

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19331

研究課題名(和文) 肝線維化克服のためのNASHモデルマウスを用いた肝線維芽細胞の活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of hepatic fibroblasts in the development of NASH using a novel mouse model.

研究代表者

酒井 建 (SAKAI, Takeru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：20727078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)における肝線維芽細胞の機能的変化を明らかにするため、コラーゲン産生細胞がGFPを産生するマウスとNASHモデルマウスであるメラノコルチン4型受容体(MC4R)欠損マウスを交配し、NASH肝からGFP陽性肝線維芽細胞を採取した。肝線維芽細胞の前駆体と考えられる肝星細胞と比較して、肝線維芽細胞では細胞接着、細胞外基質制御関連、創傷治癒に係わる因子が発現増加しており、活性化筋線維芽細胞の特徴が捉えられていると考えられた。本モデルはNASH発症や改善過程における線維芽細胞の解析に有用である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathophysiological changes of hepatic fibroblasts in the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), collagen promoter-driven GFP transgenic mice were crossed with Melanocortin 4 receptor-deficient (MC4R-KO) mice. Transcriptome analysis was performed using fibroblasts separated from NASH livers of Western diet-fed Collagen-GFP transgenic MC4R-KO mice. Expression of genes related to extracellular matrix organization, cell adhesion, and wound healing was increased in fibroblasts from NASH livers compared to quiescent hepatic stellate cells, suggesting these data represents the characteristics of activated fibroblasts. Collagen-GFP transgenic MC4R-KO mice would be a useful model to investigate the functional changes of hepatic fibroblasts in the development and resolution process of NASH.

研究分野：代謝学

キーワード：肝線維化 線維芽細胞 体重減少

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームに合併する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、脂肪肝や炎症性変化に伴う肝障害、さらには肝線維化に引き続く肝硬変や肝臓に進展する疾患である。近年の肥満人口の増加に伴い NASH 患者は世界的に増加しており、肝線維化に対する有効な治療法の必要性が高まっている。現在のところ確立した有効な薬物療法は存在しないが、減量による脂肪肝・肝線維化改善効果が報告されている (Gastroenterology 149: 367, 2015)。

申請者らは、中枢性エネルギー代謝調節に関与するメラノコルチン 4 型受容体 (Melanocortin 4 receptor: MC4R) を欠損するマウス (MC4R-KO マウス) に高脂肪食を負荷することで、過食に伴う肥満を背景として NASH を発症する病態モデルマウスを確立した (Am J Pathol 179: 2455, 2011)。さらに、NASH を発症した MC4R-KO の肝臓とヒト 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 crown-like structure: 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 (PLoS One 8: e82163, 2013)。hCLS のごく近傍にはコラーゲン蓄積や筋線維芽細胞が存在することから hCLS は炎症・線維化の起点となって NASH 発症に関与すると考えられる。線維芽細胞のマーカーとして SMA が知られているが、NASH の肝臓における陽性率は決して高いものではなく、マーカーとしては不十分であること、生体からの単離が困難であることから、線維芽細胞の活性制御機構には不明な点が多い。

2. 研究の目的

コラーゲン産生能を指標として肝線維芽細胞を標識できるマウスを導入し、in vivo における線維芽細胞の動態および機能的変化を明らかにする。MC4R-KO マウスに対する高脂肪食負荷によって NASH 発症過程を経時的に検討するだけでなく、減量に伴う線維芽細胞の変化を解析することで、新たなバイオマーカーや治療標的となりうる新規因子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) MC4R-KO/COL マウスの作出と GFP 標識線維芽細胞の組織学的評価

コラーゲンプロモーター下に GFP を発現するマウス (Col1a2-GFP Tg (COL)、東海大・稲垣博士より供与) を導入し、MC4R-KO との交配により、MC4R-KO/COL マウスを作出した。MC4R-KO/COL に対する 20 週間の高脂肪食負荷により NASH を誘導し、肝臓における GFP 陽性細胞の分布を経時的に観察した。GFP の蛍光を観察する場合は、薄切した肝臓を 4%パラホルムアルデヒドにて固定後、OCT コンパウンドに包埋して組織学的

評価に供した。通常の免疫染色用サンプルは 10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、パラフィン切片を作成して染色を行った。

