

令和元年6月19日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00810

研究課題名(和文) 肝類洞内皮細胞に発現する抑制性Fc受容体の食餌誘導性肝障害発症における役割

研究課題名(英文) Role of inhibitory Fc receptor expressed on hepatic sinusoidal endothelial cells in the development of diet-induced liver injury

研究代表者

石川 朋子 (Ishikawa, Tomoko)

お茶の水女子大学・ヒューマンライフイノベーション研究所・特任准教授

研究者番号：70212850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：食餌誘導性脂肪肝ラット、食餌誘導性非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウス、さらにヒトNASH症例の肝生検検体において、類洞内皮細胞のIIb型Fc受容体発現は、発症初期に一過性に増強し、病態の亢進に従って減少することを明らかにした。またIIb型Fc受容体の新規リガンド探索のため、マウス不死化類洞内皮細胞を用いたバイオイメージング解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、日本において近い将来、肝がんの主因になると予測されている。本研究では、モデル動物およびヒトNASH患者において、病態亢進と類洞内皮IIb型Fc受容体発現との関係を明らかにした。近年、類洞内皮細胞の形質変化は、肝炎から肝硬変、肝臓への進展に深くかかわると考えられている。本研究成果は、未だ詳細が明らかとなっていないNASH発症の機構解明や予防法・治療法開発の手掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the diet-induced fatty liver rats, diet-induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) model mice, and liver biopsy specimens of human NASH, we revealed that type IIb Fc receptor expression was transiently enhanced at the early stage and decreased with the progress of the pathological condition. In addition, in order to search for novel ligands for type IIb Fc receptors, bioimaging analysis using mouse immortalized liver endothelial cells was performed.

研究分野：機能形態学・栄養化学

キーワード：肝臓 類洞内皮細胞 NASH 細胞・組織 栄養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

IIb型Fc受容体(FcγRIIb)は、細胞内ドメインに抑制性モチーフ(ITIM)を有し、免疫抑制的に機能する受容体である(Nar Rev Immunol 2: 580, 2002; J Clin Immunol 25: 1, 2005)。主にT細胞を除いた白血球細胞表面に発現し、抗原-抗体複合体のIgGと結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込むことにより免疫抑制を惹起する。研究代表者らは、平成16-18年度基盤研究B「胎盤におけるIgG輸送の鍵となるIIb型Fc受容体を含む新しい細胞内小器官の解析」の助成を受け、凍結超薄切片を用いた超高解像力蛍光顕微鏡法、免疫電顕法を用いて、胎盤胎児血管内皮細胞内にFcγRIIbを含む新規小胞を発見し、IgGと共局在すること(J Immunol 175: 2331, 2005)、胎盤に発現するのはIIb2型アイソフォームであることを明らかにした(Placenta 28: 170, 2007)。さらに平成24-26年度基盤研究C「胎盤関門における胎盤特異的IIb型Fc受容体を含む新規小胞のIgG輸送機構の解明」の助成を受け、独自に開発した胎盤胎児血管内皮細胞の*in vitro*モデルを用いたバイオイメージング解析により、胎盤内皮細胞におけるFcγRIIb-小胞の発現と機能に關与するGTP結合タンパク質を明らかにした(Int. J. Mol. Med. 35: 1273, 2015)。

当初、血管内皮細胞でのFcγRIIb発現は、胎盤胎児血管内皮細胞に限局し、成人にはみられないとされていた。しかしラット肝類洞内皮細胞に特異的に発現するSE-1が、実はFcγRIIbであること(Hepatology 50: 920, 2009)、新たに樹立されたヒト肝類洞内皮細胞株TRP3にもFcγRIIbが発現すること(BBRC 450: 7, 2014)が報告された。胎盤毛細血管は、血液-胎盤関門の一部として物質交換を著しく制限するのに対し、肝類洞内皮細胞は、有窓性で物質交換の盛んな毛細血管である。形態的にも機能的にも対局する2種類の内皮細胞に、恒常的なFcγRIIb発現がみられることは大変興味深い。しかしながら肝類洞内皮細胞における機能は十分には解明されていない。一方で、虚血再灌流時の腎臓尿細管上皮にFcγRIIbとそのリガンドであるFGL2が一過性に検出され、腎組織の保護にはたらくとの報告があった(J Transl Med 12: 53, 2014)。このような背景から、肝類洞内皮細胞に発現するFcγRIIbは、食事によって誘発される肝障害の発症過程においても、免疫応答を緩徐にすることで肝障害の抑制に寄与し、肝組織に対して保護的に作用するものと予測される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、血管内皮細胞に発現するFcγRIIbの機能解明のため、特に栄養素代謝の要である肝臓の類洞内皮細胞における発現変動に着目し、食事によって誘発される肝障害との関連を明らかにすることである。

