

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08732

研究課題名(和文) 新規NASHモデルを用いた細胞死を起点とする組織線維化の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

伊藤 美智子 (ITO, Michiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ジョイントリサーチ講座准教授

研究者番号：00581860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎では細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲む構造(hepatic crown-like structure (hCLS))が多数認められる。本研究ではhCLSは常在性マクロファージが中心となって形成され、線維化の起点となることを明らかにした。またhCLSを構成するCD11c陽性マクロファージは他の散在性マクロファージとは異なり、特徴的な遺伝子発現プロファイルを有する亜集団であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症を基盤とする様々な生活習慣病の病態形成においてマクロファージが重要な役割を果たすことが知られているが、マクロファージは非常に多様性の高い細胞集団であり、最近では病態形成に直接的な役割を果たす「疾患特異的マクロファージ」と理解が求められている。NASHの肝臓におけるCD11c陽性マクロファージは病理学的構造に基づく疾患特異的マクロファージと考えられ、その活性化機構および病態生理的意義の解明により、新規バイオマーカーや治療標的の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have reported a histological structure, termed hepatic crown-like structure (hCLS), in which CD11c-positive macrophages surround dead hepatocytes, a prominent feature of NASH using murine model of non-alcoholic steatohepatitis. In this study, we demonstrated that hCLS-constituting macrophages could be a novel macrophage subset that drives hepatocyte death-triggered liver fibrosis. We also showed that resident macrophages are a major cellular source of CD11c-positive macrophages constituting hCLS, which exhibited gene expression profiles distinct from CD11c-negative macrophages scattered in the liver. Moreover, depletion of CD11c-positive macrophages abolished hCLS formation and fibrogenesis in NASH. This study sheds light on the role of resident macrophages, in addition to recruited macrophages, in the pathogenesis of NASH.

研究分野：代謝学

キーワード：慢性炎症 マクロファージ crown-like structure

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

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの基盤病態として全身の軽度の慢性炎症が注目されており、持続的なストレスによって実質細胞（脂肪細胞や肝細胞など）と間質細胞（マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞など）の複雑な相互作用の結果、ダイナミックな形態学的変化（組織リモデリング）から組織機能不全に至る。これまでに、肥満の脂肪組織における慢性炎症が精力的に研究されており、特にマクロファージの病態生理的意義が注目されている。肥満の脂肪組織には CD11c 陽性活性化型 M1 マクロファージの浸潤が増加し、脂肪細胞との相互作用によってアディポサイトカイン産生調節障害を引き起こす。特に細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲む構造は Crown-like structure (CLS) と呼ばれ、脂肪組織 CLS 数はインスリン抵抗性や異所性脂肪蓄積、血管機能障害との相関が指摘されており、肥満脂肪組織における慢性炎症の中心になっていることが示唆される。

申請者は摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) を欠損するマウスが、高脂肪食負荷によりヒト肥満症患者と同様の表現型に加え、脂肪肝から NASH、さらに肝細胞癌を発症することを独自に明らかにした。さらに、NASH を発症した MC4R-KO マウスの肝臓、およびヒト NASH において、脂肪を蓄積し、細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲む像が多数認められ (hepatic CLS: hCLS)、hCLS 数は肝線維化面積と正の相関を示すことを見出した。hCLS は脂肪組織 CLS と同様に、細胞死を起点として活性化したマクロファージが、線維芽細胞との相互作用により組織線維化を促進する「場」と捉えられ、肝臓における慢性炎症が組織リモデリングに至る分子機構の理解と、新たな治療標的の探索につながると考えられる。

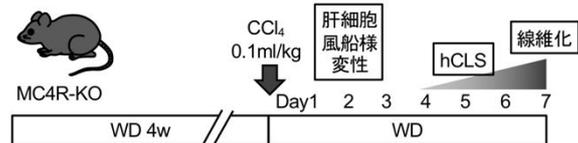
2. 研究の目的

マクロファージは機能的に不均一な細胞集団であることが知られ、肝線維化発症に重要なサブセットは不明である。申請者はメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) 欠損マウスに対する 20 週間の高脂肪食負荷モデル (慢性モデル) に加えて、短期間に hCLS 形成、肝線維化を観察可能な誘導性 NASH モデルを確立している。これらのモデルを用いて、hCLS という病態に直結する構造を形作るマクロファージの動態、および機能的意義を明らかにすることで、肥満を背景として単純性脂肪肝から肝線維化にいたる分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) NASH マウスモデルの作成

