



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Non-alcoholic steatohepatitis and preneoplastic lesions develop in the liver of obese and hypertensive rats: Suppressing effects of EGCG on the development of liver lesions( 要約版(Digest) )
Author(s)	河内, 隆宏
Report No.(Doctoral Degree)	博士(医学) 甲第942号
Issue Date	2014-03-25
Type	博士論文
Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/49075">http://hdl.handle.net/20.500.12099/49075</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

学位論文要約

Extended Summary in Lieu of the Full Text of a Doctoral Thesis

甲第 942 号

氏名: 河内 隆宏  
Full Name Takahiro Kochi

学位論文題目: 肥満・高血圧発症ラットを用いた新規NASH肝発癌モデルの作製-緑茶カテキンEGCGはNASH・高血圧に関連した肝腫瘍形成を抑制する-

Thesis Title Non-alcoholic steatohepatitis and preneoplastic lesions develop in the liver of obese and hypertensive rats: Suppressing effects of EGCG on the development of liver lesions

学位論文要約:  
Summary of Thesis

肥満・糖尿病に高頻度に合併する脂肪肝はメタボリックシンドロームの肝病変とされ、肥満人口とともに増加にしている。脂肪肝の約90%は病的意義に乏しい単純脂肪肝であるが、それ以外の約10%は非アルコール性脂肪肝 (NASH)である。NASHは炎症・壊死や線維化を伴い、30~50%の患者は肝硬変へと進展し、肝発癌の母地ともなり得る。肝細胞への中性脂肪の沈着が素地となり、さらに酸化ストレス、エンドトキシンなどの肝細胞障害要因が加わりNASHが発症するというtwo-hit theoryが提唱されている。しかし、現状ではNASH発生機序は十分には解明されておらず、確立された治療法もない。NASHの病態解明、治療法確立のためには病態を反映する動物モデルが重要であるが、肥満やインスリン抵抗性とともな肝炎症・線維化・発癌を呈する動物モデルはほとんど知られていない。そこで本研究では、高血圧、肥満、糖尿病を発症するSHRSP.Z-Lepfa/IzmDmcr(SHRSP-ZF)ラットを用いて、NASH関連肝発癌モデルを新規に作製した。さらに、緑茶カテキンの主要成分であるepigallocatechin gallate (EGCG)の肝腫瘍形成抑制効果を、肝前癌病変であるglutathione S-transferase placental form (GST-P)-positive (GST-P+) fociを指標に検討した。

【対象と方法】

7週齢の雄SHRSP-ZFラットと非肥満・正常血圧対照群であるWKY/Izm(WKY)ラットを、4群に割り振った。全群に高脂肪食と四塩化炭素(週2回腹腔内注射)を8週間投与し、第1群はWKYラットに水道水を、第2群はWKYラットに0.1%EGCG含有水を、第3群はSHRSP-ZFラットに水道水を、第4群はSHRSP-ZFラットに0.1%EGCG含有水を与え15週齢でサンプルを採取した。肝組織はホルマリン固定、パラフィン包埋後にHE染色、Azan染色、あるいは $\alpha$ -SMA, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 4-hydroxy-2'-nonenal (4-HNE), Mac-1およびGST-P免疫染色を行った。また、real-time RT-PCR法を用いてTNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, PAI-1, TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA, procollagen-1, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2, MMP-9, angiotensin-converting enzyme (ACE), angiotensin II type 1 receptor (AT-1R), glutathione peroxidaseおよびcatalaseのmRNA発現量を解析した。CYP2E1, JNKタンパク質発現量とJNKリン酸化の解析にはWestern Blot法を用いた。さらに、酸化ストレスの指標として肝組織中のヒドロキシプロリン, malondialdehyde (MDA)の定量を行った。血清AST, ALT, TNF- $\alpha$ , IL-6, インスリン, グルコース, アディポネクチン, レプチン, 総コレステロール, 中性脂肪, 遊離脂肪酸およびreactive oxygen metabolites (d-ROMs)濃度を測定し、各群間で比較検討した。

【結果】

第1群と比較して第3群では、体重、相対的肝・脂肪重量の増加を、また第4群では第3群に比べて体重の増加を認めた。第3群では第1群に比べて、血清AST, ALT値の上昇, インスリン, グルコース値の上昇, アディポネクチン値の低下, レプチン値の上昇, 総コレステロール, 中性脂肪および遊離脂肪酸値の上昇を認めた。これらの中では、遊離脂肪酸値のみ第4群で第3群と比べて有意に低下していた。HE染色, Mac-1免疫染色では、すべての群に脂肪蓄積, 小葉内炎症, 肝細胞の風船様変化およびマロリー小体を認めた。NASH activity scoreは第3群では第1群に比べて有意に高く、第4群では第3群よりも有意に低下していた。GST-P+ fociはすべての群で発生していたが、第3群では第1群に比べて有意に増加しており、第4群では第3群よりも有意に減少していた。Azan染色,  $\alpha$ -SMA免疫染色では陽性領域が第3群では第1群に比べて有意に増加しており、第4群では第3群に比べて有意に減少していた。また、肝組織中ヒドロキシプロリンおよび肝MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2,  $\alpha$ -SMA, procollagen-1, TGF- $\beta$ 1, PAI-1のmRNA, また血清アンジオテンシンII濃度および

び肝ACEとAT-1RのmRNA, さらには肝組織中TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6およびMCP-1のmRNAおよび, 血清d-ROMs値, 肝組織中MDA, 肝CYP2E1, JNK, p-JNKに関しても同様であった。一方, 肝組織中glutathione peroxidase, catalase mRNAは逆に第3群では第1群に比べて有意に減少しており, 第4群では第3群よりも有意に増加していた。

#### 【考察】

70%近くを占めていたC型肝炎ウイルス起因の肝細胞癌の減少とともに, NASHからの発癌が注目されている。有効な予防, 治療戦略を確立するためにもヒトのNASH病態を反映する動物モデルの作成が必要であった。RAS(レニン・アンジオテンシン系)は肝を含む様々な臓器で発現し, 炎症や酸化ストレスを惹起するとともに, 肝では線維化の進展に深く関与している。本研究で作成したSHRSP-ZFラットモデルにおいても, 肥満, 高血圧, 糖尿病, 脂質異常, アディポカイン異常, 慢性肝障害に加え, RAS(血清angiotensin IIの上昇, 大腸粘膜におけるACE, AT-1R mRNA発現の亢進)の活性化とともに, 炎症や酸化ストレスの誘導, 肝線維化の促進, 肝前癌病変が認められた。これらの結果は, RASの亢進がNASH関連肝発癌に重要な役割を担っていることを強く示唆している。また, EGCGはRASの抑制ならびに炎症や酸化ストレスの緩和を介して肝線維化を軽減することにより, 前癌病変の発生を阻害していることが明らかとなった。

#### 【結論】

高脂肪食と四塩化炭素投与を行ったSHRSP-ZFラットは, 肥満に伴う種々の異常を背景に肝前癌病変を多発したことより, 新規NASH関連肝発癌モデルとして有用と考えられた。また, 緑茶カテキンがNASHに起因する肝線維化および肝腫瘍形成を抑制する可能性が示唆された。