS のスカベンジャーである N-acetylcysteine(NAC)を添加し、細胞死における ROS の影響を評価した。

2. in vivo 実験

4 週齢雄性 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(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・エオジン染色, マッソン・ゴールドナー染色, NAFLD

activity score (NAS) の測定

- 3) 免疫組織化学検査：ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1), phosphorylated-mixed lineage kinase domain-like (p-MLKL), 活性化カスパーゼ 1, TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL).
4) 肝組織遺伝子発現 (リアルタイム PCR)： α -smooth muscle actin (α SMA), コラーゲン III .
3. ヒト肝生検組織を用いた検討

岩手医科大学附属病院肝臓内科において肝生検を施行した NAFLD 患者検体 (NAFL; n=4, NASH; n=4) を用いて, HO-1 および p-MLKL の免疫組織化学染色を行った. 実験計画は岩手医科大学倫理委員会で承認された (許可番号 MH2020-171).

4. 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 vitro 実験

HepG2 細胞において, グルコース添加培養条件下では PA 負荷のみで強く細胞死が見られた. 一方, フルクトース添加培養条件下では, PA 負荷だけではなく OA 負荷でも細胞死が見られた. 蛍光染色では, PA を負荷した場合の細胞死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, OA 負荷による細胞死はネクロトーシスが主体であった. フルクトース添加培養条件下で観察された細胞死についてウエスタンブロット法で細胞内シグナル蛋白を評価したところ, 同処理群ではカスパーゼ 3 の活性化を認めず, カスパーゼ非依存性の細胞死であった. プログラムされた細胞死の一種であるネクロプトーシスの実行因子 MLKL のリン酸化が亢進しており, 細胞死アッセイでネクロトーシスと思われた細胞死はネクロプトーシスであることがわかった. また同処理群では, 細胞内 ROS が増加を示した. この ROS 増加は PA 添加では認めなかった. NAC を投与したところ, 同処理群で増強した ROS 産生が抑制された. マウス初代培養肝細胞においても HepG2 細胞と同様の実験結果が得られ, OA 負荷でカスパーゼ 1 の活性化も生じていた.

2. in vivo 実験

AST, ALT, TC は対照群よりも HFDS 群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が, 炎症細胞浸潤は HFDS でのみ観察された. NAS スコアは HFDS 群で有意に高値であった. 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 陽性細胞数, p-MLKL 陽性細胞数, 活性化カスパーゼ 1 陽性細胞数, TUNEL 陽性細胞数は対照群, HFD 群と比して HFDS 群で有意に増加していた.

3. ヒト肝生検組織を用いた検討

HO-1 陽性細胞数および p-MLKL 陽性細胞数は NAFL 群と比して NASH 群で有意に増加し, 両者間には正の相関が見られた.

IV. 結 語

フルクトースの過剰摂取は, ROS 産生増加を介して肝細胞にネクロプトーシスを誘導し, オレイン酸の脂肪毒性を増強していた. この毒性機序はヒト NASH 肝の病態の一部を形成していた.

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 齋野 朝幸(解剖学講座:細胞生物学分野)

副査 教授 前澤 千早(医歯薬総合研究所:腫瘍生物学研究部門)

副査 教授 古山 和道(生化学講座:分子医化学分野)

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) のうち非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、脂肪毒性による肝細胞死とそれに引き続いて惹起される炎症と線維化により肝硬変に進展する。NASH の病態の寄与にアポトーシスやフェロプトーシスなどが考えられるが、その詳細は不明である。また、フルクトースの摂取量増加が肥満に関連すると推測されるが、その摂取量の増加が肝細胞にどのような毒性を与えるかもわかっていない。本研究は、脂肪毒性におけるフルクトースの細胞障害機序の解明とその病態における治療標的分子の同定を目指したものである。

In vitro 実験において、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(OA)はグルコース存在下では細胞死が認められなかったが、フルクトース存在下で細胞死を認めた。この細胞死はネクローシス主体であると思われたが、各種アッセイによってネクロプトーシスである事が証明された。また、同時に細胞内の活性酸素種の増強も認められた。In vivo 実験では、肝酵素群はスクロース添加高脂肪食群(HFDS)で高値を認め、組織像でも HFDS 群のみ炎症性細胞浸潤を認めた。免疫組織化学でもヘムオキシゲナーゼ-1、および p-MLKL 陽性細胞数が有意に増加していた。この結果は、肝生検組織でも同様の傾向が認められ、NAFL 群と比較して NASH 群で有意に増加し、正の相関が認められた。

本論文は、フルクトースの過剰摂取が、肝細胞に活性酸素種の増加を介してネクロプトーシスを誘導し、不飽和脂肪酸の脂肪毒性を増強し、この毒性機序がNASH肝の病態の1つを形成している可能性を示した有益な研究と言える。今後の NASH における病態の解明、ならびにその治療の可能性も広がり、非常に興味深い。今後の発展性も期待できる。学位に値する研究である。

試験・試問の結果の要旨

本文の要旨についての質問に加え、細胞の各種アッセイ法、ウエスタンブロット法、肝臓の組織に関する諮問を行い、適切な回答を得た。学位に値する学識を有しているものと認める。また、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) Caspase-independent hepatocyte death: A result of the decrease of lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 in non-alcoholic steatohepatitis (柿坂啓介, 他 5 名と共著)
Journal of Gastroenterology and Hepatology, 34 巻, 7 号 (2019) : p1256-1262.
- 2) 輸入脚症候群に対して内視鏡的ステント留置術が有用であった 1 例 (金沢条, 他 5 名と共著)
八戸赤十字病院紀要, 15 巻, 1 号 (2018) : p5-10.