



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14082
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94613
Type	doctoral thesis
File Information	Akihisa_Nakamura.pdf



学位論文

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

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

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
研究方法	10 頁
研究結果	20 頁
考察	34 頁
結論	37 頁
謝辞	38 頁
利益相反	39 頁
引用文献	40 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Akihisa Nakamura, Rei Takeda, Kenichi Morikawa, Sayaka Ando, Takashi Kitagataya, Ren Yamada, Taku Shigesawa, Kazuharu Suzuki, Tomoe Shimazaki, Megumi Kimura, Koji Yamamoto, Takaaki Izumi, Machiko Umemura, Masato Nakai, Takuya Sho, Goki Suda, Mitsuteru Natsuizaka, Koji Ogawa, Hiroshi Takeda, and Naoya Sakamoto.

Assessment of the utility of soluble CD14 in discriminating nonalcoholic steatohepatitis in the early stage of fibrosis from nonalcoholic fatty liver disease

Journal of Gastroenterology (投稿中)

本研究の一部は以下の学会にて発表した。

1. 中村晃久、森川賢一、坂本直哉.

腸肝相関に着目した新規 NASH 判別マーカーの探索

第 22 回日本肝臓学会大会、2018 年 11 月 1 日～11 月 4 日、神戸

2. Akihisa Nakamura, Kenichi Morikawa, Naoya Sakamoto.

Assessing the usability of soluble CD14 to discriminate early nonalcoholic steatohepatitis from nonalcoholic fatty liver disease

JSH International Liver Conference 2019、2019 年 10 月 1 日～10 月 2 日、大阪

要 旨

【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 (soluble CD14, 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) 症例との比較を行ったところ、NAFL との間で有意差を認めた ($p = 0.012$)。NAFL と NASH (F0) 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胞化、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 TNF α 、collagen1A1 の上昇、肝星細胞の活性化を表す α SMA 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 NASH(F0)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。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。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである

ALT, alanine aminotransferase

Alb, albumin

α SMA, α smooth muscle actin

AST, aspartate aminotransferase

AUC, area under the curve

BMI, body mass index

CDAHFD, choline-deficient, L-amino acid-defined, high fat diet

Coll1A1, collagen 1A1

DM, diabetes mellitus

HBP, high blood pressure

HOMA-IR, homeostasis model assessment as an index of insulin resistance

M2BPGi, Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein glycan isomer

NAFL, nonalcoholic fatty liver

NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease

NASH, nonalcoholic steatohepatitis

NPV, negative predictive value

n.s, not significant

Plt, platelet count

PPV, positive predictive value

sCD14, soluble CD14

SD, standard diet

TLR4, toll-like receptor 4

TGF β , transforming growth factor β

TG, triglyceride

TNF α , tumor necrosis factor α

VLDL, very low density lipoproteins

緒 言

慢性肝障害の原因には、B 型や C 型などのウイルス性肝炎やアルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)、自己免疫性肝疾患などがある。近年食生活の変化などから NAFLD が、世界的に増加傾向にある。NAFLD は、他の肝疾患が除外でき、肝障害を起こすほどの飲酒習慣がないにも関わらず、肝組織所見で脂肪沈着を認める病態である。NAFLD は脂肪沈着のみを認める非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFL) と、脂肪沈着に加えて炎症細胞浸潤や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) に分類される。全世界での NAFLD の有病率は 25%程度と報告されており (Torres et al., 2012)、そのうち 80%以上は NAFL、残りの 20%程度が NASH とされる。NASH 患者は時間経過と共に肝硬変へと進展し、7%弱に肝細胞癌が発症すると報告されている (Wong et al., 2018; Younossi et al., 2016)。そのため NAFLD から線維化進展前の早期 NASH 症例の選別法や診断法の開発が、進展予防のために急務とされている。

NAFLD 診断は日本肝臓学会による NASH・NAFLD の診療ガイド 2015 では、肝生検にて病理学的に確定診断するのがゴールドスタンダードとなっている。NASH の病理所見は、大滴性脂肪変性、炎症細胞浸潤、肝細胞の風船様変性、Mallory-Denk 体などがある。1999 年に Matteoni らは予後に重点を置いて、病理所見における肝細胞の風船様変性が NASH 診断のキーポイントとした Matteoni 分類 (Matteoni et al., 1999) を、Brunt らは Staging (線維化の重症度) と Grading (壊死・炎症性変化の重症度) に分類する Brunt 分類 (Brunt et al., 1999) を発表した。その後、Matteoni 分類は NASH の重症度を反映しない事、Brunt 分類は NASH のみの分類であることなどの問題点から、2005 年に NAFLD Activity Score (NAS) が発表された (Kleiner et al., 2005)。NAS には診断基準に曖昧な点など問題点があるとされ、2012 年に the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm (Bedossa et al., 2012) が発表された。この分類は脂肪変性に始まり肝細胞の風船様変性と炎症性細胞浸潤両者を認めるものを NASH、それ以外を NAFL とする。この FLIP アルゴリズムは上記の 3 つの病理所見から NASH と診断するものであり、複数の病理医間での総合判断とほぼ同率の診断能を示すことから現在 NAFLD 肝病理組織診断のスタンダードとして広くされている。

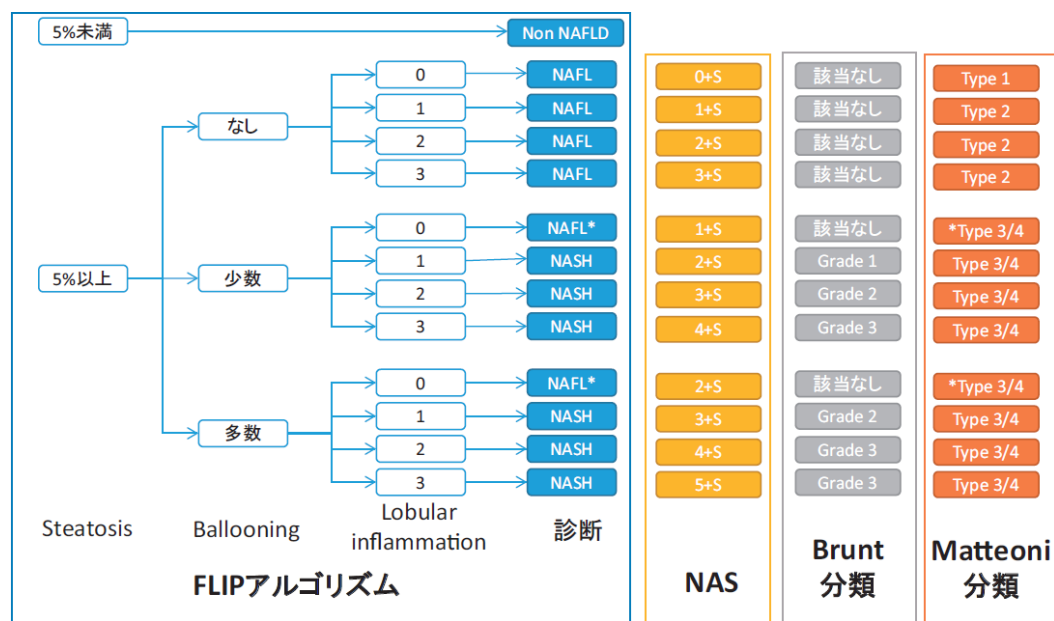


図 1. NAFLD 診断に用いられる各分類の相互関連、文献(肝臓学会編 NASH・NAFLD の診療ガイド 2015)より引用

肝生検所見と予後の検討から、NAFLD の予後規定病理学的所見は、線維化進展であることが報告されており (Angulo et al., 2015; Dulai et al., 2017; Ekstedt et al., 2015)、線維化診断がより重要性を増している。現在、多くの線維化マーカーやスコアリングシステム、画像診断装置を用いた肝弾性度測定法が開発され、線維化進展度は評価可能となってきた。血液学的検査では、4 型コラーゲン 7S、Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein glycan isomer (M2BPGi)、ヒアルロン酸などが、肝線維化と相関するマーカーとして保険収載されている。画像診断装置として超音波エラストグラフィを用いた肝弾性度診断が安価で有用であるが、MRI を用いた MR エラストグラフィも高い診断能を有する (Hannah and Harrison, 2016)。スコアリングシステムとして NAFLD fibrosis score、FIB-4 index などが、用いられている。しかし、これら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 (Tilg and Moschen, 2010) 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。NASH 患者において有意に

Bacteroidetes門の細菌の割合が減少したとの報告や(Mouzaki et al., 2013)、肥満成人NAFLD患者と健常コントロール患者との比較で、Firmicutes門の腸内細菌群が、NAFLD患者で増加しているという結果も示された(Raman et al., 2013)。無菌マウスに高脂肪食を投与しても腸管炎症は惹起されないのに対して、通常マウスでは高脂肪食により腸管炎症が惹起され (Ding et al., 2010)、腸内細菌叢の影響を受けて腸炎がおこり、腸管透過性亢進を引き起こす事がわかっている。実際にNAFLD患者では血中エンドトキシン濃度が有意に上昇すること (Harte et al., 2010)、腸管透過性が有意に亢進していること (Miele et al., 2009)が明らかとなっている。マウスモデルを用いた検討でも、細菌由来のリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) が門脈経路で肝臓へ到達し、Toll like receptor 4 (TLR4) シグナル増強を介してKupffer細胞のtumor necrosis factor α (TNF α)産生を増加させ (Rivera et al., 2007; Tomita et al., 2006)、その結果、肝星細胞が活性化し線維化が進展することが示された (Seki et al., 2007)。

CD14 は TLR4 の共受容体として知られており、膜型 (membrane) CD14 (mCD14) と可溶型 (soluble) CD14 (sCD14) の 2 つの形態をとる (Wright et al., 1990)。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、血清 sCD14 と肝内炎症とが相関関係があることが示された (Ogawa et al., 2013)。