MC4R 欠損マウスに対して高脂肪食負荷を 20 週間負荷することで NASH を誘導する (慢性モデル)。誘導性モデルでは MC4R 欠損マウスに対する 4 週間の高脂肪食負荷によって単純性脂肪肝を誘導し、四塩化炭素 0.01ml/kg を単回投与によって、肝細胞死・hCLS 形成・肝線維化が 1 週間の経過で観察される (図 1)。



(図1) 誘導性NASHモデル

(2) 骨髄移植実験

8 週齢の雄性 MC4R-KO に 7.5Gy の γ 線を照射し、GFP-Tg マウスあるいは CD169 プロモーター下にジフテリア毒素受容体を発現するマウス (CD169-DTR) の骨髄細胞を尾静脈より投与した。4 週間の回復期間をおき、骨髄が 90%以上置換されていることを確認後に、高脂肪食負荷を開始し、誘導性モデルを作成した。DTR マウスの骨髄移植では、四塩化炭素投与 5 日後の hCLS が形成される時期にそれぞれジフテリア毒素を投与し、マクロファージを消去して肝線維化に対する影響を検討した。

(3) 肝非実質細胞 (NPC) 分画の FACS 解析およびソーティング

マウスを麻酔下に腹部を切開し、門脈より PBS にて灌流後に肝臓を採取し、gentleMACS (Miltenyi) を用いて肝臓を分散した。30% Percoll にて debris を除去し、溶血処理を行った後に得られた NPC 分画を用いて抗体処理を行った。7-AAD 陽性の死細胞、doublet を除去し、CD45 陽性、Ly6G 陰性分画において F4/80 と CD11b 発現レベルに応じて常在性マクロファージ (F4/80 高発現)、浸潤性マクロファージ (CD11b 高発現) を識別した。常在性マクロファージは CD11c の発現レベルに基づき、ソーティングにて採取し、マイクロアレイ解析を行った。

(4) PKH26 による貪食細胞ラベリング

蛍光色素 PKH26 (Sigma) を尾静脈注射によって貪食細胞に取り込ませた後に誘導性モデルを作成し、PKH26 陽性細胞の追跡実験を行った。

(5) 組織学的解析

肝臓サンプルを 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成後、Sirius red 染色、F4/80 染色、TUNEL 染色を行った。線維化の程度は画像解析ソフト Winroof (Mitani Co.) を用いて Sirius red 陽性面積を測定し、hCLS 数は目視にてカウントし、単位 mm² 当たり換算した。凍結切片を用いて F4/80 および CD11c、Clec4f 免疫染色を行った。

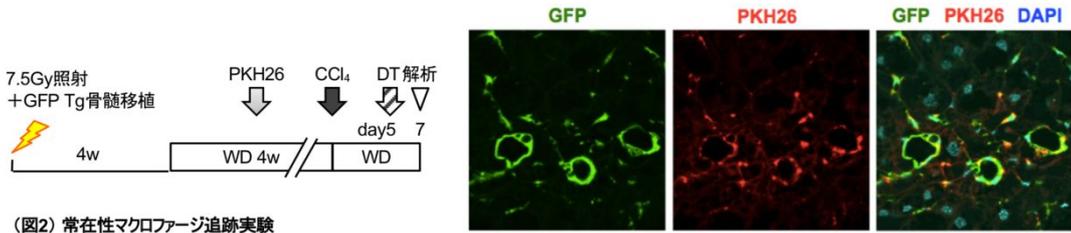
(6)遺伝子発現解析

肝臓より抽出した RNA から cDNA を合成し、real-time PCR 法により mRNA レベルを測定した。内因性コントロールとして 36B4 を使用した。

