

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大脇 崇史
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1105 号
学位授与の日付 令和5年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Involvement of the liver-gut peripheral neural axis in nonalcoholic fatty liver disease pathologies via hepatic HTR2A.
(非アルコール性脂肪性肝疾患の病態に肝臓と腸を連関する自律神経経路が肝臓セロトニン受容体2Aを介して関与する)
論文審査委員 主査 教授 小野寺 理
副査 教授 竹林 浩秀
副査 准教授 土屋 淳紀

博士論文の要旨

【目的】

自律神経系は生体の恒常性維持や様々な病態に関与しており、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) もその一つである。申請者らはこれまでに、NAFLD の病態に自律神経経路を介した肝-脳-腸連関が関与し、セロトニン (5-HT) やグレリンといった消化管ホルモンがエフェクターとして、腸管タイトジャンクション、腸内細菌叢、下垂体ホルモンなどを介して、その病態進行に関与することを報告した。そこで本研究では、NAFLD における自律神経経路を介した小腸の 5-HT 産生の変化が、肝臓の病態にどのように作用するのか明らかにすることを目的として、肝臓の 5-HT 受容体 (HTR) の発現、脂質代謝回路の変化、血中 5-HT 濃度、さらに食欲の調節に関与する中枢の 5-HT との関係について検討した。

【方法】

NAFLD モデルとして、コリン欠乏・メチオニン減量食 (CDAA) 給餌マウス、高脂肪食 (HFD) 給餌マウス、摂食中枢に関与するメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) ノックアウトマウスを用いて、通常食給餌野生型マウスの対照群と比較検討した。

肝臓の経時的な病態変化を組織学的に、小腸の 5-HT 産生、肝臓の HTR 発現および脂質代謝関連遺伝子の変化を RT-PCR および免疫組織化学的に解析した。血中 5-HT の変化については、NAFLD モデルマウスと NAFLD 患者の血清を用いて ELISA で濃度測定を行った。また、摂食中枢に関与する 5-HT の動態について、脳内の 5-HT や HTR を免疫組織化学により評価した。さらに、これらのマウス群で、脂肪化が進む肝臓からの求心性交感神経経路を Capsaicin 塗布によって化学的に神経遮断した上で同様の解析を行い、NAFLD の病態における自律神経経路を介した 5-HT の関与について検証した。

【結果】

いずれの NAFLD モデルマウスにおいても、肝臓からの求心性交感神経経路を化学的に神経遮断すると、食事摂取量には大きな変化を認めないにもかかわらず、体重や肝重量の増加が抑制される傾向にあった。この結果

は、自律神経が肝臓への脂肪沈着など NAFLD の病態に関わる可能性を示唆する。実際に、CDAA や HFD の給餌マウスにおいて神経遮断すると肝組織中の脂肪沈着は抑制され、肝内の中性脂肪含有量の低下を認めた。そして、その傾向は神経遮断後 4 週でより顕著であり、これは申請者の既報の通り、カプサイシンによる神経遮断効果が同時期までに最も高いことと矛盾しない。

次に、求心性交感神経経路の神経遮断後の小腸の 5-HT 産生量、およびその産生律速酵素である Tph1 の遺伝子発現量を検討すると、神経遮断の効果が高い 4 週後に強く抑制されており、肝病態の進行抑制と小腸 5-HT の産生低下が相関していた。続いて、肝疾患の病態に関与する 5-HT の受容体 (HTR) として知られている Htr2a と Htr2b の発現を調べた。Htr2a の発現量は、小腸の 5-HT 産生低下と同様に、神経遮断の効果が高い 4 週後により強く抑制されていた。一方で、Htr2b の変化は NAFLD モデルマウスでは乏しかったが、部分肝切除マウスでは発現量が神経遮断によって明らかに低下を認め、食事誘発性の NAFLD の病態には Htr2a がより強く関与すると考えられた。さらに、肝細胞においてセロトニンシグナルの下流で働くと考えられる様々な脂質代謝関連遺伝子の発現量を神経遮断の有無で比較すると、肝臓 Htr2a の発現が低下する時期に、Acaca、Fasn および Gpat1 などの中性脂肪合成に関わる遺伝子発現が低下することが分かった。