わが国では、肥満もアルコール多飲歴もないにもかかわらず自覚症状の無いまま脂肪肝を発症し、さらに肝炎を併発した非アルコール性脂肪肝炎(NASH)と診断される症例が増加している。NASH発症には、比較的長期間の食事・生活習慣が影響すると考えられる。NASHは肝硬変や肝癌へと進展する可能性があることから、早期診断法や悪化予防を含めた治療法の開発が望まれる。NASHなど食事により誘発される肝疾患発症過程の詳細を解明することは、生活習慣病予防、新規治療法の開発に寄与するものである。

## 3. 研究の方法

### (1) 脂肪肝誘導モデルにおける病態とFcγRIIb発現との関連

リジン制限食

高フルクトース・高脂肪食

Wistar系ラットに、リジンを含まないグルテン食、軽微な肝脂肪蓄積を誘導することが知られる高フルクトース・高脂肪食を1週間摂取させ、血中脂質・肝機能指標および肝組織の形態解析、生化学解析を行い、肝障害発症とFcγRIIb発現との関連を検討した。

### (2) NASH誘導モデルにおける病態とFcγRIIb発現との関連

C57BL/6雄性マウスに、NASH誘導食(コリン欠乏・メチオニン制限・高脂肪食)を1、3、6週間摂取させNASHを誘導し、肝組織の病理学的解析によりNASH発症を確認した。さらに血中脂質・肝機能指標および肝組織の形態解析、生化学解析を行い、肝障害発症とFcγRIIb発現との関連を検討した。

### (3) 新規機能の解明を目指したFcγRIIbリガンド探索

リガンド候補の探索

類洞内皮細胞に発現するFcγRIIbがIgG以外のリガンドを介した新規機能を有する可能性があることから、近年、FcγRIIbのリガンドとして報告のある数種類の分子について、NASH誘導過程における発現動態を解析した。

バイオイメージングによる受容体-リガンド局在の解析

類洞内皮細胞におけるFcγRIIbと有力なリガンド候補分子との関連を*in vitro*で解析した。当初は、初代培養の肝類洞内皮細胞を用いる計画だったが、マウス不死化類洞内皮細胞分与の機会を得たので、実験動物数の削減と置き換えの観点から、当該細胞株を用いることとした。類洞内皮細胞の培養系での特性として予測されることではあるが、不死化類洞内皮細胞は、FcγRIIb発現が低下していた。そこで遺伝子導入によりFcγRIIb-EGFP融合タンパク質を発現す

る系を構築し、リガンド候補分子との関連について、バイオイメージング解析をおこなった。

#### (4) ヒト NAFL/NASH 患者の臨床データと FcγRIIb 発現との関連

病理検査により NAFLD と診断され、同意を得た 26 症例について、肝生検試料における FcγRIIb 発現を酵素抗体法で検出、形態計測を行い、各種血中生化学検査値および病理診断スコア等との関連を解析した。この研究は、東京慈恵会医科大学およびお茶の水女子大学の各倫理委員会の承認を得て実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 脂肪肝誘導モデルにおける病態と FcγRIIb 発現との関連

##### リジン制限食

実験食を 1 週間与えた群では、標準食群に比べ、肝逸脱酵素である ALT および AST が有意に上昇し、肝機能の悪化が認められた。また肝組織観察では肝細胞に脂肪滴蓄積が認められた。この時、肝 FcγRIIb 遺伝子発現はリジン制限食群で有意に上昇したのに対し、炎症性サイトカイン、肝線維化マーカーは有意に抑制された。免疫組織化学的解析では、FcγRIIb は肝小葉全域に強く発現し、標準食群に比べ肝組織内に分布する IgG は少ないことが示された。一方、IgG 以外のリガンド候補分子の遺伝子発現に変動は認められなかった。これらのことから、肝細胞への脂肪蓄積の初期段階において、FcγRIIb は IgG クリアランスに關与する可能性が示唆された。

##### 高フルクトース・高脂肪食

高フルクトース・高脂肪食摂取群の肝臓では、門脈域の肝細胞に軽微な脂肪蓄積が認められた。FcγRIIb 遺伝子発現は標準食群に比べてやや高いものの、有意差はなかった。

#### (2) NASH 誘導モデルにおける病態と FcγRIIb 発現との関連

食餌誘導性肝障害モデルとして、コリン欠乏・メチオニン制限・高脂肪食によって NASH を誘導した(図 1)。NASH 誘導群では、肝実質細胞への大滴性脂肪沈着だけでなく、風船様変性や炎症性細胞集積、線維化亢進など、NASH 診断基準となる病理所見を満たすことを確認した。誘導食 6 週間で再現された NASH の進行度は、線維化ステージ 1 程度の初期段階のものであった。

