

令和元年5月30日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09787

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪肝炎の進展における肝内マクロファージ増殖の病態生理学的意義

研究課題名(英文) Roles of macrophage proliferation in the progression of nonalcoholic fatty liver disease.

研究代表者

瀬ノ口 隆文 (Senokuchi, Takafumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：00530320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スカベンジャー受容体プロモーター制御下にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p27kip発現を誘導したM 特異的増殖抑制マウス(Tg群)を作成し、高脂肪食を負荷した。対象群と比しTg群では耐糖能が改善し、グルコースクランプでは、全身の糖利用率と骨格筋の糖取り込み率はTg群で有意に上昇し、肝臓での糖産生は有意に低下した。肝のインスリンシグナルはTg群で有意に増強した。肝臓の増殖M はTg群で有意に減少し、肝の中性脂肪含有量、線維化面積は、Tg群で有意に減少した。M 増殖が肝および全身のインスリン抵抗性の発現やNAFLDの発症・進展に関与し、M 増殖制御がこれらの治療法開発に繋がる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓におけるNAFLD/NASHの病態を慢性炎症性疾患としてとらえ、マクロファージ特異的増殖抑制マウスを用いた検討により肝内マクロファージ増殖のNAFLD/NASHにおける病態生理学的意義を明らかにした。これらの結果から動脈硬化、糖尿病、NAFLD/NASHのマクロファージ増殖を基盤とした共通の進展機序が示された。また、マクロファージ増殖の制御が、肝臓の炎症、繊維化のみならず、メタボリックシンドロームおよびその合併症の抑制を目指した治療の標的となり得ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To verify the direct evidence of involvement of local macrophage proliferation for Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and total glucose tolerance we have generated transgenic mice whose macrophage proliferation is specifically suppressed by inducing the expression of p27kip (mac-p27Tg). The High-Fat Diet-fed mac-p27Tg showed improved insulin sensitivity compared with the controls. The triglyceride content in the liver was significantly decreased in mac-p27Tg mice. Hepatic steatosis was formed less by macrophage growth inhibition. The inhibition of local macrophage growth resulted in the marked suppression of obesity-associated liver insulin resistance by ameliorating excess inflammatory responses in these tissues. These results suggested that the local macrophage proliferation could be one of the major pathophysiological features in the dietary-induced insulin resistance, and possibly be one of the therapeutic targets for chronic inflammation diseases.

研究分野：糖尿病合併症、メタボリックシンドローム

キーワード：NASH/NAFLD マクロファージ メタボリックシンドローム

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

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、明らかな飲酒歴がないにも関わらず引き起こされる大脂肪沈着を特徴とする肝障害と定義される。NAFLD は、わが国の肥満人口の増加に伴い急増し、成人健診受診者の 20 ~ 40% が NAFLD を有すると報告されている。また、NAFLD のうち 10 ~ 20% は肝硬変や肝細胞癌 (HCC) へ進行の可能性がある NASH であり、今後 NASH は肝硬変、HCC の原因肝疾患として最も高頻度となると予測されている。

研究の学術的背景

NAFLD は、明らかな飲酒歴がないにも関わらず引き起こされる大脂肪沈着を特徴とする肝障害と定義される。NAFLD は、わが国の肥満人口の増加に伴い急増し、成人健診受診者の 20 ~ 40% が NAFLD を有すると報告されている。また、NAFLD のうち 10 ~ 20% は肝硬変や肝細胞癌 (HCC) へ進行の可能性がある NASH であり、今後 NASH は肝硬変、HCC の原因肝疾患として最も高頻度となると予測されている。

1) NASH 発症・進展へのマクロファージの関与

NASH モデルマウスにおいて、Kupffer 細胞の除去により NASH の進行が抑制されること (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.302:G1310-21,2012) から NASH の発症・進展において肝臓のマクロファージが重要な役割を果たすことが示唆されている。