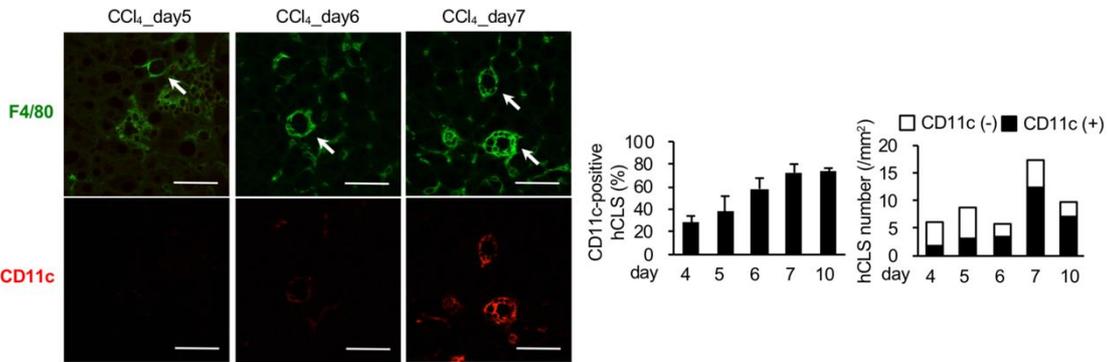
4. 研究成果

(1)hCLS 構成マクロファージの動態

肝臓には常在性マクロファージ(クッパー細胞)と浸潤性マクロファージが存在し、NASH の肝臓ではケモカイン MCP-1/CCR2 系を介して浸潤性マクロファージが増加するが、CCR2 欠損によって浸潤性マクロファージが減少しても hCLS 形成や肝線維化には影響がないことを確認している。そこで、誘導性モデルにおいて常在性マクロファージを蛍光標識し、hCLS 形成における寄与を検討した。GFP-Tg マウスの骨髄移植し、血球系を GFP にて可視化し、高脂肪食負荷 2 週目に PKH26 を投与してマクロファージをラベリングした。高脂肪食負荷 4 週目の時点で常在性マクロファージのみが PKH26 陽性であることを確認し、四塩化炭素を投与 7 日後に解析したところ PKH26 陽性 hCLS が観察された(図 2)。また、誘導性モデルにおいて hCLS の CD11c 陽性率が増加していくことから、死細胞との相互作用によってマクロファージの形質が変化することが示唆された(図 3)。



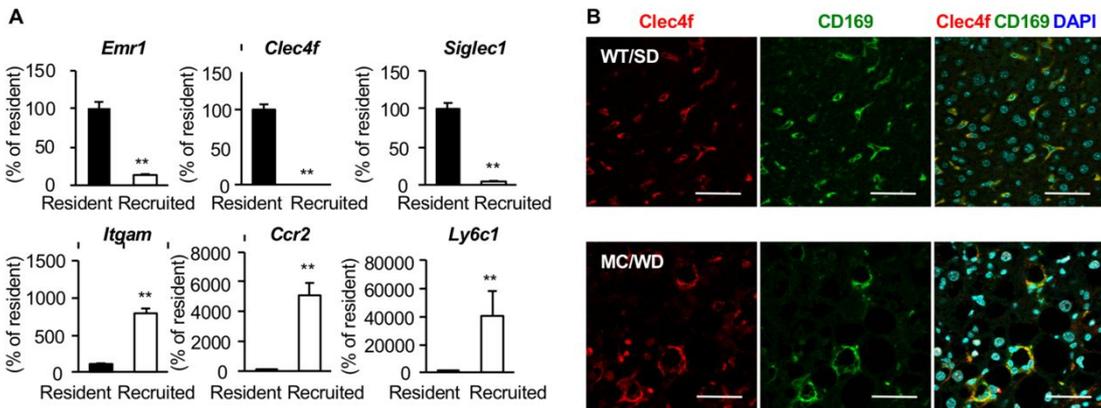
(図2) 常在性マクロファージ追跡実験



(図3) hCLS数とCD11c陽性率の変化

(2)常在性マクロファージマーカーの検討

肝臓より常在性・浸潤性マクロファージをそれぞれ分離し、遺伝子発現解析を行った。常在性マクロファージではF4/80や常在性マクロファージマーカーとして知られているClec4fの他に、CD169が高発現し、浸潤性マクロファージではCD11b, CCR2, Ly6Cの発現が高かった(図4A)。組織学的解析においてhCLSはClec4f, CD169陽性であった(図4B)。



