



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 [全文の要約]
Author(s)	中村, 晃久
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2550 他
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/2115/78034
Type	doctoral thesis
File Information	Akihisa_Nakamura_summary.pdf



学位論文(要約)

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)

2020 年 3 月

北海道大学

中村 晃久

学位論文(要約)

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)

2020 年 3 月

北海道大学

中村 晃久

学位論文(要約)

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。近年 NASH の発症機序として、遺伝的素因、脂質代謝、酸化ストレス、小胞体ストレス、腸内環境といった多数の要因が同時複合的に関与するという multiple parallel hits hypothesis が提唱されている。なかでも近年の腸内細菌叢のメタゲノム解析の急速な進歩により、腸内細菌叢と NAFLD との関係が明らかになりつつある。腸内細菌叢と 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。CD14 は TLR4 の共受容体として知られており、膜型 CD14 (mCD14) と可溶型 CD14 (sCD14) の 2 つの形態をとる。血清 sCD14 値は血清 LPS 値と相関することが報告されており、NAFLD 患者における検討では血清 sCD14 は健常者に比べ NASH 患者で優位に上昇傾向を示し、さらに肝の炎症と相関があること報告されている。我々はこの血清 sCD14 値が 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) 症例との比較を行ったところ、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 sCD14 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、Bacteroidetes 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 $\text{TNF } \alpha$ 、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】

脂肪肝炎から肝硬変へと進展する NASH は早期の段階で診断することで、不要な肝生検や検査を減らすこと、線維化進展予備軍の囲い込みや早期治療介入が可能となると考えられる。しかし、既存の血清マーカーや画像モダリティ、判別式では、NAFL と線維化早期の NASH 症例を区別することは困難である。肝生検が NAFL と NASH の鑑別を判断することが出来る唯一の検査方法であるが、合併症、サンプリングエラー、病理医間での診断不一致などの問題点がある。したがって、早期 NASH 症例を判別するには、非侵襲的で繰り返し試行可能で、信頼性の高い診断方法が切望されている。今回のヒト検体での血清 sCD14 の検討では、NAFL

と F0-NASH 症例の予測・判別のための sCD14 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、sCD14 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、TNF α 、collagen1A1、 α SMA 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。12 週摂餌後マウスでの SD 群、CDAHFD 群の糞便中の腸内細菌叢メタゲノム解析を行ったところ、CDAHFD 群で Firmicutes 門が増加し、Bacteroidetes 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 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。また、回腸上皮を病理学的に評価する目的で上皮の空砲化、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を示唆する所見を認め、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。これらの所見から、CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスでは、小腸の透過性が亢進していることが考えられた。以上の検討から、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。