

非アルコール性脂肪性肝炎をわずか3日で発症するマウス作成に成功

飲酒が肝炎や肝硬変の原因となることはよく知られていますが、飲酒をしなくても、脂肪肝から肝臓の病気が進行することがあります。この状態は非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）と呼ばれ、自覚症状が無いにも関わらず肝硬変や肝癌の原因になります。日本ではおよそ300万人がNASHに罹患し、そのうち15万人が肝硬変や肝細胞癌を発症すると想定されます。

しかしながら、どのようにNASHが発症するのかは未だ分かっていません。そのため、動物モデルを利用し、偏った食生活や遺伝的背景などさまざまな要因を調べる研究が行われていますが、これまでのモデルの多くでは、NASHの発症を誘導するために一か月～一年という長期間が必要であるため、発症メカニズムを詳細に調べるのが困難でした。

本研究グループは、先天的にメラニン色素が欠乏したアルビノ化を引き起こすチロシナーゼ遺伝子に着目し、この遺伝子に変異を持つアルビノマウスに高コレステロール食を与えると、わずか三日間で肝臓における脂質の蓄積、肝細胞の肥大、炎症細胞の浸潤、線維化等が起こり、ヒトのNASH病態がよく再現できることを発見しました。このマウスは、世界で最も短期間でNASHを発症するマウスモデルとして、NASH発症の遺伝的メカニズムの解明、新規の治療法の開発に活用されると期待されます。また今後、チロシナーゼ遺伝子とNASH発症の関連を調べることで、民族間でNASHの発症率が異なる原因などを説明できる可能性があります。

研究代表者

筑波大学医学医療系

濱田 理人 助教

研究の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、アルコール依存症や他の肝疾患を伴わずに肝細胞に脂質が蓄積されることを特徴とする病態です。NAFLD が進行すると、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) と呼ばれる炎症状態になり、肝細胞の損傷、線維化^{注1)} など、より深刻な症状を引き起こします。

NASH は肝硬変や肝細胞がんなど重篤な疾患の発症リスクを大きく高めるため、世界的な問題となっています。全世界の NAFLD の推定有病率は約 25% で、そのうち 10~30% が NASH に進行し、さらにその 5% が肝がんを発症すると言われていています。日本でも NAFLD の患者は全国で 1000 万人以上いるとされ、そのうち 300 万人が NASH に進行し、15 万人が肝硬変や肝細胞癌を発症すると想定されます。

NAFLD はメタボリックシンドローム^{注2)}、遺伝的要因、酸化ストレスなどが関与する多因子性の病態生理であると考えられています。しかし、研究のための適切な動物モデルがないこともあり、NAFLD から NASH への疾患進行に関わる詳細なメカニズムは未だ不明です。さらに、NAFLD、NASH の有病率と重症度には人種的・民族的な差異があることが広く知られています。この民族的な違いの原因が明らかになれば、NASH の発症に対する理解を深めることができます。

本研究では、毛や肌の色を生み出す遺伝子であるチロシナーゼ遺伝子 (TYR 遺伝子)^{注3)} の活性に着目し、TYR 遺伝子の変異が NAFLD/NASH の感受性と重症度を高めるかどうかを調べました。具体的には、標準的な C57BL/6 (B6) マウス (野生型マウス) と、メラニン合成の欠損と白い毛色をもたらす変異を TYR 遺伝子上に持つ B6(Cg)-*Tyr*^{c-2j}/J マウス (アルビノマウス) を用いて、高コレステロール食 (High cholesterol diet: HCD)^{注4)} が肝臓に与える影響を評価しました。

研究内容と成果

脂肪肝や動脈硬化等の疾患モデル研究で使用されている HCD を、野生型マウスとアルビノマウスに与え、NASH に特徴的な病態である脂肪肝と線維化の状態を比較しました。これにより、アルビノマウスにおける NASH 発症の特徴や時期を評価するとともに、肝臓の炎症や脂質の蓄積の様子を経時的に観察しました。その結果、アルビノマウスは高コレステロール食負荷後三日程度で、急速に肝臓での線維化を生じ、NASH 病態を示すことが分かりました (図 1)。一方、野生型は線維化しませんでした。

また、HCD を与えて 2 週間後のアルビノマウスの肝臓は大きく、白くなっていました。また、アルビノマウスは肝炎の指標である血清 ALT 値および AST 値が、野生型マウスに比べ 20 倍も高くなることが分かりました。組織学的解析^{注5)} により、アルビノマウスの肝臓では、野生型マウスと比較して多くの脂肪滴の蓄積、広範囲の線維化、多くの免疫細胞の浸潤、コレステロール結晶の蓄積が観察できました (図 2)。このような組織学的特徴は、ヒトの NASH 病態で観察されるものとよく似ており、アルビノマウスへの HCD 負荷は NASH モデルとして利用できると考えられます。