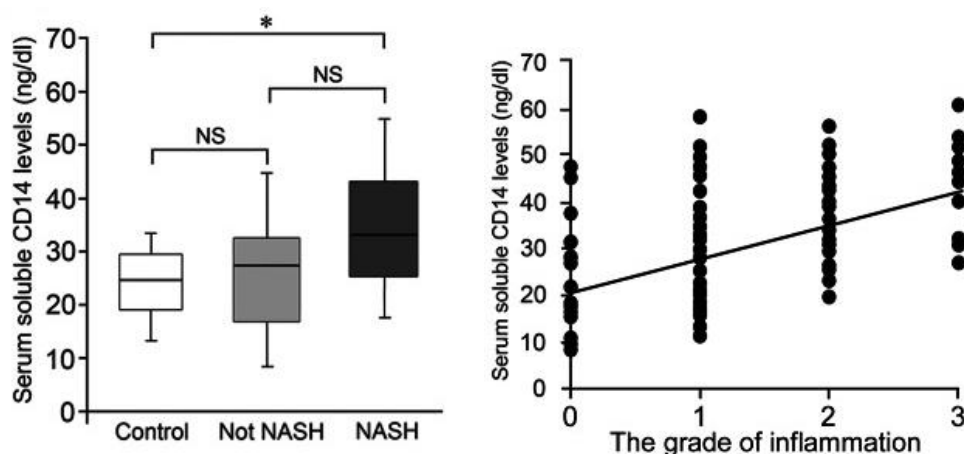


図 2. 血清 sCD14 値と NASH との関連 ((Ogawa et al., 2013) より引用)

左側: コントロール群、非 NASH 群 (NAFL)、NASH 群での血清 sCD14 値 (*; $P < 0.05$)

右側: NASH 患者における血清 sCD14 値と肝内炎症グレードとの関係

(Spearman's $r = 0.354$, $P = 0.004$)

しかし、NASH 患者での血清 sCD14 と線維化との関連や、NAFLD 患者からの血清 sCD14 を用いた NASH 患者の拾い上げの検討は、これまで行われていない。

NASH 動物モデルにおける食餌モデルの 1 つとしてコリン・メチオニン欠乏飼料モデルがある。このモデルは脂質代謝におけるリポトロプの役割に着目しているが、リポトロプにはコリン、メチオニン、イノシトール、ビタミン B12 などが含まれ、単に栄養素としても役割だけでなく、肝臓から脂肪を血液循環に放出する上で重要な役割を担っている。コリンやメチオニンは、疎水性の中性脂肪 (triglyceride, TG) を豊富に含む very low density lipoproteins (VLDL) の肝臓からの分泌に必須のホスファチジルコリンの供給源であり (Noga and Vance, 2003)、これらが欠乏すると TG の肝臓からの排泄が抑制され肝臓内の脂肪が増えるというモデルである。しかし、メチオニンとコリンを完全に欠乏させると、肝臓の脂質代謝に留まらず、筋肉量の減少を招き継続的な線維化過程の観察や薬効評価系としては使い難いため、コリン欠乏・メチオニン減量高脂肪食 (a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet: CDAHFD) を使用した NASH マウスモデルが報告されている (Matsumoto et al., 2013)。コリン欠乏、0.1%メチオニンを添加した高脂肪食 (High-fat diet) 投与にて、高レベルの肝障害と、肝の脂肪化を認め、6 週間給餌で線維化の進展がマッソントリクローム染色で確認された。

本研究では、LPS と結合し TLR4 シグナルに関与している血清 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 CDAHFD 摂餌 NASH マウスモデルを用いて検討した。

研 究 方 法

1. 患者

北海道大学病院において、2004 年から 2018 年までに NAFLD 患者に対して肝生検を施行し、かつ血清が保存されていた 111 名を研究対象とした。

(1) 対象患者

北海道大学病院に通院または入院中の NAFLD(但し、代償性肝硬変患者を含む)患者

(2) 選択基準

- ① 同意取得時において年齢が20歳以上の患者
- ② 本試験参加について、試験参加前に本人に十分な説明を行い、本人による同意文書が得られた患者

(3) 除外基準

- ① コントロールの困難な心疾患（心筋梗塞、心不全、不整脈等）のある患者
- ② その他、主治医が本検討に際し、参加が不適當であると判断した患者
- ③ その他、研究責任者が被験者として不適當と判断した患者
 - ・非代償性肝硬変症例
 - ・腹水、静脈瘤破裂、特発性細菌性腹膜炎、肝細胞癌などの肝硬変に伴う合併症を有する患者
 - ・自己免疫性肝疾患、アルコール性肝障害(男性210g/週以上、女性140g/週以上)、B型およびC 型肝炎ウイルス、HIV合併例
 - ・肝移植既往
 - ・免疫抑制療法併用
 - ・炎症性腸疾患、その他の慢性炎症を合併している患者

本研究は、北海道大学病院倫理委員会の承認を得て行われ（IRB-015-0004 および IRB-016-0471）。全ての対象患者に 1964 年ヘルシンキ宣言に拠るヒトを対象とする医学研究の倫理原則に基づきインフォームドコンセントを行い、書面での同意を得た。この研究は UMIN 臨床試験に登録している（UMIN000019043 および UMIN000029607）。

2. 研究の方法

(1) 研究の種類・デザイン

レトロスペクティブ観察研究

(2) 観察および検査項目とその実施方法

以下の項目について、観察および検査を実施し、そのデータを本研究に利

用する。8), 10)は本研究のために実施するものであり、測定のため採血量が7 ml 増加する。1)~7), 9) はすべて日常診療で実施される項目である(表1)。

【診療情報】 性別、年齢、家族歴、身長、肝組織診断、治療歴、アレルギーの有無、既往歴、合併症の有無

【血液等検査項目】

- 1) 細菌側検査：プロカルシトニン、エンドトキシン
- 2) 末梢血液検査：WBC、WBC 分画、Hb、Plt
- 3) 肝機能検査：AST、ALT、 γ -GT、ALP
- 4) 生化学検査：LDH、BUN、総ビリルビン、直接ビリルビン、ALP、 γ -GT、総タンパク、アルブミン、クレアチニン、Na、K、Cl、アミラーゼ、リパーゼ、アンモニア
- 5) 肝線維化・腫瘍マーカー：P-III-P、ヒアルロン酸、IV 型コラーゲン 7S、M2BPGi、AFP
- 6) 耐糖能関連検査：空腹時血糖、インスリン、HbA1c、
- 7) 脂質代謝検査：TC、LDL-C、HDL-C、TG
- 8) Soluble CD14
- 9) (任意) フィブロスキャンによる肝硬度測定
- 10) 保存血清 7 ml

表1. 検査測定場所および観察期間

●：保存血清（血清sCD14） ○：院内測定 △：可能な限り実施する

項目	観察時
血液一般検査	○
肝機能検査	○
生化学検査	○
肝線維化・腫瘍マーカー	○
脂質代謝検査	○
耐糖能関連検査	○
細菌側因子	○
血清 s CD14	●
血清保存（7mL）	●
フィブロスキャン測定	△

(4) 被験者の研究参加予定期間

各被験者は同意後、外来受診時、または入院時参加する。

(5) 研究終了後の対応

本研究終了後は、この研究で得られた成果も含めて、研究責任者は被験者に対し最も適切と考える医療を提供する。

3. ヒト血清 sCD14 値測定

血清 s CD 値は、Human CD14 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Abingdon, UK.) (検出域 250-16000 pg/mL) を用いて測定した。

実験プロトコール

- ① 血清 10 μ l を RD5P 試薬で 400 倍に希釈
- ② 各プレートに assay Diluent (RD5W) を 100 μ l 添加後、standard、各 sample を 100 μ l 添加し 3 時間静置
- ③ Wash Buffer で 5 回 washing
- ④ Human CD14 Conjugate を各 200 μ l 添加し 1 時間静置
- ⑤ ③を再度行う
- ⑥ Substrate solution を 200 μ l 添加し暗所で 30 分静置
- ⑦ Stop solution を各 50 μ l 添加
- ⑧ Microplate reader で 450nm、540-570nm の波長を測定

3. 病理学的検討方法

肝生検は 16G もしくは 18G の生検針を用いて行い、生検サンプルはホルマリン液に保存、その後パラフィンに包埋を行った。NAFLD から NAFL と NASH を診断する方法としては FLIP アルゴリズムを用い、5%以上の脂肪変性 (steatosis) を認め、風船様変性 (ballooning) と炎症性細胞浸潤 (lobular inflammation) をいずれも認めた症例を NASH と診断した。線維化の進行度は Brunt 分類の Staging を用いた。Stage 1 (F1) は中心静脈周囲の特徴的な pericellular fibrosis や perisinusoidal fibrosis で、stage 2 (F2) では、加えて門脈域にも線維化を認め、stage 3 (F3) は bridging fibrosis を認めること、stage 4 (F4) は肝硬変となる。これらを線維化が軽度な F0-F2 を mild NASH (mNASH)、線維化が高度な F3-4 を advanced NASH (aNASH) と定義し分類した。

4. 検討方法

NAFL、mNASH、aNASH の各群において、患者背景、血液学的データ、線維化マーカー、血清 sCD14 値を比較検討した。次に NAFL 群に対し NASH 群で有意差を認めた各マーカーのカットオフ値を receiver-operator characteristics (ROC) curve 分析を用いて算出し、sCD14 値の有用性を検討した。

5. NASH マウスモデルの作製

動物実験プロトコルは「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定」に則り、北海道大学動物実験委員会の承認（承認番号 18-0073）を得た。C57BL/6J マウスを室温 23℃に維持された、12 時間明期－12 時間暗期の明暗サイクルの飼育環境の下で、1 ケージあたり 3-5 匹のマウスを飼育した。

実験動物

5 週齢雄 Specific pathogen-free C57BL/6J マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) を搬入した。1 週間馴化させた後、6 週齢より、各飼料摂取開始し実験をおこなった。