免疫染色像より、FcγRIIb は肝類洞内皮細胞に特異的に発現しており(図 2) 形態計測の結果、NASH 発症過程に有意な発現増加がみられた。ここでは NASH 誘導食 6 週間までを示したが、さらに解析を進めた結果、FcγRIIb 発現は NASH 発症初期に一過性に増強し、その後減少することが明らかとなった。

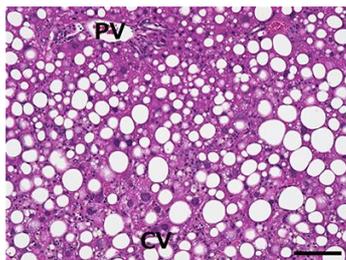


図 1. NASH 誘導食 6 週間の肝 HE 染色像 PV=門脈, CV=中心静脈, Bar= 100 μm

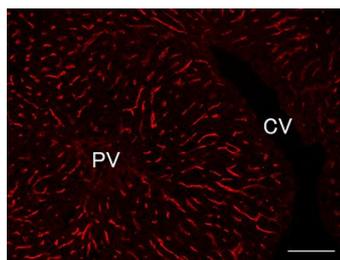
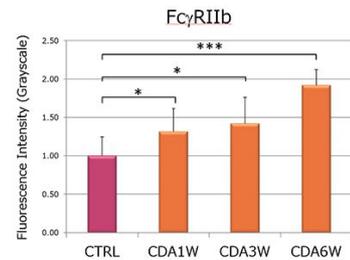


図 2. NASH を誘導した肝臓の FcγRIIb 蛍光免疫染色像と形態計測結果  
写真は NASH 誘導食 1 週間 (CDA1W) の肝臓  
PV=門脈, CV=中心静脈, Bar= 100 μm



#### (3) 新規機能の解明を目指した FcγRIIb リガンド探索

##### リガンド候補の探索

NASH 発症過程において、主なりガンドである IgG と共同在を示さない FcγRIIb シグナル(図 3 矢頭)がみられることから、近年報告されている新規リガンドを介した新たな機能の存在が予測された。これまでに報告されている新規リガンド候補分子のうち、FGL2 の遺伝子発現は NASH 誘導に伴って有意に上昇していた。FGL2 は FcγRIIb を介してアポトーシスを制御するとの報告があることから、本モデルにおけるアポトーシスを遺伝子レベルで検出したところ、FcγRIIb 発現と同様の挙動を示した。NASH 発症過程において、FcγRIIb は FGL2 をリガンドとしてアポトーシス制御にはたらく可能性が予測された。

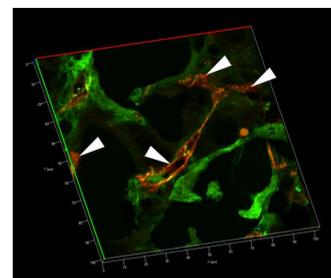


図 3. NASH 誘導食 6 週間の肝臓  
共焦点レーザー顕微鏡像  
赤: FcγRIIb; 緑: IgG

##### バイオイメージングによる受容体-リガンド局在の解析

マウス肝類洞内皮細胞株に FcγRIIb-EGFP 融合タンパク質を発現させたのち、Alexa-594 標識 FGL2 を培地添加したところ、FGL2 の類洞内皮細胞内への取り込みが観察された。しかしながら今回の解析では、FcγRIIb-EGFP と FGL2-Alexa の蛍光シグナルの共同在は認められなかった(図

4) 現時点では、FGL2 は、他のスカベンジャー受容体やピノサイトーシスを介して類洞内皮細胞へ取り込まれた可能性も考えられる。新規リガンドを介した機能解明については、さらなる検討が必要である。

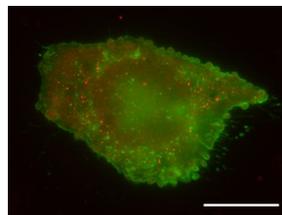


図4. 不死化類洞内皮細胞  
緑: FcγRIIb-EGFP; 赤: FGL2-Alexa594, Bar= 20 μm

#### (4) ヒト NAFL/NASH 患者の臨床データと FcγRIIb 発現との関連

ヒト NAFL/NASH 患者の肝生検試料における FcγRIIb 発現は、NASH 発症初期の線維化ステージ 1 で最も発現が高く、その後減少する傾向が認められた (図 5,6; PLOS One (2018) e0211543 一部改変)。さらに NASH 亢進や線維化の指標であるコラーゲン IV (IVCol) ヒアルロン酸 (Hyal) の血中濃度と負の相関を示すことが明らかとなった。IVCol はマンノース受容体の、Hyal はヒアルロン酸受容体のリガンドとして知られている。どちらも類洞内皮細胞のスカベンジャー受容体であり、FcγRIIb 発現は、複数のスカベンジャー機能と連動することが示された。