アルビノマウスが示す NASH 病態の原因として、食事からのコレステロール吸収が異常に高くなっていることが考えられます。これを確認するべく、血清中のリポタンパク質^{注6)} の組成を調べました。すると、HCD 負荷後のアルビノマウスは、野生型マウスよりも、総コレステロール、カイロミクロン、VLDL、LDL が高く、逆に HDL は低くなっていました (図 3)。また、腸組織に含まれるコレステロールについては、アルビノマウスでは腸からのコレステロール吸収量が大きくなっており、腸でのコレステロール吸収を担う主要な輸送タンパク質である NPC1L1 の発現量も大きくなっていました (図 4)。

これらにより、TYR 遺伝子の変異によりコレステロール代謝に異常が起こること (図 5)、アルビノマウスは極めて短期間で NASH 病態が誘導できる有用な動物モデルになりうるということが分かりました。さらに、TYR 遺伝子が、これまで知られていなかった NASH 発症の遺伝的要因の一つである可能性が示唆されました。

今後の展開

本研究成果により、TYR 遺伝子の変異が NASH 発症に関連することが明らかになりました。TYR 遺伝子の変異は NASH 有病率が高い民族で高頻度に存在していることから、TYR 遺伝子変異ウスを解析することで、ヒトの NASH 発症率が民族間で異なっている原因が明らかになる可能性があります。また、これまで知られていなかった TYR 遺伝子の機能とコレステロール代謝との関係性の解明にもつながります。

今回提案した NASH モデルは、すでに広く利用されているアルビノマウスに HCD を与えるという極めてシンプルな手法で樹立できるため、NASH モデル研究のハードルを大きく下げ、NASH の病態および治療の研究に広く貢献するものと期待されます。

参考図

従来モデル

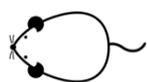


負荷前

.....

一か月以上

【本研究】



アルビノマウス
+
高コレステロール食

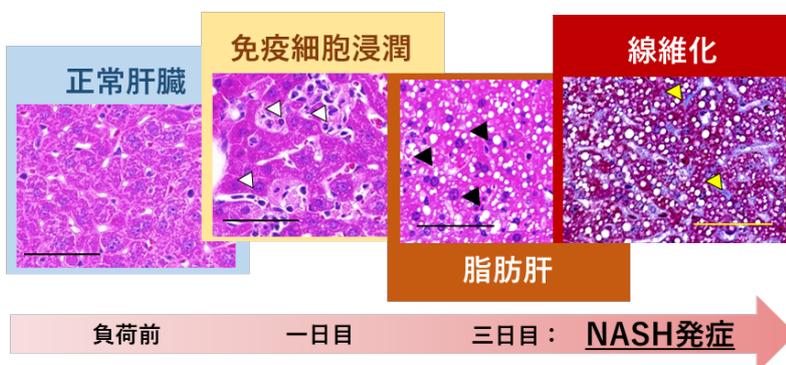


図 1. 本研究の概要

アルビノマウスに高コレステロール食負荷を行うと、わずか三日間で NASH 病態が観察できることを発見した。

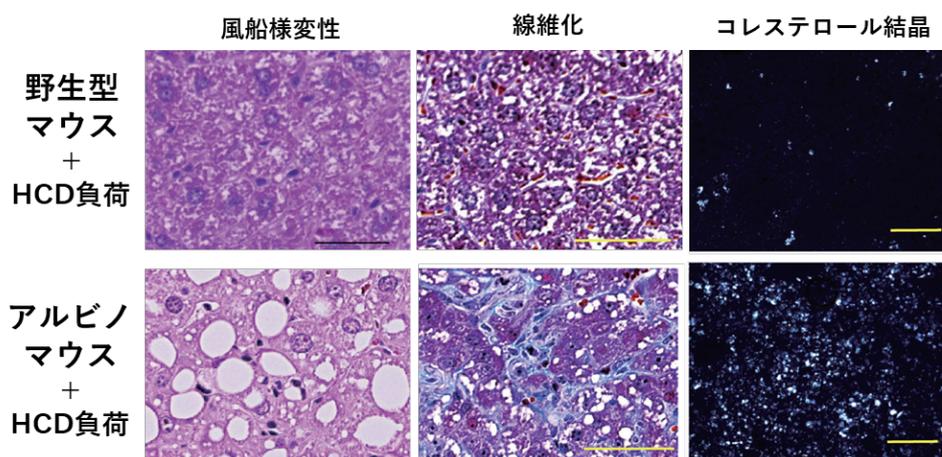


図 2. 高コレステロール食負荷後の肝臓の組織学的解析

高コレステロール食負荷後のアルビノマウスは、野生型にはない大きな脂肪滴（左、白い部分）と広範囲の線維化（中央、青い部分）の NASH の所見がある。さらに、アルビノマウスの肝臓には結晶化したコレステロール（右、白い部分）が多数存在していた。