試料

Standard Diet (SD; Oriental Yeast CO., LTD. Chiba, Japan)

A choline-deficient, L-amino acid-defined, high fat diet (CDAHFD; #A06071302, RESEARCH DIETS, New Brunswick, NJ, USA)

SD は 3.6kcal/g、脂肪量は 51g/kg であるが、CDAHFD は 5.2kcal/g、60%の脂肪と 0.1%のメチオニンを含む超高脂肪食である。

マウス NASH モデルは、12 週間にわたり 3 日に 1 回 CDAHFD を交換し自由摂食させ作製した。

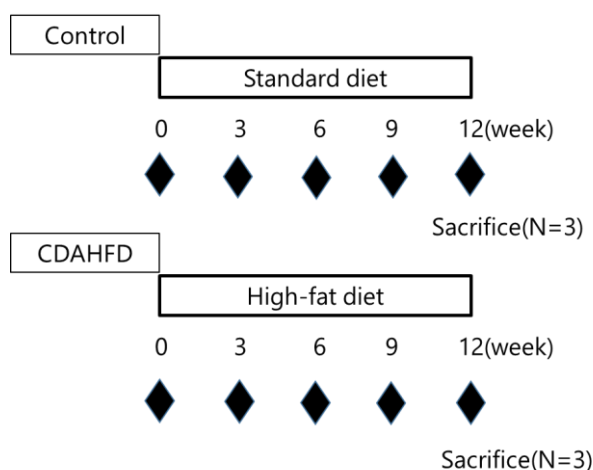


図 3. CDAHFD 誘発 NASH マウスモデルにおける実験プロトコル

マウスは SD 群と CDAHFD 群に分け、1 週間ごとに体重測定を行い、3, 6, 9, 12 週で 3 匹ずつイソフルラン麻酔下に屠殺した。血液サンプルは下大静脈から採取し、10 分遠心ののち血清分離し、使用まで -80℃ で保存した。肝臓組織は重量を測定の後、右葉を 40 g/L formaldehyde saline で固定、paraffin で包埋後、5 μ m 厚の切片を作製した。H&E (hematoxylin and eosin) 染色および

Masson' s trichrome 染色を試行。また分切した右葉を凍結保存および RNA-later で保存した。

血清 ALT 値、血清 sCD14 値、肝臓組織、腸組織(空腸、回腸、直腸)、便検体の採取を行った。

8. マウス血清 ALT 値の測定

Mouse Alanine Aminotransferase (ALT) ELISA Kit (MyBioSource, CA, USA.) (検出域 0. 312-20 ng/mL) を用いて測定した。

実験プロトコール

- ① 血清 sample と ALT standard sample を well に各 100 μ l ずつ添加し incubator37°C で 90 分静置し ELISA plate を 2 回 washing
- ② Biotinylated mouse ALT antibody liquid を各 100 μ l 加え incubator37°C で 60 分静置し ELISA plate を 3 回 washing
- ③ Enzyme-conjugated liquid を各 100 μ l 加え incubator37°C で 30 分静置し ELISA plate を 5 回 washing
- ④ Color reagent liquid を各 100 μ l 加え、37°C 暗所で incubator し color reagent C を加え光学濃度(OD:450nm)を測定

9. マウス血清 sCD14 値の測定

Mouse CD14 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Abingdon, UK.) (検出域 62.5-4000 pg/mL) を用いて測定した。

実験プロトコール

- ① 血清 10 μ l を 390 μ l の RD6-31 試薬で希釈
- ② 各プレートに assay Diluent (RD1-114) を 100 μ l 添加後、standard、各 sample を 50 μ l 添加し 2 時間静置
- ③ Wash Buffer で 5 回 washing
- ④ Mouse CD14 Conjugate を各 100 μ l 添加し 2 時間静置
- ⑤ ③を再度行う
- ⑥ Substrate solution を 100 μ l 添加し暗所で 30 分静置
- ⑦ Stop solution を各 100 μ l 添加
- ⑧ Microplate reader で 450nm、540-570nm の波長を測定

10. マウス肝臓内mRNA 定量

試薬及び材料

2-mercaptoethanol(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), PBS (Life Technologies, Tokyo, Japan), RNA later

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), the Step One Plus (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan), RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan), Gene Expression Assays (TLR4, α SMA, col1A1, TNF α , occludin, ZO-1, claudin) (Applied Biosystems, Tokyo, Japan)

RNA 抽出：摘出した肝臓の一部から RNeasy Mini Kit を用いて以下の方法で行った。

- ① 検体を RNA later に浸透させ-30℃で保存。
- ② Buffer RLT 600 μ L、2-mercaptoethanol 6 μ L、5.0 mm ジルコニアビーズを加え、2.0 mL 破砕用 tube に検体を入れ、ビーズクラッシャー(μ T-01, TITEC, Koshigaya, Japan)を用いて 60 秒間肝組織を破砕
- ③ 15,000 rpm、3 分間室温で遠心し、上清を microtube に移し、70% ethanol 600 μ L を加えピペッティングにより混和
- ④ 700 μ L のサンプルを 2 mL collection tube 中にセットした RNeasy スピンカラムに入れ、8,000g、15 秒間、室温遠心し、ろ液を廃棄
- ⑤ 700 μ L の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、8,000g、15 秒間、室温遠心し、ろ液を廃棄
- ⑥ 500 μ L の Buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、8,000g、15 秒間、室温で遠心し、ろ液を廃棄した。同作業を 2 回行った。2 回目の際は 2 分間遠心した。
- ⑦ RNeasy スピンカラムを新しい microtube にセットし、40 μ L の RNeasy free water を直接スピンカラム・メンブレンに添加し、8,000g で 1 分間、室温で遠心し RNA を含む溶出液を回収
- ⑧ RNA の濃度測定は、分光光度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った。

cDNA 作成：a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用いて以下の手法にて行った。

- ① 10 $\times$ RT buffer・dNTP・Ramdum Primer・Transcriptase・RNase inhibitor・RNA サンプル・RNase free water が計 20 μ L となるように調製し、サーマルサイクラーにセット。25℃10 分、37℃120 分、85℃5 分、4℃でインキュベートを行い cDNA を合成した。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)：

- ① 200 μ L 96-well plate に、TaqMan Fast Advanced Master Mix 10 μ l・TaqMan Gene Expression Assay 1 μ l・cDNA template 1 μ l・Nuclease-

free Water 8 μ l を加え、計 20 μ l に調整。

- ② 95°C 20 秒を 40 サイクル、95°C 1 秒、60°C 20 秒を 40 サイクルの条件で the Step One Plus (applied biosystems) を用いて定量的 RT-PCR を行った。Rodent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) の発現を各サンプルのインターナルコントロールとして使用した。

11. マウス便中メタゲノム解析

12 週飼育マウス SD 群 (n=3)、CDAHFD 群 (n=3) の新鮮便を採取し、直ちに -80°C で保存。

ライブラリー作製とシーケンシング方法

1. DNA抽出

VD-250RFreezeDryer (TAITEC) を用いて、サンプルを凍結乾燥。

ShakeMasterNeo (bms) を用いて、凍結乾燥したサンプルを粉砕。

MPureBacterialDNAExtractionKit (MPBio) を用いて、粉砕サンプルからDNAを抽出。

2. DNA溶液の定量測定

SynergyH1 (BioTek) と QuantiFluorsDNASystem (Promega) を用いて、抽出したDNA溶液の濃度測定を行った。

3. ライブラリー作製

2 step tailedPCR法を用いてライブラリーを作製した。

4. ライブラリーの定量

SynergyH1 と QuantiFluorsDNASystem を用いて、作製されたライブラリーの濃度測定を行った。

5. ライブラリーの品質確認

FragmentAnalyzer と dsDNA915ReagentKit (AdvancedAnalyticalTechnologies) を用いて、作製したライブラリーの品質確認を行った。

6. シーケンシング解析

MiSeq を用いて 2x300bp の条件でシーケンシングを行った。

データ解析方法 (16SV1/V2)

1. リードのクオリティーフィルタリング

Fastxtoolkitのfastq_barcode_spliltterを用いて配列の読み始めが使用プライマーと完全一致する配列のみを抽出。抽出した配列のプライマー配列を削除し、sickletoolsを用いてクオリティー値が20未満の配列を取り除き、100塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。

2. リードのマージ

ペアエンドマージスクリプトFLASHを用いて、クオリティーフィルタリングを通った配列をマージした。マージの条件は、マージ後の断片長320塩基、リードの断片長230塩基、最低オーバーラップ長10塩基とした。

3. キメラチェック

全てのフィルタリングを通った配列を、usearchのuchimeアルゴリズムを用いて、キメラ配列のチェックを行った。データベースは菌叢解析用パイプラインQiimeに付属するGreengeneの97%OTUとし、キメラと判断されなかった全配列を抽出して以後の解析に用いた。

4. OTU作成と系統推定

OTU作成と系統推定はQiimeのワークフロースクリプトを用いて、リファレンス無し、パラメーターをすべてデフォルトの条件で行った。

12. マウス小腸解析

各マウス屠殺後、小腸の長さを測定した。またH&E染色を行い回腸上皮の観察を行った。上皮のダメージを客観的に評価するため、上皮の空胞化、上皮の消失、絨毛の破壊のスコア化を行い0-5点で評価を行った(Hernandez P et al., 2015)。また同時に絨毛の基底膜からの距離と絨毛間の距離の測定も行った。

• Epithelial vacuolization	score
No damage	0
Damage was seen 1/3	1
Damage was seen 2/3	2
All of the villi	3
• Loss of Epithelial cell	
Absence	0
Presence	1
• Villus disruption	
Absence	0
Presence	1

clinical score : 0-5

図 4. 回腸上皮の組織学的スコアによる評価

マウス回腸の電子顕微鏡観察

固定：マウス回腸は、固定液（2%パラフォルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド、0.1Mリン酸バッファー、pH7.4）で4℃下一晩固定後、0.1Mリン酸バッファーで30分間3回洗浄し、後固定液（2%四酸化オスミウム、0.1Mリン酸バッファー）で4℃下2時間、後固定を行った。