NAFLD の病態における HTR2A の作用を確認するため、HTR2A のアンタゴニストであるサルボグレラートの経口投与を HFD 給餌マウスに行い、肝病態の変化を検証した。サルボグレラートの投与により、対照群と比較して、肝内の脂肪沈着や中性脂肪含有量の抑制、さらに肝細胞における中性脂肪合成関連遺伝子の発現低下を認め、神経遮断による効果と同様の結果が再現された。

血中 5-HT 濃度が病態を反映する可能性を検証するために、NAFLD モデルマウス、NAFLD 患者ともに、対照群と比較して血清 5-HT 濃度の低下を認めた。また、脂肪肝患者の CT で肝臓は低吸収となるが、肝臓 CT 値と血清 5-HT 濃度との間には正の相関を認め、すなわち肝臓の脂肪沈着が強いほど血清 5-HT 濃度は低いということが分かった。NAFLD では、小腸で産生された 5-HT が、肝臓に高発現した HTR2A により肝内に取り込まれて消費されるために、血清 5-HT 濃度の低下を反映しているものと考えられ、NAFLD の病態におけるバイオマーカーとなりうることが示唆された。

上記の結果を得て、5-HT を発現する臓器として、脳内の 5-HT 発現についても検討を加えた。高脂肪食を給餌させたマウスで増大傾向を示したが、小腸の 5-HT とは異なり、肝臓からの求心性交感神経経路を遮断しても低下しなかった。摂食中枢に関わる脳内の Htr2c も同様で、神経遮断によって低下しなかった。中枢の 5-HT は、自律神経系の求心性シグナルや末梢の 5-HT の動態とは相関せずに、病態の進行を抑制するため自律的に機能する可能性が考えられた。

【結論】

本研究により、肝臓からの求心性交感神経刺激が中枢神経系を介した自律神経系の活動により小腸の 5-HT 産生を亢進すること、分泌された 5-HT は血液を介して肝臓に運ばれて HTR2A に結合しうること、肝細胞における脂質代謝関連遺伝子発現を変化させることが明らかになった。つまり、NAFLD の進行に自律神経系を介した小腸の 5-HT 産生変化が肝臓の病態に影響するメカニズムが明らかになった。NAFLD に対する新規治療法の開発には、自律神経系シグナル伝達、小腸の 5-HT 産生および肝臓の HTR2A が標的となりうることが示唆された。

審査結果の要旨

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) には、小腸由来のセロトニン (5-HT) の関与が示されてきた。本研究では、この機序に、肝臓からの求心性交感神経経路が関与していることを検討した。NAFLD モデルとして、コリン欠乏・メチオニン減量食給餌マウス、高脂肪食給餌マウスを用いて、通常食給餌マウスの対照群と比較した。肝臓からの求心性交感神経経路はカプサイシン塗布によって遮断した。求心性交感神経経路を遮断する

と、肝組織の脂肪沈着は抑制され、肝内の中性脂肪含有量の低下を認めた。小腸の5-HT産生量、およびその産生律速酵素であるTph1の遺伝子発現量も抑制された。肝臓でのセロトニン受容体Htr2aの発現量も抑制された。さらに、中性脂肪合成に関わる、Acaca、FasnおよびGpat1遺伝子の発現は低下した。HTR2Aのアンタゴニストであるサルボグレラートにより、肝内の脂肪沈着や中性脂肪含有量の抑制、肝細胞における中性脂肪合成関連遺伝子の発現低下を認めた。NAFLDの病態における、肝臓からの求心性交感神経刺激の重要性を示し、この系が、新規治療法の標的となることを示した点に、学位論文としての価値を認める。