2) 組織マクロファージ増殖と慢性炎症性疾患

申請者は肥満・糖尿病、動脈硬化の病態を慢性炎症性疾患としてとらえ、これらの疾患の病態における組織浸潤マクロファージの関与を検討してきた。スカベンジャー受容体のプロモーター/エンハンサー (pAL) 制御下に p27kip を発現するマクロファージ特異的増殖抑制マウスを作製し、マクロファージ増殖抑制による、動脈硬化の発症・進展の抑制とそのメカニズムを明らかにした。また、ob/ob マウスの肝臓においてはマクロファージが増殖し、マクロファージ増殖抑制により肝脂肪蓄積が有意に減少することから、脂肪肝形成に肝内マクロファージ増殖が関与する可能性を見出している。しかし、これらの肥満・糖尿病モデルマウスでは、脂肪肝の形成は誘導されるものの、NASH への進行は認めず、NASH の発症、進展に対するマクロファージ増殖の関与は明らかにされていない。

2. 研究の目的

NAFLD は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型と捉えられる。肝細胞の脂肪蓄積に加えエンドトキシン、炎症、酸化ストレスなどの刺激により肝細胞障害、線維化、肝細胞癌へと進行する非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH) に至る過程に肝内マクロファージの関与が示唆される。しかし、NASH の発症・進展機序には未だ不明な点が多く、その病態解明は有効な治療法の開発につながる重要な研究課題である。本研究は NASH の発症・進展におけるマクロファージの関与を肝内マクロファージ増殖に着目し、その病態生理学的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マクロファージ増殖抑制による NASH 発症・進展への影響の検討

スカベンジャー受容体遺伝子のプロモーター制御下にサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p27kip を発現し、マクロファージ特異的に増殖を抑制するトランスジェニックマウス (mac-p27Tg) を作成した。10 週齢の Wild type マウス (WT 群) と mac-p27Tg マウス (Tg 群) に対して、10 週間、高脂肪食を負荷した。15 週齢において ipGTT、18 週齢において ipITT を施行した。20 週齢において高インスリン血症正常血糖グルコースクランプを施行した。精巣周囲脂肪及び肝臓を採取し、脂肪細胞及び肝臓の組織学的変化の評価を行った。

4. 研究成果

ipGTT では、WT 群と比し Tg 群で負荷後 60、90、120 分の血糖値は有意に低値であった。負荷前、負荷後 15 分、30 分のインスリン値には有意差はなかった。ipITT では、WT 群と比し Tg 群で負荷後 60、90、120 分の血糖値は有意に低値であった (図 1)。高インスリン血症正常血糖グルコースクランプでは、全身の糖利用率は WT 群と比し Tg 群で有意に上昇し、肝臓での糖産生率は Tg 群で有意に低下、骨格筋の糖取り込み率は Tg 群で上昇傾向であった。精巣周囲脂肪において、増殖マクロファージは WT 群と比し Tg 群で減少し、脂肪細胞の増大や Crown-like structure 形成は、Tg 群で有意に抑制された。肝臓において、増殖マクロファージは WT 群と比し Tg 群で減少した。中性脂肪含有量は Tg 群にて有意に減少した。肝線維化面積は Tg 群にて有意に縮小した (図 2)。

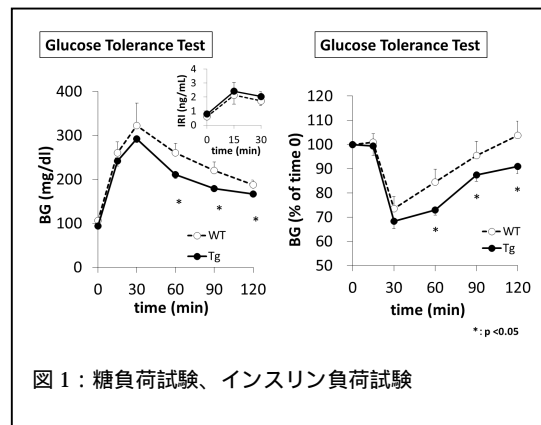
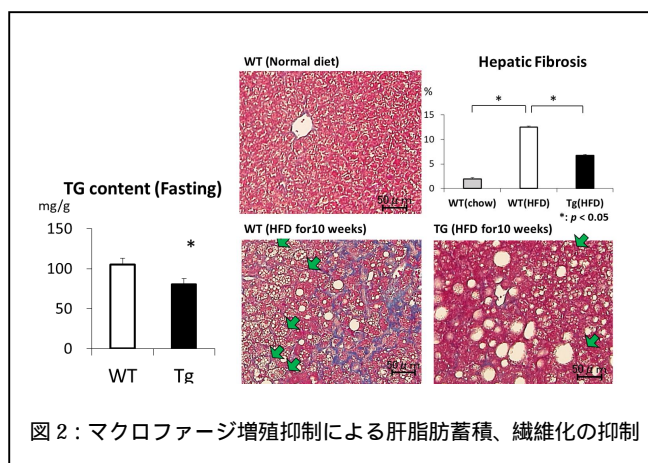