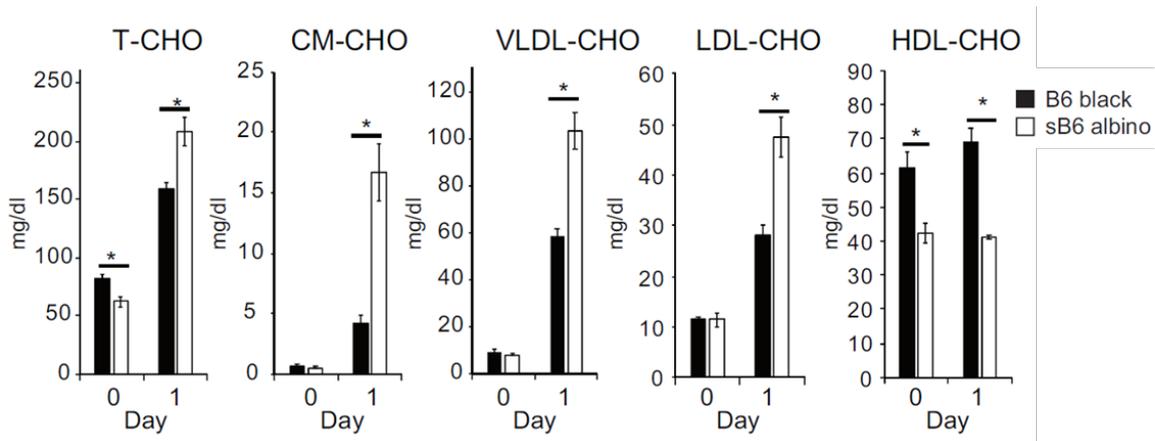


図 3. 高コレステロール食負荷後のリポタンパク質解析

アルビノマウスでは、野生型マウスとはリポタンパク質の組成が大きく異なっていた。(T-CHO：総コレステロール、CM-CHO：カイロミクロン、VLDL-CHO：超低密度リポタンパク質、LDL-CHO：低密度リポタンパク質、HDL-CHO：高密度リポタンパク質)

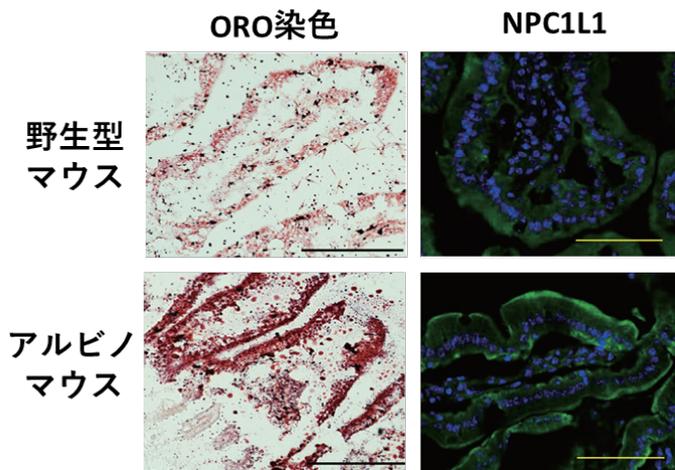


図 4. コレステロールを経口投与した後の小腸のコレステロール吸収

アルビノマウスは、野生型に比べて多くのコレステロールが小腸の絨毛に取り込まれていることが確認された(左、赤い部分)。また、コレステロール輸送を行うタンパク質 NPC1L1 の発現量が多かった(右、緑の部分)。

線維化組織を青く染色するマッソントリクローム染色 (MT 染色)、脂質を染色するオイルレッドオー染色 (ORO 染色) 等を用いた。

注 6) リポタンパク質

単体では血液 (水) に溶けないコレステロールが全身に運搬される際に、コレステロールを包み込んで血液に溶けるようにするカプセル状の物質。大きさによって、何種類かに分けられ、それぞれ異なる機能を持つ。

研究資金

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費助成事業 (26221004、25860205、23118504、16K18398、19K07499、19H00966)、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団、高松宮妃癌研究基金 (15-24724; M. Hamada)、世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) 研究プロジェクトの一環として実施されました。

掲載論文

【題 名】 Albino mice with the point mutation at the tyrosinase locus show high cholesterol diet-induced NASH susceptibility.

(チロシナーゼ遺伝子座に点変異を持つアルビノマウスは高コレステロール食誘導性 NASH の感受性が高い)

【著者名】 Kaushalya Kulathunga, 脇本新, 平石祐紀子, Manoj Kumar Yadav, Kyle Gentleman, 蕨栄治, 逆井智樹, 三輪佳宏, 水野聖哉, 高橋智, 濱田理人

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2021 年 11 月 8 日

【DOI】 10.1038/s41598-021-00501-5

問合わせ先

【研究に関すること】

濱田 理人 (はまだ みちと)

筑波大学医学医療系 / トランスポーター医学研究センター 助教

URL: <http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp