

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 名古屋 拓郎
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 918 号
学位授与の日付 令和2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 Ghrelin-insulin-like growth factor-1 axis is activated via autonomic neural circuits in the non-alcoholic fatty liver disease
(NASH モデルマウスにおける、自律神経を介したグレリンと IGF-1 との関与)

論文審査委員 主査 教授 小野寺 理
副査 教授 河内 裕
副査 講師 小林 隆

博士論文の要旨

【目的】NASH, NAFLD は様々な要因、さらにその複合的関与も示唆され、原因の特定に至らず、治療法の確立はなされていない。我々は、小児、成人ともに成長ホルモン(growth hormone, GH)分泌不全やGHに分泌促進される insulin like growth factor-1 (IGF-1)の低下でNAFLD, NASH が高率に合併すること、それらの補充により肝への脂肪沈着、線維化が改善することに着目した。本研究では、自律神経系によって制御されているGH分泌促進因子の Ghrelin が、NASH/NAFLD の病態に関与しうるか、自律神経を介した臓器間ネットワークの観点から検討することを目的とした。

【方法】NASH モデルとして、コリン欠乏・メチオニン減量 (CDA) 食給餌マウス、メラノコルチン4型受容体 (MC4R) ノックアウトマウスを、急性脂肪肝モデルとして部分肝切除マウス (PH) を対象とした。まず、迷走神経節からの AAV1-CAG-tdTomato の導入による肝臓から視床下部、延髄を経由して胃に向かう遠心性経路、胃内の神経とグレリンの関与及び胃粘膜からの AAVretro-CAG-EGFP の導入による求心性迷走神経経路、延髄孤束核を経由した視床下部、脳内へのシグナル伝達を可視化し、その伝達路を確認した。それぞれのモデルマウスの胃、脳内 Ghrelin 発現量の変化を免疫組織化学的に、胃からの求心性迷走神経を介した脳への伝達の活性化を延髄孤束核の c-fos の発現により検討し、脳内のシグナル伝達を介して下垂体から放出されるGHにより肝臓から分泌される IGF-1 の血中濃度をELISAにて解析した。さらに、上記の自律神経伝達路の臓器間ネットワークへの関与を検証するため、カプサイシン塗布、神経枝切断による自律神経伝達経路の遮断を行い、Ghrelin, c-fos, IGF-1 の変化を検証し、神経ネットワークの関与を検証した。

【結果】NAFLD / NASH 動物モデルで肝臓から胃グレリンへの神経信号の影響を調べるために、胃の細胞でのグレリン発現を免疫染色によって分析した。対照群 (CNT, Sham) の $2.76\% \pm 0.68\%$ の胃グレリンのレベルと比較して、MC4R KO マウスはグループ間で $10.5\% \pm 2.75\%$ と高値を示した。CDA 6週 (6W) マウス、12週 (12W) マウス、およびPHマウスも、 $4.71\% \pm 0.91\%$ 、 $4.63\% \pm 1.10\%$ 、 $3.34\% \pm 1.23$ と緩やかに増加させた。対照マウスのグレリンのレベルは、求心性内臓神経または求心性迷走神経遮断 (迷走神経切

断) では変化しなかったが、肝脂肪症のマウスでは、特に肝臓からの求心性内臓神経の遮断によってグレリン上昇の有意な抑制が観察された

肝脂肪症モデルにおいて、胃グレリン信号が求心性神経および脳幹の孤束核を介して視床下部に伝達される。神経信号の活性化を評価するために、マウスの脂肪肝のグループで弓状核の c-fos 発現を分析した。飢餓マウスの c-fos レベルを陽性対照として評価したところ 25.88%±2.65%が陽性になることがわかった。コントロールの 6.34%±1.26%のレベルと比較して、MC4R KO マウスはグループ間で最高の c-fos 発現を示した (30.79%±1.78%)。CDAA 6W マウス、CDAA 12W マウス、および PH 処理マウスも、それぞれ 15.85%±4.38%、19.50%±2.49%、および 15.08%±2.01%というわずかに高いレベルを示した。

さらに視床下部の c-fos 発現に対する神経遮断による影響を調べた。対照マウスの c-fos は、神経遮断による変化はなかった。肝脂肪症のマウスにおける c-fos の上昇は、特に求心性迷走神経の遮断後に有意に抑制された。MC4R KO マウスの c-fos は、求心性迷走神経遮断後、約 38%阻害された (陽性染色細胞の 18.85%±3.19% [P < 0.05])。CDAA 6W マウスの c-fos レベルも 30%の阻害 (11.23%±3.35% [P < 0.05]) を示したが、12W マウスの c-fos レベルは 21%および 33%の阻害 (15.45%±1.75) を示した。

グレリンは GH 分泌促進薬として知られており、GH のレベルとそれに続く肝臓からの IGF-1 分泌を増加させるため、血清中の IGF-1 の量を調べた。対照群 (CNT, Sham) で観察された 13.8±4.5 ng / ml の IGF-1 のレベルと比較して、MC4R KO マウスは高値 (21.7±3.8 ng / ml) で血清 IGF-1 の増加を示した。CDAA 6W マウス、CDAA 12W マウス、および PH マウスも IGF-1 の軽度の増加を示した (それぞれ 8.9±3.6 ng / ml、13.2±2.4 ng / ml、14.9±3.1 ng / ml)。

IGF-1 の上昇は、胃を介して視床下部神経経路に刺激される GH によって誘発される可能性があるため、胃からの求心性神経遮断の IGF-1 発現への影響を調べた。対照マウスの IGF-1 の濃度は変化を示さなかった。しかし、肝臓脂肪症のマウスでは神経遮断後、特に求心性迷走神経の遮断後、IGF-1 の増加は有意に抑制された。MC4R KO マウスの血清中の IGF-1 レベルは、神経遮断後に約 54%抑制された (10.0±3.8 ng / ml [P < 0.05])。CDAA 6W マウスは約 60% (それぞれ 2.9±3.1 ng / ml [P < 0.05] および 3.6±3.3 ng / ml) 抑制されたが、CDAA 12W マウスは 90%抑制された (0.7±0.6 ng / ml および 5.4±3.2 ng / ml、P < 0.05)。PH マウスは、c-fos 活性化の結果と一致して、IGF-1 濃度の有意な変化を示さなかった。

【結論】 NASH の病態に自律神経の臓器間ネットワークを介した Ghrelin-IGF-1 Axis の関与が示唆され、自律神経系を介する消化管ホルモンの動態の理解と制御が、病態進展予防に有用であると考えられる。

審査結果の要旨

申請者は、NASH/NAFLD の病態における、臓器間の自律神経ネットワークを介した GH 分泌促進因子 Ghrelin-IGF-1 Axis の関与を検討した。方法として、NASH/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、メラノコルチン 4 型受容体ノックアウトマウスを、急性脂肪肝モデルとして部分肝切除マウスを用いた。自律神経伝達経路の遮断は、カプサイシン塗布、神経枝切断により行った。Ghrelin, c-fos, IGF-1 の変化を免疫組織化学的、ELISA にて解析した。NASH/NAFLD モデルでは、胃 Ghrelin が高値を示した。Ghrelin のレベルは肝臓からの求心性内臓神経の遮断によって抑制された。弓状核の c-fos 発現は亢進した。c-fos 発現は、求心性迷走神経の遮断で抑制された。血清中の IGF-1 の量も増加した。血清中の IGF-1 は、胃からの求心性神経遮断によって抑制された。これらの結果から、NASH/NAFLD の病態に、臓器間の自律神経ネットワークを介した Ghrelin-IGF-1 Axis が関与することを示した。この点に学位論文としての価値を認める。