(図4) hCLSにおける常在性マクロファージマーカーの発現

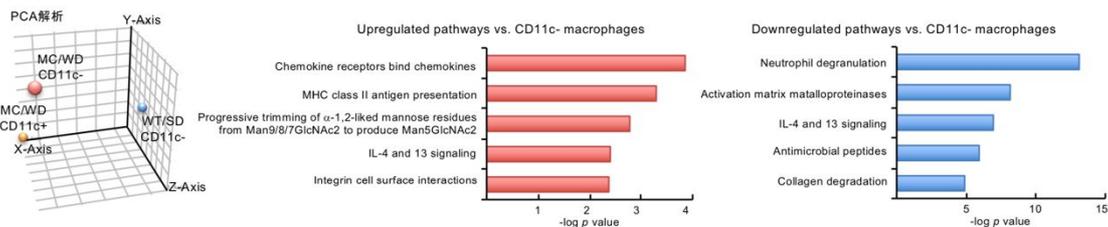
(3)常在性マクロファージ消去実験

CD169-DTR の骨髄を移植した MC4R-KO マウスを用いて短期モデルを作成した。hCLS が出現する

時期（四塩化炭素投与 5 日後）にジフテリア毒素を投与し、その 2 日後に解析した。F4/80 染色にて散在性マクロファージは残存していたが、hCLS は消失しており、組織学的に線維化面積の抑制も確認された。

(4)マクロファージを用いたマイクロアレイ解析

野生型マウスの正常肝および MC4R 欠損マウスの NASH 肝から CD11c の発現レベルに応じてマクロファージを採取し、マイクロアレイ解析を行った。NASH 肝の CD11c 陽性マクロファージは CD11c 陰性マクロファージや正常肝のマクロファージ (CD11c 陰性) と比較して特異的な遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなった (図 5)。



(図5) CD11c陽性マクロファージの遺伝子発現プロファイル

以上より、hCLS は常在性マクロファージが中心となって形成され、死細胞との相互作用によって形質変化すること、機能的に線維化発症に重要であることが示された。CD11c 陽性 hCLS はヒト NASH にも認められ、このような疾患特異的なマクロファージの本態を明らかにすることで、これまで不明であった NASH・肝細胞癌の発症機構が明らかになることが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Goto T*, Itoh M*, Suganami T, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, Asakawa M, Yoneyama T, Kai T, Ogawa Y. Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** 8: 8157, 2018. *Equally contributed. 査読有
2. Chiyonobu N, Shimada S, Akiyama Y, Mogushi K, Itoh M, Akahoshi K, Matsumura S, Ogawa K, Ono H, Mitsunori Y, Ban D, Kudo A, Arii S, Suganami T, Yamaoka S, Ogawa Y, Tanabe M, Tanaka S. Fatty acid binding protein 4 overexpression in intratumoral hepatic stellate cells within hepatocellular carcinoma with metabolic risk factors. **Am. J. Pathol.** 188: 1213-1224, 2018. doi: 10.1016/j.ajpath.2018.01.012. 査読有
3. Shiba K, Tsuchiya K, Komiya C, Miyachi Y, Mori K, Shimazu N, Yamaguchi S, Ogasawara N, Katoh M, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y. Canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, attenuates the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of human NASH. **Sci. Rep.** 8: 2362, 2018. 査読有
4. Itoh M, Suganami T, Kato H, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, Goto T, Asakawa M, Hidaka I, Sakugawa H, Ohnishi K, Komohara K, Asano K, Sakaida I, Tanaka M, Ogawa Y. CD11c-positive resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. **JCI Insight** 2: e92902, 2017. doi: 10.1172/jci.insight.92902 査読有
5. Komiya C, Tanaka M, Tsuchiya K, Shimazu N, Mori K, Furuue S, Miyachi Y, Shiba K, Yamaguchi S, Ikeda K, Ochi K, Nakabayashi K, Hata KI, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y. Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** 7: 44754, 2017. doi: 10.1038/srep44754 査読有