脱水：50%と70%エタノールで4℃下各20分、90%エタノールで室温下20分、100%エタノールで室温下20分を4回行った。

浸透：酸化プロピレンで30分2回、7：3比率の酸化プロピレンとレジンの混合液で1時間浸透させ、一晩酸化プロピレンを揮発させた。

包埋および重合：新しいレジンの交換後、60℃48時間重合させた。

超薄利切片作成：重合させたレジンをダイヤモンドナイフで70 nmで切片を切り出し、銅グリッドへ搭載。2%酢酸ウラニルで室温15分間染色し、蒸留水で洗浄後、Lead stain solution (Sigma-Aldrich Co., Tokyo, Japan)で室温3分間二次染色した。

観察：透過電子顕微鏡 (JEM-1400Plus; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) にて加圧電圧100 kVで観察、撮影はCCDカメラ (EM-14830RUBY2; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) にて画素数 (3296 x 2472 pixels) で行った。

13. マウス便中ムチン測定

Fecal Mucin Assay Kit(コスモ・バイオ株式会社, Sapporo, Hokkaido) (検出域 15.625-250 μ g/mL) を用いて測定した。

実験プロトコール

- ① 標準液(N-アセチルガラクトサミン 250 μ g/ml)を原液として緩衝液Aにて糖倍希釈し250、125、62.5、31.25、15.625 μ g/ml、ブランクを調整
- ② 凍結乾燥し、粉碎した糞便約100mgを2ml用マイクロテストチューブに測りとり、1ml緩衝液Aを加え混和し4℃・20000×g・15分間遠心
- ③ 上清200 μ lに緩衝液200 μ lを加え酵素溶液10 μ lを加え50℃で20分間加温
- ④ 99.5%エタノール溶液を615 μ l加え-20℃で一晩放置
- ⑤ 4℃・20000×g・10分間遠心し上清を除去
- ⑥ 沈殿物に緩衝液Aを1ml加え検体ムチン測定試料液とする
- ⑦ 検体ムチン測定試料液もしくは標準液を20 μ lとり、試薬A：試薬Bを1：5の比で混和した溶液を24 μ l加え攪拌後、100℃で30分加温
- ⑧ 室温まで冷まし緩衝液Cを200 μ l加え攪拌しブラックプレートに100 μ l/ml分注し蛍光プレートリーダーにて励起波長336nm・蛍光波長383nmにて測定し検量線を作成

5. 統計解析

カテゴリーデータは、 χ^2 検定およびフィッシャー検定によって解析した。数値データは、Wilcoxon 検定で解析した。カットオフ値は、ROC 曲線分析において、Youden の指標が最大となるよう算出した。動物実験データは平均値と

標準偏差で表した。2 群での検定には、student t-test を用いた。統計解析には、解析ソフトである JMP (v14.1.0 software package, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用し、P 値は 0.05 未満で有意差ありと判定した。

研 究 結 果

1. 患者背景

NAFLD111名の患者のうち、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群はBrunt分類によりF0-2の線維化が軽度なmild NASH(n=46)群、F3-4の線維化が進行している進行 advanced NASH(n=29)群に分類した(表2)。全NASH群ではNAFL群と比較し、女性が多く($p = 0.030$)、血小板($p = 0.020$)やアルブミン($p = 0.001$)が低く、AST($p = 0.002$)およびヒアルロン酸($p < 0.001$)、4型コラーゲン7S($p < 0.001$)、M2BPGi($p < 0.001$)などの線維化マーカーが有意に高かった。糖尿病、高血圧、高脂血症の合併やインスリン抵抗性の指標であるhomeostasis model assessment as an index of insulin resistance (HOMA-IR)は有意差を認めなかった。mNASH群ではNAFL群と比較し、アルブミン($p = 0.035$)が若干低く、AST($p = 0.003$)およびヒアルロン酸($p = 0.007$)、4型コラーゲン7S($p = 0.002$)、M2BPGi($p = 0.005$)などの線維化マーカーが有意に高かった。性差や血小板は有意差を認めなかった。aNASH群ではNAFL群と比較し、年齢が高く($p = 0.017$)、女性が多く($p = 0.008$)、糖尿病合併が多く($p = 0.027$)、血小板($p < 0.001$)やアルブミン($p < 0.001$)が低く、AST($p = 0.029$)、ALT($p = 0.023$)が高く、ヒアルロン酸($p < 0.001$)、4型コラーゲン7S($p < 0.001$)、M2BPGi($p < 0.001$)などの線維化マーカーが有意に高かった。また血小板、アルブミンは線維化が進行する程低下し、ヒアルロン酸、4型コラーゲン7S、M2BPGiは線維化が進行するにつれ上昇を認めた。

表 2. 患者背景 [中央値 (範囲) 、* ; $P < 0.05$]

因子	NAFL (n = 36)	All stages of NASH (n = 75)	<i>P</i> value	Mild fibrosis stage of NASH (F0-2) (n = 46)	<i>P</i> value vs. NAFL	Advanced fibrosis stage of NASH (F3-4) (n = 29)	<i>P</i> value vs. NAFL
生検時年齢 (歳)	44 (17-81)	58 (25-79)	n. s.	50 (25-79)	n. s.	63 (27-75)	0.017*
性別 (男性/女性)	23/13	31/44	0.030*	22/24	n. s.	9/20	0.008*
BMI (kg/m ²)	28.8 (19.1-36.3)	29.0 (16.9-50.0)	n. s.	29.7 (16.9-50.0)	n. s.	27.7 (19.2-35.8)	n. s.
糖尿病、n (%)	15 (41.7%)	42 (56.0%)	n. s.	22 (47.8%)	n. s.	20 (69.0%)	0.027*
高血圧、n (%)	10 (27.8%)	29 (38.7%)	n. s.	17 (37.0%)	n. s.	12 (41.4%)	n. s.
高脂血症、n (%)	15 (41.7%)	20 (26.7%)	n. s.	6 (20.7%)	n. s.	6 (20.7%)	n. s.
Plt (10 ¹⁰ /L)	21.1 (12.8-40.2)	19.2 (3.3-41.0)	0.020*	21.2 (9.2-41.0)	n. s.	14.3 (3.3-23.8)	<0.0001*
Alb (g/dL)	4.5 (3.8-5.2)	4.3 (2.9-5.2)	0.001*	4.3 (3.3-5.2)	0.035*	4.0 (2.9-4.8)	<0.0001*
AST (IU/L)	39 (23-99)	56 (18-675)	0.002*	61 (20-675)	0.003*	53 (18-100)	0.029*
ALT (IU/L)	65 (14-261)	63 (17-397)	n. s.	81 (17-379)	n. s.	43 (21-109)	0.023*
ヒアルロン酸 (ng/mL)	24 (10-229)	77 (9-3434)	<0.0001*	42 (9-708)	0.007*	240 (27-3434)	<0.0001*
4 型コラーゲン 7S (ng/mL)	4.3 (2.2-6.4)	5.6 (3.3-13.6)	<0.0001*	5.0 (3.3-13.6)	0.002*	7.7 (3.9-12.9)	<0.0001*
M2BPGi (COI)	0.57 (0.21-4.25)	1.15 (0.24-8.90)	<0.0001*	0.85 (0.24-4.24)	0.005*	2.30 (0.60-8.90)	<0.0001*
HOMA-IR	4.6 (0.9-51.3)	5.2 (1.6-164.8)	n. s.	4.5 (1.6-23.8)	n. s.	5.8 (1.7-164.8)	n. s.

Alb, albumin; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BMI, body mass index; DM, diabetes mellitus; HBP, high blood pressure; HOMA-IR, homeostasis model assessment as an index of insulin resistance; M2BPGi, Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein glycan isomer; NAFL, nonalcoholic fatty liver; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; n. s., not significant; Plt, platelet count.

2. ヒト NAFLD 検体の血清 sCD14 値

NAFL、mNASH、aNASH の 3 群それぞれの血清 sCD14 値を測定した。血清 sCD14 値は 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 (図 5)。また、血清 sCD14 値について、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 ($p = 0.012$)。

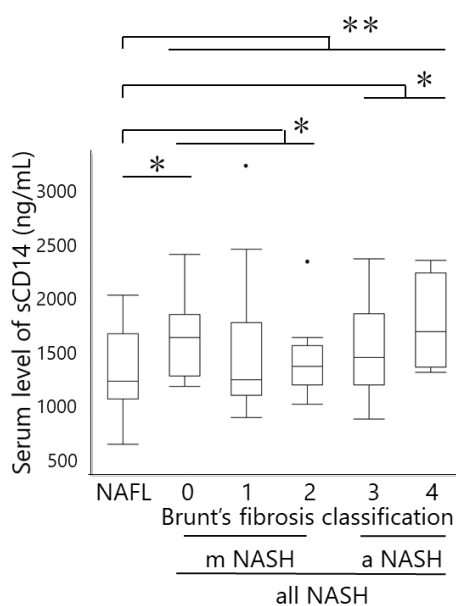


図 5. NAFL と NASH 各線維化ステージ(F0-F4)における血清 sCD14 値の分布

* ; $P < 0.05$ ** ; $P < 0.01$

3. NAFL と NASH(F0) を判別するカットオフ値の算出

NAFL と NASH(F0) 症例を予測・診断するため、血小板、アルブミン、AST、ALT、ヒアルロン酸、4 型コラーゲン 7S、M2BPGi、sCD14 の各項目で ROC 曲線よりカットオフ値を算出した (表 3)。s CD14 のカットオフ値は、1262 ng/dL で、AUC は 0.73 であった。この結果はその他の因子で最も AUC が高い 4 型コラーゲン 7S (AUC : 0.72、 $p = 0.017$) とほぼ同等の結果であった。