図 1: 糖負荷試験、インスリン負荷試験

肝臓における NAFLD/NASH の病態を慢性炎症性疾患としてとらえ、マクロファージ特異的増殖抑制マウスを用いた検討により肝内マクロファージ増殖の NAFLD/NASH における病態生理学的意義を明らかにした。これらの結果から動脈硬化、糖尿病、NAFLD/NASH のマクロファージ増殖を基盤とした共通の進展機序が示された。また、マクロファージ増殖の制御が、肝臓の炎症、繊維化のみならず、メタボリックシンドロームおよびその合併症の抑制を目指した治療の標的となり得ることを明らかにした。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Ono K, Igata M, Kondo T, Kitano S, Takaki Y, Hanatani S, Sakaguchi M, Goto R, **Senokuchi T**, Kawashima J, Furukawa N, Motoshima H, Araki E: Identification of microRNA that represses IRS-1 expression in liver. PLoS One 13:e0191553, 2018.

Yamada S, **Senokuchi T**, **Matsumura T**, Morita Y, Ishii N, Fukuda K, Murakami S, Nishida S, Kawasaki S, Motoshima H, Furukawa N, Komohara Y, Fujiwara Y, Koga T, Yamagata K, Takeya M, Araki E: Inhibition of local macrophage growth ameliorates focal inflammation and suppresses atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 38(5):994-1006, 2018.

Sakakida K, Wei FY, **Senokuchi T**, Shimoda S, Kakuma T, Araki E, Tomizawa K: The eperisone for diabetes with impaired tRNA(EDIT) study group: Study design of a phase II clinical trial to assess the efficacy and safety of eperisone in Japanese type 2 diabetes patients with risk and non-risk alleles of CDKAL1. Acta Med Okayama 72(4):423-426, 2018.

Hanatani S, Motoshima H, Takaki Y, Kawasaki S, Igata M, **Matsumura T**, Kondo T, **Senokuchi T**, Ishii N, Kawashima J, Kukidome D, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Acetate alters expression of genes involved in beige adipogenesis in 3T3-L1 cells and obese KK-Ay mice. J Clin Biochem Nutr 59(3):207-214, 2016.

Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, Yoshinaga T, Kajihara N, Sonoda K, **Senokuchi T**, Motoshima H, **Matsumura T**, Araki E: Hyperglycemia induces cellular hypoxia through production of mitochondrial ROS followed by suppression of aquaporin-1. PLoS One 11(7):e0158619, 2016.

〔学会発表〕(計 29 件)

Matsumura T, Murakami-Nishida S, **Senokuchi T**, Ishii N, Nishida S, Kondo T, Motoshima H, Araki E. Empagliflozin suppresses atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E deficient mice by inhibiting macrophage activation. 54th EASD Annual Meeting, 2018/10/1-2018/10/5, Messe Berlin, Berlin, Germany, Oral.