[学会発表](計 13 件)

1. Michiko Itoh: CD11c-positive macrophages drive obesity-induced liver fibrosis in a murine model of NASH (シンポジウム) 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018/12/11
2. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏: 死細胞を起点とする NASH 発症機構の解明 -新規マウスモデルの確立を通して- (シンポジウム) 第 39 回日本肥満学会、神戸、2018/10/7
3. 伊藤美智子、菅波孝祥、加藤秀昭、金井紗綾香、白川伊吹、酒井建、後藤俊宏、浅川雅博、小川佳宏: 死細胞とマクロファージの相互作用に注目した NASH 発症機構の解明 (口演) 第 61 回日本糖尿病学会学術集会、東京、2018/5/25
4. 伊藤美智子、菅波孝祥、加藤秀昭、金井紗綾香、白川伊吹、酒井建、後藤俊宏、浅川雅博、小川佳宏: NASH 発症に重要なマクロファージサブセットの同定 (口演) 第 91 回日本内分泌学会学術集会、宮崎、2018/4/26
5. Michiko Itoh, Takayoshi Suganami, Sayaka Kanai, Ibuki Shirakawa, Takeru Sakai,

- Toshihiro Goto, Masahiro Asakawa, Isao Hidaka, Isao Sakaida, Yoshihiro Ogawa. Hepatocyte death-triggered CD11c-positive macrophage accumulation induces liver fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. (Poster) AASLD The Liver Meeting 2017, Washington DC, USA 2017/10/23
6. 伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、白川伊吹、酒井健、後藤俊宏、浅川雅博、日高勲、坂井田功、小川佳宏：NASH 発症過程におけるマクロファージの形質変化-hepatic crown-like structure に注目して- (口演) 第 38 回日本肥満学会、大阪、2017/10/7
 7. 伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、白川伊吹、小川佳宏：非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成における hepatic crown-like structure の病態生理的意義 (ポスター) 第 90 回日本内分泌学会学術集会、京都、2017/4/22
 8. 伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、白川伊吹、小川佳宏：細胞死を起点とするマクロファージの形質変化と非アルコール性脂肪性肝炎 (ポスター) 第 54 回日本臨床分子医学会、東京、2017/4/15
 9. 伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、白川伊吹、小川佳宏：細胞死を起点とする非アルコール性脂肪性肝炎発症機構の解明(口演)第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会、横浜、2017/2/11
 10. Toshihiro Goto, Michiko Itoh, Sayaka Kanai, Takayoshi Suganami, Yoshihiro Ogawa. Obeticholic acid, a synthetic FXR agonist, prevents hepatic inflammation and fibrosis in a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. (Poster) American Association for the Study of Liver Diseases Annual Meeting, Boston, MA, USA 2016/11/11-15
 11. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏：新しいマウスモデルを用いた NASH 発症機構の解明と医学応用 (シンポジウム) 第 37 回日本肥満学会、東京、2016/10/7(-8)
 12. 後藤俊宏、伊藤美智子、金井紗綾香、菅波孝祥、小川佳宏：NASH モデルマウスを用いた FXR 作動薬オベチコール酸の治療効果の検討(ポスター)第 37 回日本肥満学会、東京、2016/10/8
 13. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏：非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成における hepatic crown-like structure の病態生理的意義(ポスター)第 37 回日本炎症・再生医学会、京都、2016/6/16

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学プレスリリース (2017/11/17)

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20171116_1.pdf

日本経済新聞電子版 (2017/11/16)

https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP463425_V11C17A1000000/

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：菅波 孝祥

ローマ字氏名：SUGANAMI, takayoshi

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。