表 3 : NAFL と NASH(F0) における各マーカーの cutoff 値 [* ; $P < 0.05$]

NAFLD patients (NAFL = 36, F0 NASH = 16)								
	Plt ($10^{10}/L$)	Alb (g/dL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ヒアルロ ン酸 (ng/mL)	4 型コラーゲン 7S (ng/mL)	M2BPGi (COI)	sCD14 (ng/dL)
Cutoff value	9.7	4.4	81	75	11	4.0	0.72	1262
AUC	0.48	0.62	0.67	0.57	0.59	0.72	0.68	0.73
P value	0.80	0.14	0.015*	0.25	0.67	0.017*	0.37	0.012*
感度 (%)	11	74	42	53	100	89	82	100
特異度 (%)	100	55	94	64	20	41	76	41
陽性的中率 (%)	100	47	80	43	40	46	64	50
陰性的中率 (%)	68	80	76	72	100	88	89	100

* ; $P < 0.05$

4. NASH マウスモデルの表現型解析

臨床検体で得られた NASH において sCD14 が非線維化進展、線維化早期に上昇する機序および経時的な変化を調べる目的で、NASH マウスモデルで検証することとした。6 週齢の C57BL/6J マウスを Standard Diet (SD) 群と A choline-deficient, L-amino acid-defined, high fat diet (CDAHFD) 群で 12 週間飼育を行ったところ、CDAHFD 群では 3 週まで軽度の体重減少が認められたものの、その後は緩やかに上昇を認めた (図 6A)。一方、肝重量/体重比は CDAHFD 群で有意に高く (図 6B)、肉眼像でも CDAHFD 群で肝腫大および脂肪化を認めた (図 7)。マウス血清 ALT 値は CDAHFD 群で 12 週で高い傾向を示した (図 8)。

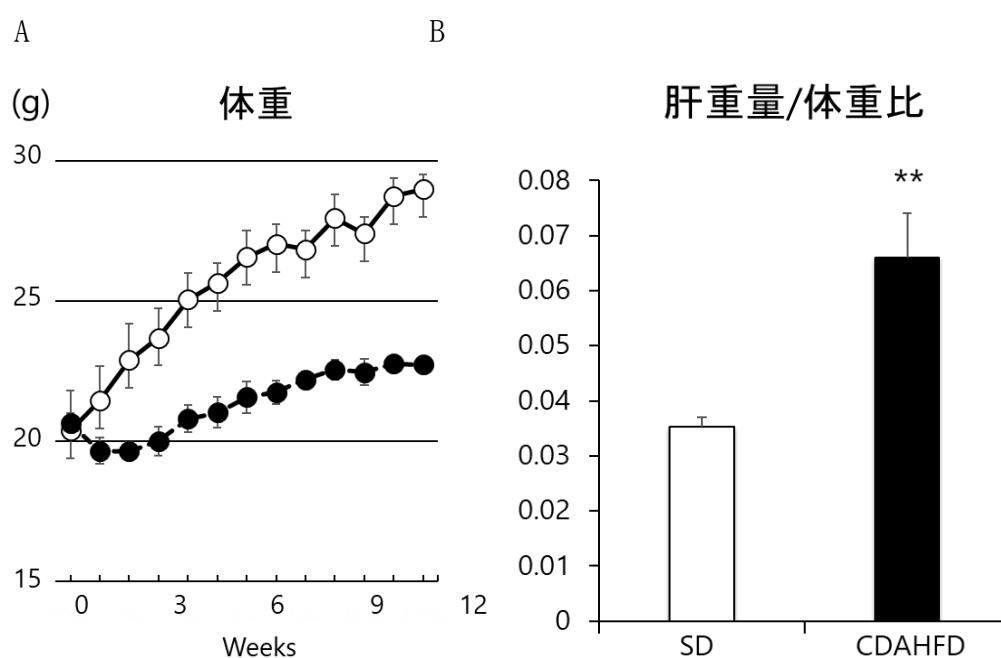


図 6. A. マウスの体重推移 (○SD 群、●CDAHFD 群、摂餌開始を 0 週とし 12 週間後までを示す)、B. 12 週摂餌後マウスの肝重量/体重比、各群 $n = 5$ 、平均値および標準偏差で示す。** ; $P < 0.01$ 。



SD

CDAHFD

図 7. 12 週摂餌後マウスの肝左葉肉眼像

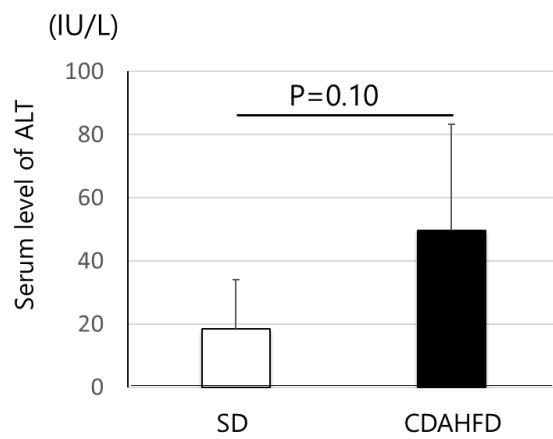


図 8. 12 週摂餌後マウスの血清 ALT 値, 各 n = 5, 平均値および標準偏差で示す

マウス肝臓病理組織像では、H&E 染色において CDAHFD 群でのみ 3 週から肝の脂肪化を認めた。Masson' s trichrom 染色では、CDAHFD 群でのみ 6 週から軽度の線維化を認め、9 週、12 週と時間経過とともに線維化が進行していることが確認された (図 9)。

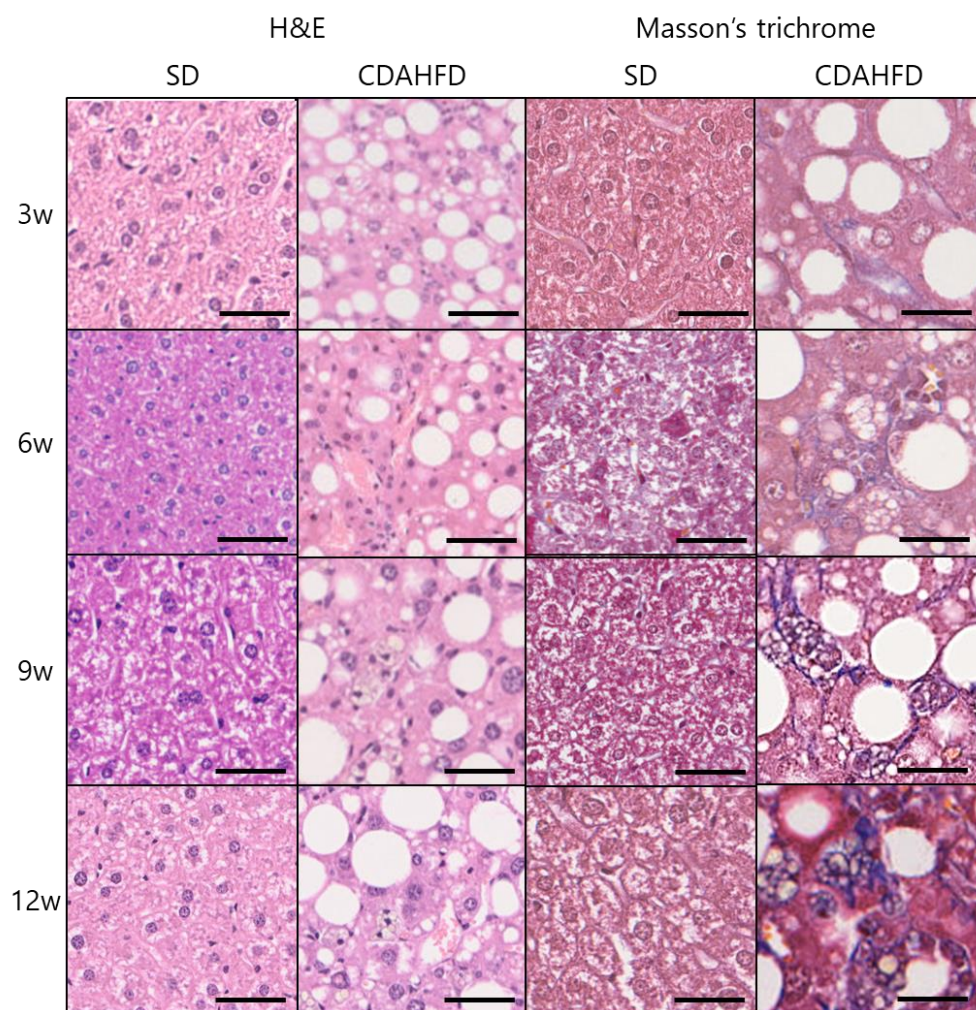


図 9. マウス肝臓の病理組織像(倍率 200 x で撮像、Scale bars は 25 μ m を示す)、H&E (hematoxylin and eosin) 染色および Masson' s trichrome 染色の各 SD 群、CDAHFD 群の 3 週、6 週、9 週、12 週間摂餌後の代表例を示す。

4. NASH マウスモデルの腸内環境の解析

12 週摂餌後マウスでの SD 群 (n = 3)、CDAHFD 群 (n = 3) の糞便中の腸内細菌叢メタゲノム解析を行った (図 10)。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 群でのみ Verrucomicrobia 門の増加が確認された。