Murakami S, **Matsumura T**, **Senokuchi T**, Ishii N, Fukuda K, Nishida S, Kondo T, Araki E: Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. The 77th ADA scientific meeting, 2017/6/9-2017/6/13, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, Oral

Matsumura T, Murakami S, **Senokuchi T**, Ishii N, Fukuda K, Nishida S, Araki E: Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic

apoE-deficient mice. 第81回日本循環器学会学術集会. 2017/3/17-2017/3/19, 金沢, English session oral

Murakami S, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Fukuda K, Yamada S, Morita Y, Nishida S, Sato M, Motoshima H, Kondo T, Araki E: Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, suppresses the progression of atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. The 8th AASD Scientific Meeting, 2016/10/27-2016/10/29, Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan, Poster

瀬ノ口隆文: 慢性炎症性疾患としての動脈硬化発症・進展におけるマクロファージ増殖の意義. 第50回日本動脈硬化学会. 2018/7/12-7/13, 大阪, シンポジウム

松村 剛, 荒木栄一: 基礎研究から読み取る糖尿病大血管合併症発症機序とその臨床的意義. 第56回日本糖尿病学会総会. 2018/10/13-10/14, 福岡, シンポジウム

西田周平, 松村 剛, 瀬ノ口隆文, 西田彩子, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 和田敏明, 近藤龍也, 本島寛之, 荒木栄一: 高脂肪食負荷 apoE 欠損マウスに対しリナグリプチンは血糖改善効果に依存しない抗動脈硬化作用を発揮する. 第33回日本糖尿病合併症学会. 2018/10/19-10/20, 東京, ワークショップ

瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 和田敏明, 松村 剛, 本島寛之, 荒木栄一: 動脈硬化の進展, インスリン抵抗性発現における組織浸潤マクロファージ増殖の意義. 第33回日本糖尿病合併症学会. 2018/10/19-10/20, 東京, ワークショップ

西田周平, 松村 剛, 村上彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: リナグリプチンによる糖尿病大血管症進展抑制効果の検討. 第61回日本糖尿病学会総会. 2018/5/24-26, 東京, 口演

西田彩子, 松村 剛, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: マクロファージ局在のSGLT2を標的とした新規糖尿病大血管症抑制機序の解明. 第61回日本糖尿病学会総会. 2018/5/24-2018/5/26, 東京, 口演
西田周平, 松村 剛, 西田彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 荒木栄一: リナグリプチンによる糖尿病大血管症進展抑制効果の解析. 第50回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2018/7/12-13, 大阪, ポスター

守田雄太郎, 瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 本島寛之, 松村 剛, 荒木栄一: 動脈硬化病変形成に対するマクロファージ増殖抑制効果の検討. 第50回日本動脈硬化学会. 2018/7/12-7/13, 大阪, ポスター

守田雄太郎, 瀬ノ口隆文, 山田沙梨恵, 本島寛之, 松村 剛, 荒木栄一: 組織マクロファージ増殖の脂肪組織および肝インスリン抵抗性における役割. 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会. 2018/7/21, 米子, ポスター

松村 剛, 瀬ノ口隆文, 建石良介, 小池和彦, 荒木栄一: 糖尿病患者における肝細胞癌発生の実態調査. 第68回日本体質医学会総会. 2018/9/1-9/2, 横浜, 口演

西田周平, 松村 剛, 西田彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 和田敏明, 荒木栄一: linagliptinによる糖尿病大血管症進展抑制効果の検討. 第56回日本糖尿病学会九州地方会. 2018/10/13-10/14, 福岡, 口演

