HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	非アルコール性脂肪性肝疾患から早期非アルコール性脂肪性肝炎を判別する血清sCD14の有用性の検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	中村，晃久
Description	配架番号：2550
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14082号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78033
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akihisa_Nakamura_abstract.pdf，論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

（様式９）

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　中村　晃久

学 位 論 文 題 名

非アルコール性脂肪性肝疾患から早期非アルコール性脂肪性肝炎を判別する血清 sCD14 の有用性の検討
(Assessment of the utility of soluble CD14 in discriminating nonalcoholic steatohepatitis in the early stage of fibrosis from nonalcoholic fatty liver disease)

【背景と目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)から、非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFL)と非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)を判別するためには、肝生検がゴールドスタンダードである。近年非侵襲的な線維化マーカーや予測式が様々報告されているが、既存の線維化診断法は、線維化進展 NASH 患者の判別には有用であるが、非線維化・早期線維化 NASH 患者の判別には有用でないことが明らかとなっている。現在 NASH 発症の機序の一因として、腸内環境の乱れから、腸管透過性が亢進し、エンドトキシンである Lipopolysaccharide (LPS) が、Toll 様受容体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)を介して肝の炎症や線維化が悪化するとされている。我々は、LPS と結合し TLR4 シグナルに関与している可溶性 CD14(solubleCD14, sCD14)に着目した。血清 sCD14 値は、既報において NASH 患者において肝の炎症と相関があると報告されているが、我々は NAFLD 患者から NASH 患者を拾い上げる判別マーカーになり得るか、血清 sCD14 値と NASH 線維化進展との関連を、臨床検体と動物モデルを用いて検討した。

【対象と方法】

北海道大学病院にて 2004 年から 2018 年に肝生検で NAFLD と診断した 111 名の患者を対象とし、FLIP アルゴリズムを用いて NAFL 群(n=36)、NASH 群(n=75)に選別した。さらに NASH 群を Brunt 分類により fibrosis stage 0-2 の mild NASH(n=46)群、fibrosis stage 3-4 の advanced NASH(n=29)群に分け、血清 sCD14 を ELISA 法にて測定し比較検討した。また C56BL/6J マウスに通常食(standard diet：SD)、もしくはコリン欠乏・メチオニン減量高脂肪食(choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet：CDAHFD)を投与し NASH マウスモデルを作成し 3,6,9,12 週でのマウス血清 sCD14 値、ALT 値を測定した。同時に腸内細菌叢の変化、腸管上皮の評価、肝の遺伝子群の変化、病理学的検討などを行った。

【結果】

ヒト検体で血清 sCD14 値は、NAFL 患者に対し NASH 患者で上昇しており、NAFL vs 全 NASH($p = 0.008$)、NAFL vs mNASH($p = 0.013$)、NAFL vs aNASH($p = 0.044$)とそれぞれ有意差を認めた。さらに、NAFL と NASH でも線維化を有さない Fibrosis 0 (F0)症例との比較行ったところ、NAFL との間で有意差を認めた ($p = 0.012$)。NAFL と F0－NASH 症例を予測・判別するための s CD14 のカットオフ値は、1262 ng/dL で、AUC は 0.73 であった。

次に CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスモデルを用いた検討を行った。病理組織所見では H&E 染色で 3 週時

点から肝の脂肪化を認め、Masson’s Trichrome 染色で 6 週から軽度の線維化が観察され、9 週、12 週と線維化の進行を認めた。また 12 週時点で血清 ALT 値も CDAHFD 群で上昇傾向を示し、肝腫大も統計学的に有意差を認めた。糞便のメタゲノム解析では、ヒトの NASH 患者における腸内細菌叢の変化と同様に CDAHFD 群で Firmicutes 門が増加し、Bacteroidestes 門が減少している傾向があることが確認された。また、CDAHFD 群ではバクテリアルトランスロケーションを促進する方向に働く Proteobacteria 門や、ムチン層を減少させることが知られている Verrucomicrobia 門などのグラム陰性菌が多くを占めることが観察された。次に糞便中の含有ムチン量を検討したところ、CDAHFD 群で有意に減少していた。また、回腸上皮を病理学的に評価するため上皮の空砲化、消失、絨毛の破壊をスコア化、絨毛長、絨毛間距離を測定したところ、いずれにおいても CDAHFD 群で回腸上皮の損傷を確認した。回腸の電子顕微鏡観察では、CDAHFD 群のみに細胞間隙の開大した所見を認め、タイトジャンクションの接着分子で代表的な mRNA の発現量を調べたところ、occludin の発現量が CDAHFD 群で減少していることが確認された。マウス血清 sCD14 値は 3 週時点で、SD 群に比べ CDAHFD 群で有意に上昇していた。その後も経時的に血清 sCD14 値は、SD 群に比べ CDAHFD 群で有意な上昇が観察された。また、肝内の mRNA の発現量の検討で、sCD14 の共受容体である TLR4、炎症や線維化を表す TNFα、collagen1A1 の上昇、肝星細胞の活性化を表すαSMA の mRNA 発現の亢進を CDAHFD 群で確認された。

【考察】

今回のヒト検体での検討では、NAFL と F0－NASH 症例の予測・判別のための s CD14 のカットオフ値は 4 型コラーゲン 7S と同程度であり中等度の予測・判別能を有しているとの結果であったが、s CD14 は感度および陰性的中率が 100％といずれも 4 型コラーゲン 7S の感度 89％、陰性的中率 88％を上回る結果であった。つまり、このカットオフ値を用いる事で、NAFL 患者と NASH(F0)患者を区別でき、診断のための行われる肝生検が不要になる NAFL 患者を判別できる可能性が考えられた。CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスの血清 sCD14 値は 3 週時点で、SD 群に比べ CDAHFD 群で有意に上昇しており、その後も経時的に血清 sCD14 値は SD 群に比べ CDAHFD 群で有意な上昇を認めたが、上昇は一定量で右肩上がりとはならないことが判明した。この所見は、NASH 患者に敗血症患者が多くないという所見と矛盾せず、肝内 TLR4、TNFα、collagen1A1、αSMA などの mRNA 発現量から一定量の恒常的な菌体成分の刺激が起きていたと考えられる。今回の検討で、CDAHFD 摂取によって腸内細菌叢に変化が生じ、腸内環境の変化が、ムチン層の減少や絨毛構造の破壊と、腸管内バリア機構の破綻を誘発し、腸の透過性を亢進させた。そして、バクテリアルトランスロケーションが引き起こされ、LPS などの細菌菌体成分がマウス肝臓に多く取り込まれることで TLR4 シグナルを介した炎症反応を引き起こし、肝星細胞の活性化により肝線維化が悪化したと考えられた。このように、NAFLD における腸内細菌叢変化と腸管損傷亢進、それに伴う LPS などの腸管から門脈血中への流出は、肝臓自然免疫機構活性化を介して NAFLD 病態を修飾することが考えられた。マウスモデルにおいても、血清の sCD14 値は、肝に線維化が認められる以前の段階から上昇が認められ、ヒト検体での非線維化・線維化早期の NASH での所見と矛盾しない結果であった。

【結論】

本研究では、NASH マウスモデルとヒト血清 sCD14 値は、いずれも線維化が軽度な早期 NASH の段階から血清 sCD14 値が上昇することが確認された。また、血清 sCD14 値は NAFL 患者と NASH(F0)患者を区別する早期 NASH 判別マーカーになり得る可能性が示唆された。