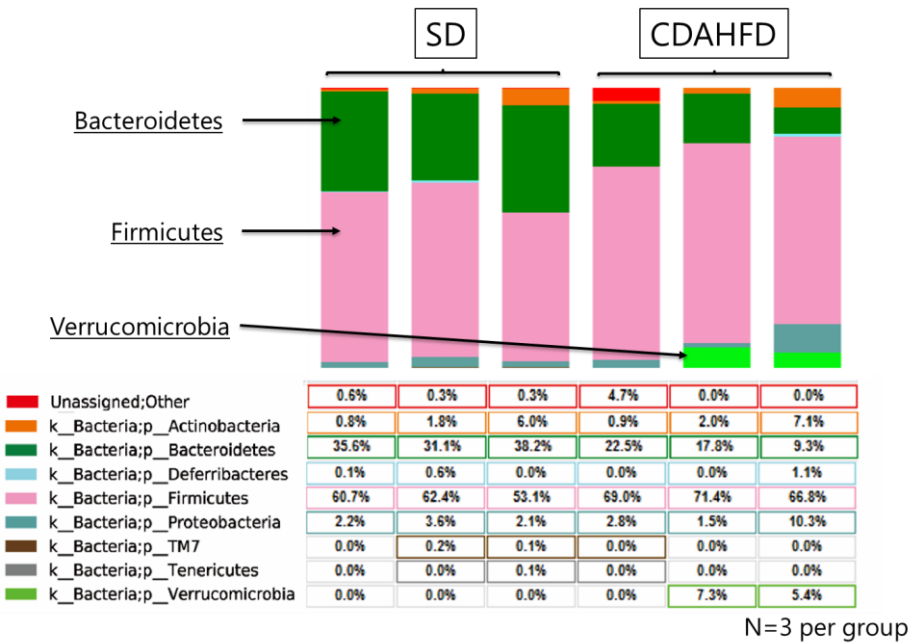


図 10. 12 週摂餌後マウスにおける糞便中メタゲノム解析 (各 n = 3)

マウスの便中ムチン含有量について SD 群と CDAHFD 群で比較したところ、CDAHFD 群では有意に単位便中のムチン含有量が低下していることがわかった (図 11)。

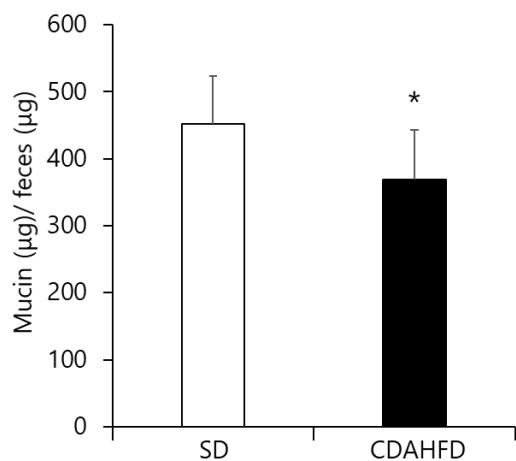


図 11. 12 週摂餌後マウスにおける単位便中のムチン量の比較
各群 n = 5、平均値および標準偏差で示す。* ; $P < 0.05$ 。

CDAHFD 群の小腸の長さは、SD 群に比べ有意に短縮していた (図 12A)。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し (図 12B)、絨毛長 (図 12C)、絨毛間距離 (図 12D) 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病理学的に確認した。

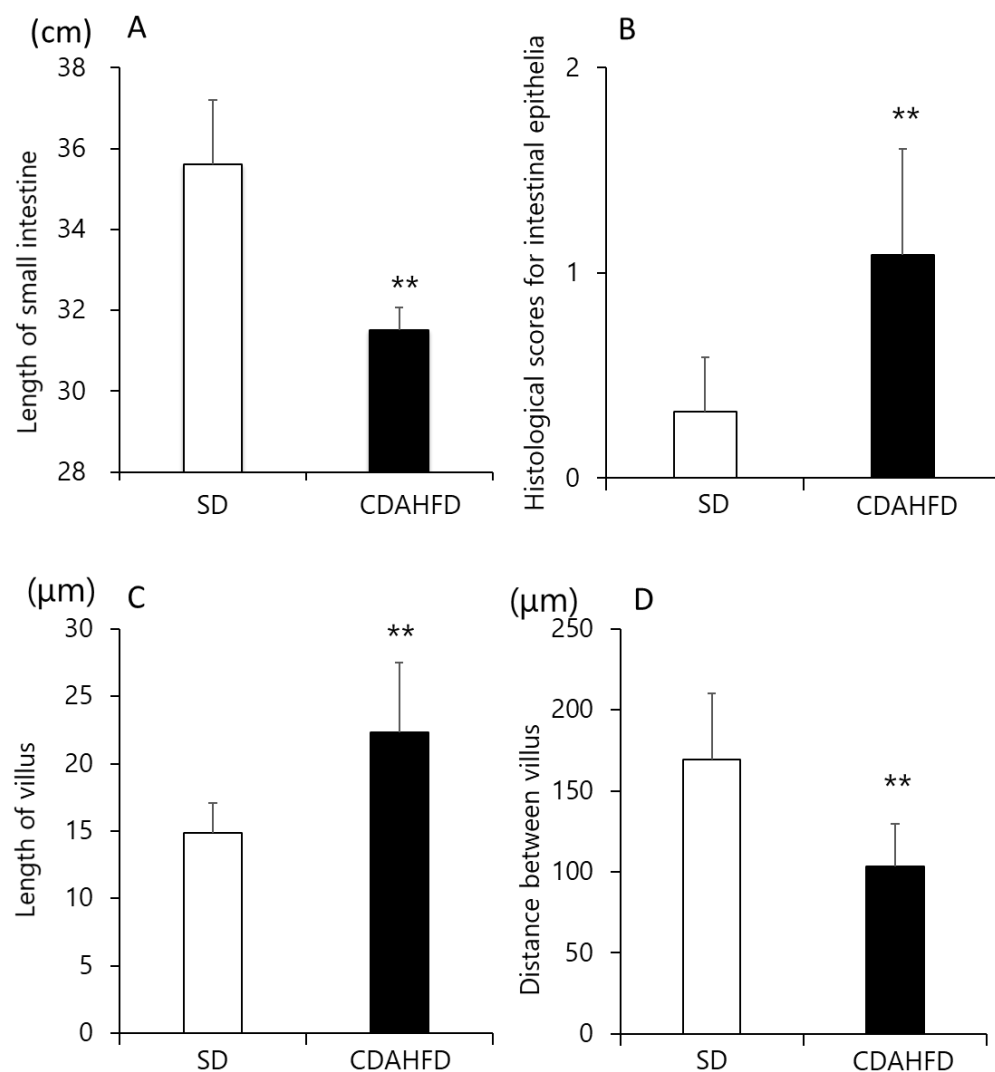


図 12. 12 週摂餌後マウスにおける SD 群と CDAHFD 群の小腸の比較、A：小腸全長、B：回腸上皮の病理学的スコア、C：絨毛長、D：絨毛間距離、各群 $n = 5$ 、平均値および標準偏差で示す。**； $P < 0.01$ 。

電子顕微鏡で回腸を観察すると CDAHFD 群のみに、細胞間隙の開大を示唆する所見を認めた (図 13)。

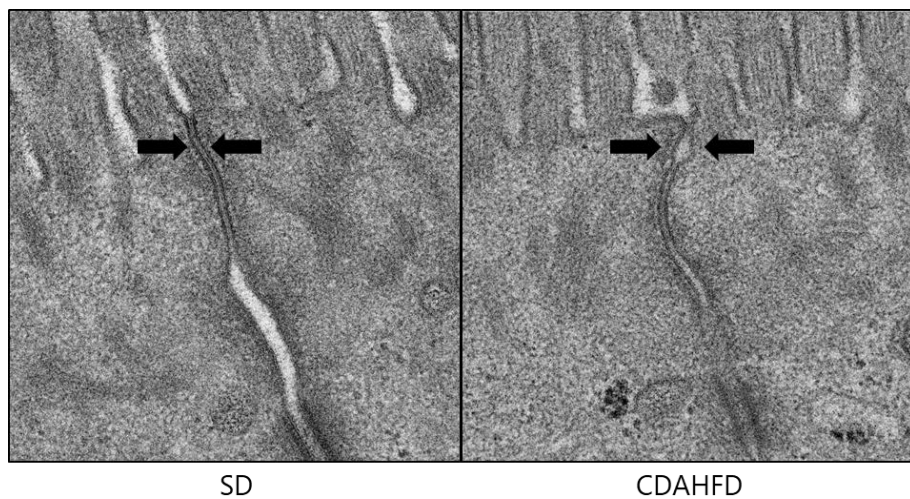


図 13. 12 週摂餌後マウスにおける SD 群と CDAHFD 群の回腸上皮の電子顕微鏡所見 (矢印は、タイトジャンクションを示す)