松村 剛, 瀬ノ口隆文, 荒木栄一: 動脈硬化と体質. 第67回日本体質医学会年次学術集会, 2017/9/2-2017/9/3, 松山, シンポジウム

松村 剛, 村上彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 久木留

- 大介, 本島寛之, 近藤龍也, 沼田朋大, 荒木栄一: SGLT-2 阻害薬によるマクロファージ活性抑制を介した糖尿病大血管症進展抑制効果の解析. 第 32 回日本糖尿病合併症学会, 2017/10/27-2017/10/29, 東京, ワークショップ
- 村上彩子, **松村 剛**, **瀬ノ口隆文**, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: エンパクリフロジンによる糖尿病大血管症進展抑制効果の検討. 第60回日本糖尿病学会総会. 2017/5/18-2017/5/20, 名古屋, 口演
- 小野 薫, 井形元維, 近藤龍也, 高木優樹, 北野さやか, 後藤理英子, **瀬ノ口隆文**, 河島淳司, 荒木 栄一: 肝臓においてIRS-1発現抑制を介してインスリンシグナルを制御する microRNAの同定. 第60回日本糖尿病学会総会. 2017/5/18-2017/5/20, 名古屋, ポスター
- 村上彩子, **松村 剛**, **瀬ノ口隆文**, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 西田周平, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: エンパグリフロジンによる新たな抗動脈硬化作用機序解明 - マクロファージに対する直接作用 -. 第49回日本動脈硬化学会総会. 2017/7/6-2017/7/7, 広島, ポスター
- 21 村上彩子, **松村 剛**, **瀬ノ口隆文**, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 西田周平, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: エンパクリフロジンによる糖尿病大血管症進展抑制効果の検討. 第67回日本体質医学会総会, 2017/9/2-2017/9/3, 松山, 口演(若手研究者奨励賞受賞)
- 22 小野 薫, 井形元維, 近藤龍也, 高木優樹, 北野さやか, 後藤理英子, **瀬ノ口隆文**, 河島淳司, 荒木 栄一: miR-222は肝臓においてIRS-1発現抑制を介してインスリンシグナルを制御する. 第55回日本糖尿病学会九州地方会. 2017/10/13-2017/10/14, 宮崎, 口演
- 23 **瀬ノ口隆文**, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 本島寛之, **松村 剛**, 荒木栄一: マクロファージ増殖抑制による動脈硬化プラーク安定化に対する効果. 第55回日本糖尿病学会九州地方会. 2017/10/13-2017/10/14, 宮崎, 口演
- 24 村上彩子, **松村 剛**, **瀬ノ口隆文**, 石井規夫, 福田一起, 山田沙理恵, 守田雄太郎, 西田周平, 久木留大介, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: ストレプトゾトシン誘発糖尿病 apoE 欠損マウスにおいてエンパクリフロジンは大血管症進展を抑制する. 第 31 回日本糖尿病合併症学会, 2016/10/7-2016/10/8, 宮城, ワークショップ
- 25 **松村 剛**, 木下博之, 山中幹宏, 村上彩子, 本島寛之, 近藤龍也, **瀬ノ口隆文**, 大野礼一, 永井竜児, 荒木栄一: 糖尿病細小血管合併症スクリーニング法としての非侵襲指先部経皮蛍光 AGEs 測定の有用性. 第 112 回日本内科学会, 2016/4/15-2016/4/17, 東京, ポスター
- 26 村上彩子, **松村 剛**, **瀬ノ口隆文**, 石井規夫, 木下博之, 福田一起, 山田沙理恵, 佐藤美希, 本島寛之, 近藤龍也, 荒木栄一: ストレプトゾトシン誘発糖尿病 apoE 欠損マウスを用いたエンパクリフロジンによる大血管症進展抑制効果の検討. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2016/5/19-2016/5/21, 京都, 口演
- 27 花谷聡子, 本島寛之, 井形元維, 川崎修二, 高木優樹, 河島淳司, 近藤龍也, 吉永佳代, **瀬ノ口隆文**, 荒木栄一: 酢酸の経口摂取による抗肥満作用の検討. 第 54 回日本糖尿病学会九州地方会, 2016/10/14-2016/10/15, 鹿児島, 口演
- 28 高木優樹, 本島寛之, 井形元維, 花谷聡子, 川崎修二, 河島淳司, 近藤龍也, 吉永佳代, **瀬ノ口隆文**, 荒木栄一: 食餌誘導性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスに対するカロリー制限の効果. 第54回日本糖尿病学会九州地方会, 2016/10/14-2016/10/15, 鹿児島, 口演
- 29 村上彩子, **松村 剛**, **瀬ノ口隆文**, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 佐藤美希, 本島寛之,

近藤龍也, 荒木栄一: エンパクリフロジンはストレプトゾトシン誘発糖尿病 apoE 欠損マウスの動脈硬化進展を抑制する. 第 54 回日本糖尿病学会九州地方会, 2016/10/14-2016/10/15, 鹿児島, 口演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/met/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 松村 剛

ローマ字氏名: (MATSUMURA, takeshi)

所属研究機関名: 熊本大学

部局名: 大学院生命科学研究部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 20398192

(2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。