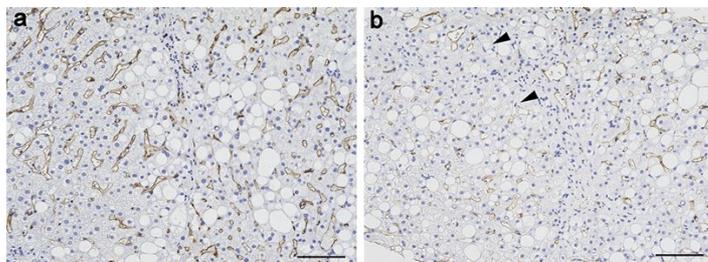


図5. ヒト NASH 肝生検の FcγRIIb 免疫染色像  
a: NAS スコア 2; b: NAS スコア 8, Bar= 100 μm

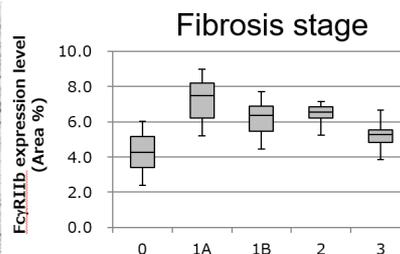


図6. ヒト NASH 肝生検における FcγRIIb 発現と線維化スコア

本研究により、食事により誘発される肝障害において、肝類洞内皮細胞の IIb 型 Fc 受容体発現は、発症初期に一過性に増強すること、病態の亢進に伴い内皮細胞の複数の受容体を介したスカベンジャー機能と連動することが明らかとなった。受容体発現などの類洞内皮細胞の形質変化に関する知見は、NAFL/NASH における機能不全や病態亢進の詳細を解明する手掛かりとなる。近年、類洞内皮細胞の形質変化が、肝炎の亢進と改善を規定するとの報告があった。本研究の成果は、肝障害の亢進と類洞内皮細胞の形質変化との関連を示すひとつの所見である。引き続き、NAFL/NASH の予防・治療法の開発に寄与することを目的とし、NASH 発症過程における間質微小環境と内皮細胞の形質変化について詳細な検討を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Ishikawa Tomoko, Yokoyama Hiroshi, Matsuura Tomokazu, Fujiwara Yoko. Fc gamma RIIb expression levels in human liver sinusoidal endothelial cells during progression of non-alcoholic fatty liver disease. PLOS One, e0211543, 2018、査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0211543

[学会発表](計 14 件)

石川朋子、ヒト NASH 病態と肝類洞内皮細胞 FcγR2 発現との関連、第 32 回肝類洞壁細胞研究会学術集会、2018

石川朋子、非アルコール性脂肪肝炎発症初期の間質微小環境の解析、第 59 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会、2018

石川朋子、非アルコール性脂肪肝炎発症過程におけるビタミン E 摂取効果の検討、日本ビタミン学会第 70 回大会、2018

石川朋子、非アルコール性脂肪肝炎の発症過程における FGL2-FcRIIb シグナルの役割、第 72 回日本栄養食糧学会大会、2018

石川朋子、テネイシン C 欠損が食事誘導性非アルコール性脂肪肝炎発症期の線維化に与える影響、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018

乃一純、食餌誘発性 NASH 形成時におけるトコトリエノールの影響、第 29 回ビタミン E 研究会、2018

石川朋子、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)発症過程の肝類洞内皮細胞に発現する CD32 b の役割、第 58 回日本組織細胞化学学会総会・学術集会、2017

乃一純、食餌誘発性 NASH からの回復過程におけるビタミン E の影響、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017

石川朋子、非アルコール性脂肪肝炎の進行過程における肝類洞内皮細胞 Fc gamma RIIb のリガンド探索、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017

石川朋子、テネイシン C ノックアウトマウスにおける食餌誘導性非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の病態解析、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017

乃一純、食餌誘発性 NASH からの回復過程におけるビタミン E の影響、第 28 回ビタミン E 研究会、2017

石川朋子、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)発症過程における CD32b 発現変動の免疫組織化学的解析、第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2016

石川朋子、食餌誘導性肝障害の発症過程における抑制型 Fcγ 受容体の発現動態、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016

石川朋子、グルテン食摂取ラットにおける抑制性 Fcγ 受容体の発現動態、第 62 回日本栄養改善学会学術総会、2015

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-w.cf.ocha.ac.jp/ihli/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：藤原 葉子

ローマ字氏名：(FUJIWARA, Yoko)

所属研究機関名：お茶の水女子大学

部局名：基幹研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：50293105

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。