また、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 (図 14)。

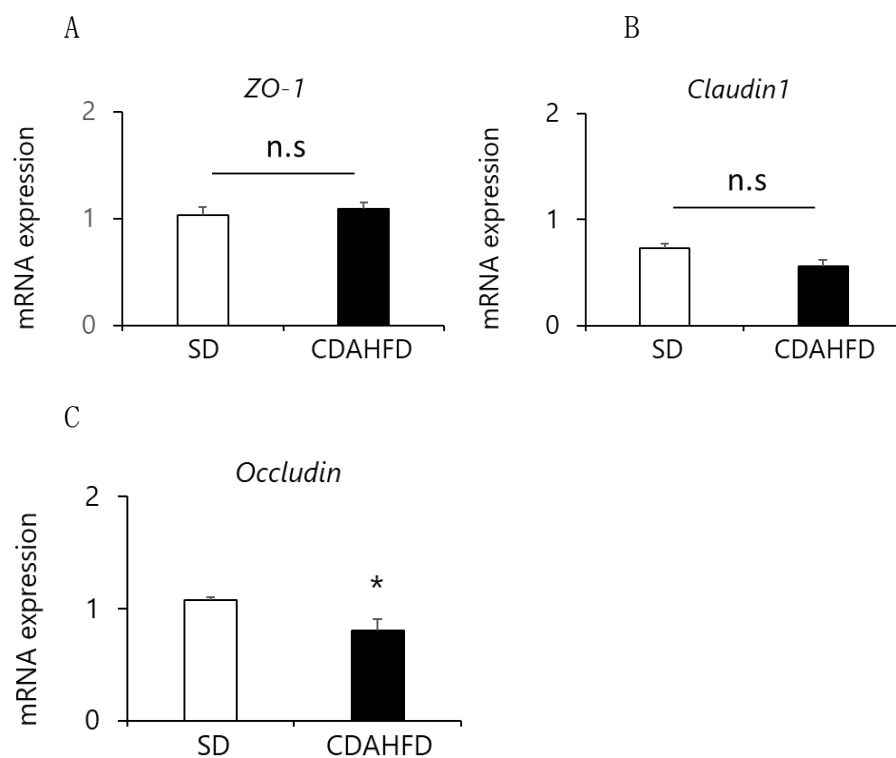


図 14. 12 週摂餌後マウスにおける回腸上皮の各 mRNA 発現量の検討

A : ZO-1、B : Claudin 1、C : Occludin、各群 $n = 3$ 、平均値および標準偏差で示す。* ; $P < 0.05$ 。

5. NASH マウスモデルの血清 s CD 値と肝内 mRNA の解析

SD 群に比べ CDAHFD 群の血清 s CD14 値は、3 週目から有意に上昇し、その傾向は 12 週まで続いた (図 15)。

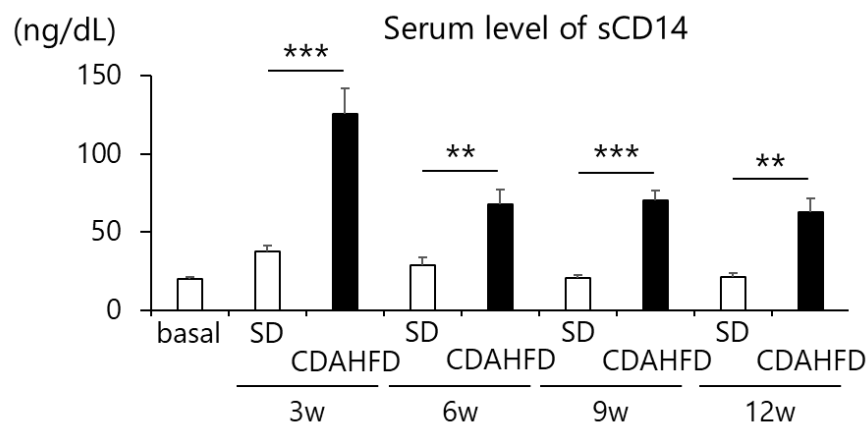
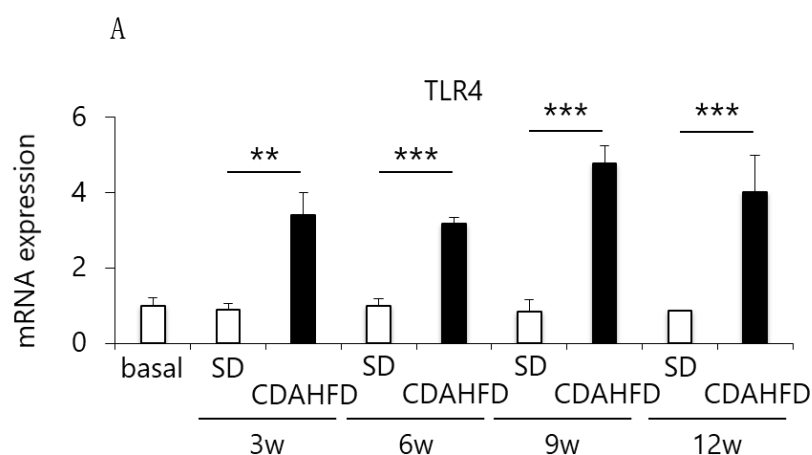


図 15. マウス血清 sCD14 値の推移

SD 群、CDAHFD 群の開始時、3、6、9、12 週間摂餌後の値を示す、各群 $n = 5$ 、平均値および標準偏差で示す。** ; $P < 0.01$ 、*** ; $P < 0.001$ 。

また肝内の mRNA の発現量の検討では、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 発現の亢進を認めた (図 16)。



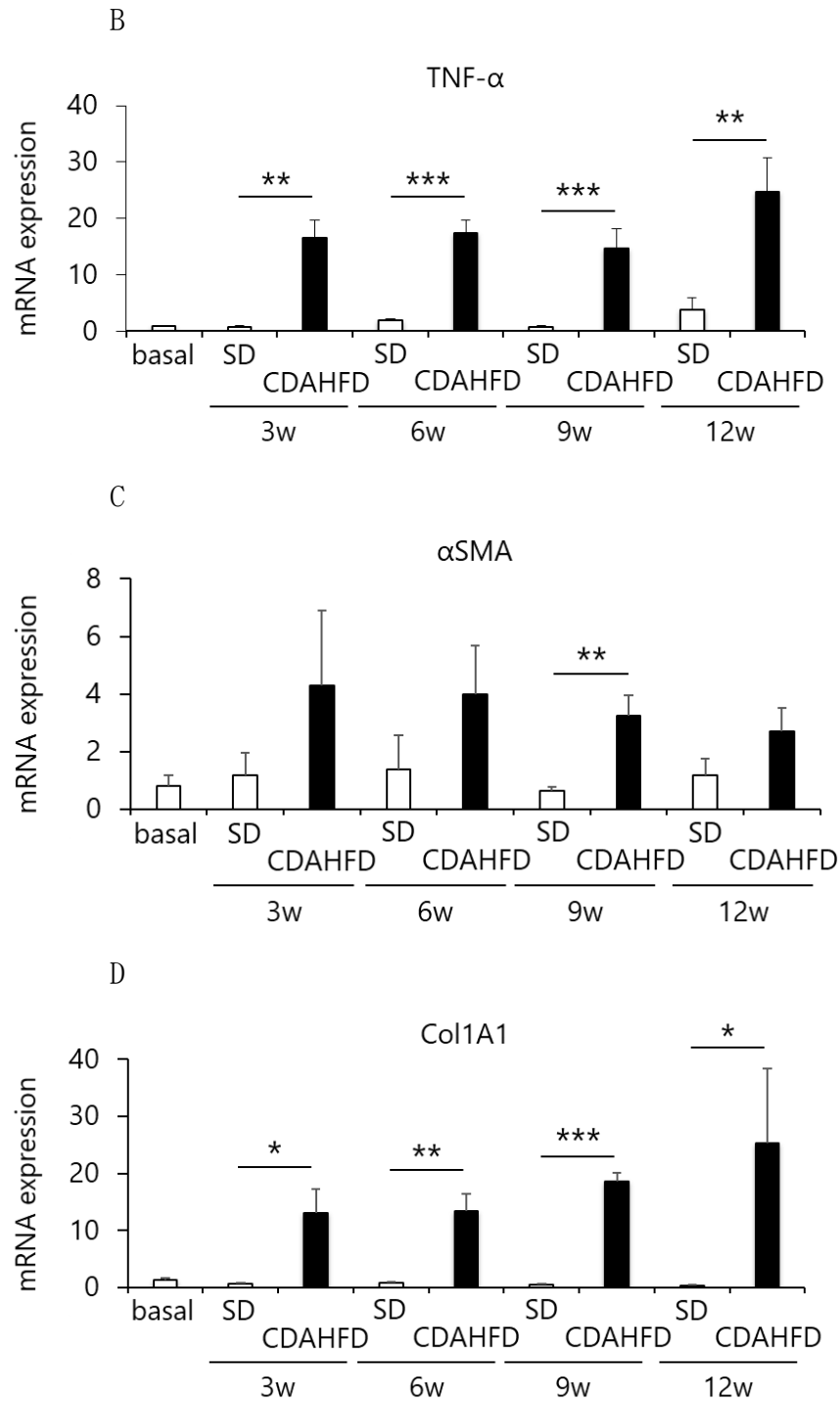


図 16：肝臓の各 mRNA 発現量の検討

SD 群、CDAHFD 群の開始時、3、6、9、12 週間摂餌後の A:TLR4、B:TNF- α 、C:
 α SMA、D:Col1A1 の mRNA 発現量、各群 n = 3、平均値および標準偏差で示す。

* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 、*** ; $P < 0.001$ 。

考 察

NAFLD は肥満者の増加に伴い、世界中で最も多い慢性肝疾患となった (Younossi et al., 2018)。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、NASH 線維化進展例を区別することは可能であるが (Castera et al., 2019)、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 (Rockey et al., 2009)。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。

CD14 はマクロファージ/モノサイト/顆粒球の細胞内、細胞膜に存在し、エンドトキシンの細胞内シグナル伝達を担うとされている。血清 sCD14 値は細菌感染に伴い上昇し、NASH 患者においても肝の炎症の程度と相関して上昇すると報告されている (Ogawa et al., 2013)。しかし、NASH 患者での血清 sCD14 と線維化との関連や、NAFLD 患者からの血清 sCD14 を用いた NASH 患者の拾い上げの検討は、これまで行われていなかった。

まず我々は、ヒト検体での血清 sCD14 値が NASH 患者の線維化に関連しているかの検討を行った。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 NASH (F0) 症例を予測・診断するため、血小板、アルブミン、AST、ALT、ヒアルロン酸、4 型コラーゲン 7S、M2BPGi、sCD14 の各項目で ROC 曲線よりカットオフ値を算出した。sCD14 のカットオフ値は、1262 ng/dL で、AUC は 0.73 と中等度の予測・診断能を有していることが判明した。この結果はその他の因子で最も AUC が高い 4 型コラーゲン 7S (AUC : 0.72、 $p=0.017$) とほぼ同等の結果であった。しかし、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。以上より血清 sCD14 値は、NAFL と NASH (F0) を区別する早期マーカーとしての可能性が示唆された。

次に、臨床検体で得られた NASH において sCD14 が非線維化進展、線維化早期に上昇する機序および経時的な変化を調べる目的で、短期間で脂肪性肝炎と線維化を起こす CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスモデル (Matsumoto et al., 2013) を用いて検討を行った。CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスでは肝細胞の脂肪化、風船様変化、炎症細胞浸潤のいずれもが観察され FLIP アルゴリズムの NASH 診断の定義を満たした。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。これらの結果より、本研究では CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスを、NASH マウスモデルとして採用することとした。NAFLD 患者では血中エンドトキシン濃度が有意に上昇すること (Harte et al., 2010)、腸管透過性が有意に亢進していること (Miele et al., 2009) が明らかとなっており、CDAHFD 摂餌 C57BL/6J マウスの腸内環境の検討を行った。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。この傾向は、ヒトの NASH 患者における腸内細菌叢の変化と同様の結果であった。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 (Rodriguez-Pineiro and Johansson, 2015; Tailford et al., 2015) のグラム陰性菌が多くを占めることが観察された。CDAHFD 群でのみ増加が確認された Verrucomicrobia 門の Akkermansia 属 muciniphila 種は腸管バリア機構のなかでも重要とされるムチン層を減少させることが知られている。糞便中の含有ムチン量を検討したところ、CDAHFD 群で有意差をもって減少していた。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。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ることが観察された。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しない。一定量の恒常的な菌体成分の刺激が、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 TNF α 、collagen1A1 の上

昇、肝星細胞の活性化を表す α SMA の mRNA 発現の亢進を CDAHFD 群で確認された。

以上の結果から、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行った、腸管内バリア機構の破綻を誘発し、腸の透過性が亢進したことにより、バクテリアルトランスロケーションが多く引き起こされ、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透過性亢進、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。

本研究の Limitation として、1 つ目に肝生検で NAFL と診断された患者は、通常の NAFL よりも NASH が疑われる症例であった選択バイアスの可能性がある。2 つ目に肝生検時におけるサンプリングエラー、診断病理医間でのバイアスの問題も挙げられる。3 つ目に血清 sCD14 値は、胆汁うっ滞、胆道閉鎖、虚血性病変などで上昇する場合があると報告されている (Chou et al., 2012; Luan et al., 2012) が、本検討においては除外可能であったと考えられる。

現在、世界中で NASH に対する新規創薬開発が行われている (Sumida et al., 2019)。今回我々が着目した腸内環境においても腸内細菌叢への介入や、糞便移植、腸管透過性改善が、標的として考えられている。全世界の人口の約 25% 存在する NAFLD から、線維化進展前の NASH を早期に判別することが、不要な肝生検や検査を減らせるという医療経済への貢献や、早期の治療介入を可能とすることにつながると考えられる。今後、多施設共同研究による症例の集積や NASH と判別した症例を長期間調査することが、本研究で明らかとなった事実のさらなる検証に必要と考えられた。さらに診断精度や判別能を高めるため、sCD14 と組み合わせるマーカーの探索が必要と考えられた。

総括および結論

本研究において、以下の知見が得られた。

- ・ ヒト NASH 患者において、NAFL 患者と比較して血清 sCD14 値の上昇が認められた。
- ・ 血清 sCD14 値のカットオフ値を用いることにより、NAFL 患者と非線維化 NASH (F0) 患者を判別可能であるという事は、本研究により新たに発見されたものである。
- ・ NASH マウスモデルでは、腸内環境の変化によって、腸管透過性の亢進が起こり、肝内での炎症と肝線維化を起こすことが判明した。
- ・ NASH マウスモデルでも線維化進展前から、血清 sCD14 の上昇を認めた。
- ・ ヒト血清 sCD14 においてマウスモデルと同様に線維化が軽度な早期の段階から上昇し、NAFL 患者と NASH (F0) 患者を区別する早期 NASH 診断マーカーになり得る可能性が示唆された。

今後は、多施設共同研究による症例の集積や NASH と判別した症例の長期間経過観察が、本研究で明らかとなった事実のさらなる検証に必要と考えられた。さらに診断精度や判別能を高めるため、sCD14 と組み合わせるマーカーの探索が必要と考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました、北海道大学大学院医学研究院内科学分野消化器内科学教室 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

同教室：森川賢一助教には、臨床研究及び基礎研究に対して、その心構え、信念、実験方法、データ解析、論文作成そして学会での発表方法など、あらゆる面において御指導・御支援頂きました、厚く御礼申し上げます。

臨床における技術指導や、検体の採取、症例登録、臨床試験参加同意取得などにご尽力頂きました、北海道大学病院消化器内科 肝臓グループの諸先生方には、深謝いたします。

本研究において血清提供と同意をして頂いた患者さんに深謝いたします。

最後に、本研究に尊い生命を提供して頂きました実験動物諸霊に深く感謝いたします。

2019 年 3 月
中村 晃久

利 益 相 反

なし

引用文献

Angulo, P., Kleiner, D.E., Dam-Larsen, S., Adams, L.A., Bjornsson, E.S., Charatcharoenwitthaya, P., Mills, P.R., Keach, J.C., Lafferty, H.D., Stahler, A., *et al.* (2015). Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* *149*, 389-397 e310.

Bedossa, P., Poitou, C., Veyrie, N., Bouillot, J.L., Basdevant, A., Paradis, V., Tordjman, J., and Clement, K. (2012). Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. *Hepatology* *56*, 1751-1759.

Brunt, E.M., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Neuschwander-Tetri, B.A., and Bacon, B.R. (1999). Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* *94*, 2467-2474.

Castera, L., Friedrich-Rust, M., and Loomba, R. (2019). Noninvasive Assessment of Liver Disease in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* *156*, 1264-1281 e1264.

Chou, M.H., Chuang, J.H., Eng, H.L., Tsai, P.C., Hsieh, C.S., Liu, H.C., Wang, C.H., Lin, C.Y., and Lin, T.M. (2012). Effects of hepatocyte CD14 upregulation during cholestasis on endotoxin sensitivity. *PLoS One* *7*, e34903.

Ding, S., Chi, M.M., Scull, B.P., Rigby, R., Schwerbrock, N.M., Magness, S., Jobin, C., and Lund, P.K. (2010). High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS One* *5*, e12191.

Dulai, P.S., Singh, S., Patel, J., Soni, M., Prokop, L.J., Younossi, Z., Sebastiani, G., Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., *et al.* (2017). Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology* *65*, 1557-1565.

Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., Fredrikson, M., Stal, P., Kechagias,

S., and Hultcrantz, R. (2015). Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* 61, 1547-1554.

Hannah, W.N., Jr., and Harrison, S.A. (2016). Noninvasive imaging methods to determine severity of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 64, 2234-2243.

Harte, A.L., da Silva, N.F., Creely, S.J., McGee, K.C., Billyard, T., Youssef-Elabd, E.M., Tripathi, G., Ashour, E., Abdalla, M.S., Sharada, H.M., *et al.* (2010). Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm (Lond)* 7, 15.

Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., *et al.* (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41, 1313-1321.

Luan, X., Liu, Y., and Li, M. (2012). The role of CD14 and Toll-like receptor 4 of Kupffer cells in hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 44, 937-941.

Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A., and Sudoh, M. (2013). An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 94, 93-103.

Matteoni, C.A., Younossi, Z.M., Gramlich, T., Boparai, N., Liu, Y.C., and McCullough, A.J. (1999). Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116, 1413-1419.

Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R., Masciana, R., Forgiione, A., Gabrieli, M.L., Perotti, G., *et al.* (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49, 1877-1887.

Mouzaki, M., Comelli, E.M., Arendt, B.M., Bonengel, J., Fung, S.K., Fischer, S.E., McGilvray, I.D., and Allard, J.P. (2013). Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 58, 120-127.

Noga, A.A., and Vance, D.E. (2003). Insights into the requirement of phosphatidylcholine synthesis for liver function in mice. *J Lipid Res* 44, 1998-2005.

Ogawa, Y., Imajo, K., Yoneda, M., Kessoku, T., Tomeno, W., Shinohara, Y., Kato, S., Mawatari, H., Nozaki, Y., Fujita, K., *et al.* (2013). Soluble CD14 levels reflect liver inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 8, e65211.

Raman, M., Ahmed, I., Gillevet, P.M., Probert, C.S., Ratcliffe, N.M., Smith, S., Greenwood, R., Sikaroodi, M., Lam, V., Crotty, P., *et al.* (2013). Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11, 868-875 e861-863.

Rivera, C.A., Adegboyega, P., van Rooijen, N., Tagalicud, A., Allman, M., and Wallace, M. (2007). Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 47, 571-579.

Rockey, D.C., Caldwell, S.H., Goodman, Z.D., Nelson, R.C., Smith, A.D., and American Association for the Study of Liver, D. (2009). Liver biopsy. *Hepatology* 49, 1017-1044.

Rodriguez-Pineiro, A.M., and Johansson, M.E. (2015). The colonic mucus protection depends on the microbiota. *Gut Microbes* 6, 326-330.

Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 13, 1324-1332.

Sumida, Y., Okanoue, T., Nakajima, A., and Japan Study Group of, N. (2019). Phase 3 drug pipelines in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*.

Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., and Juge, N. (2015). Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Front Genet* 6, 81.

Tilg, H., and Moschen, A.R. (2010). Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52, 1836–1846.

Tomita, K., Tamiya, G., Ando, S., Ohsumi, K., Chiyo, T., Mizutani, A., Kitamura, N., Toda, K., Kaneko, T., Horie, Y., *et al.* (2006). Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut* 55, 415–424.

Torres, D.M., Williams, C.D., and Harrison, S.A. (2012). Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10, 837–858.

Wong, V.W., Adams, L.A., de Ledinghen, V., Wong, G.L., and Sookoian, S. (2018). Noninvasive biomarkers in NAFLD and NASH – current progress and future promise. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 461–478.

Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., and Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249, 1431–1433.

Younossi, Z., Anstee, Q.M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., and Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15, 11–20.

Younossi, Z.M., Koenig, A.B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., and Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver

disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes.
Hepatology 64, 73-84.