(2) NASH 改善過程モデルの作成

MC4R-KO マウスに対する 20 週間の高脂肪食負荷によって NASH を誘導し、通常食への変更 (自由摂餌、あるいは野生型マウスとのペアフィーディング) によって体重を減少させ、12 週間後に解剖を行った。Sirius red 染色、F4/80 免疫染色による組織学的解析、肝中性脂肪・ヒドロキシプロリン含量、遺伝子発現を検討した。

(3) GFP 標識線維芽細胞の分離

麻酔下にマウスの腹部を切開し、門脈から Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Ca²⁺, Mg²⁺ (-)) を約 20ml 灌流した後に、HBSS (Ca²⁺, Mg²⁺ (+))/pronase、次いで HBSS(+)/Collagenase type IV/DNaseI を灌流した。切離した肝臓をピペティングにて分散し、50 xg の低速遠心にて肝細胞を除いた。30% Percoll にて debris を除去し、死細胞除去のため 7-AAD を加えてソーティングを行った。

(4) 肝星細胞採取

正常肝では GFP 標識線維芽細胞はごくわずかししか認められない。NASH における肝線維芽細胞は肝星細胞に由来すると考えられるため、肝線維芽細胞の対象として肝星細胞を密度勾配法にて採取した。HBSS(+)/Collagenase type IV/DNaseI を用いて肝臓を分散し、低速遠心にて肝細胞を除去した。肝星細胞を含む細胞分画を 6% Optiprep に懸濁し、2%FBS/PBS を積層して 1400 xg, 4 で 20 分遠心し、中間層の肝星細胞をピペットで採取した。

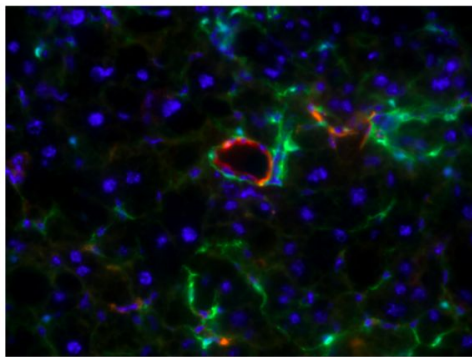
(5) RNA 抽出および増幅

2-4 匹分の線維芽細胞あるいは星細胞をプールし、PureLink Micro Kit (Invitrogen) を用いて RNA を抽出した。SMARTer 増幅キット (Takara) を用いて mRNA を増幅し、RNaseq に供した。

4. 研究成果

(1) MC4R-KO/COL マウスを用いた線維芽細胞の評価

MC4R-KO/COL マウスに対して 20 週間の高脂肪食負荷を行い、組織学的解析および遺伝子発現解析から、従来の報告と同様に NASH を発症していることを確認した。また、マクロファージマーカーである F4/80 と GFP を同時に観察したところ、線維化の起点と考えられる hCLS 周辺に GFP 陽性細胞の局在が認められ、コラーゲン産生能を指標にした線維芽細胞の可視化が確認された (図 1)。



GFP: 線維芽細胞, F4/80: マクロファージ, DAPI

図1. MC4R-KO/COLの肝組織像

(2) NASH 改善過程モデルの確立

20 週間の高脂肪食負荷によって NASH を発症した MC4R-KO マウスを通常食に変更し、自由摂餌で 12 週間飼育した。体重がほとんど減少しない個体があり、全体としての体重減少は軽微であったが、血中 ALT 値や肝中性脂肪含量は著明に減少し、肝臓における炎症性サイトカインや TGF β 、I 型コラーゲンなどの線維化関連因子の遺伝子発現も有意に低下した。しかしながら、組織学的に肝線維化の改善は認められなかった。

そこで、通常食変更後に野生型マウスとのペアフィーディングを行い、野生型マウスと同程度まで体重を減少させた。脂肪肝や炎症・線維化関連因子の発現低下は認められたが、肝線維化の改善は限定的であった。この原因として、線維化程度の強さや MC4R 欠損という遺伝的背景の関与が考えられるため、野生型マウスに対する長期間高脂肪食負荷による NASH の誘導と、体重減少に伴う肝線維化改善を検討する必要があると考えられた。

(3) 単離肝星細胞および線維芽細胞を用いた網羅的解析

NASH を発症した MC4R-KO マウスの肝臓は極度の肝腫大と線維化のため、組織の分散が非常に困難である。プロトコールの改変を

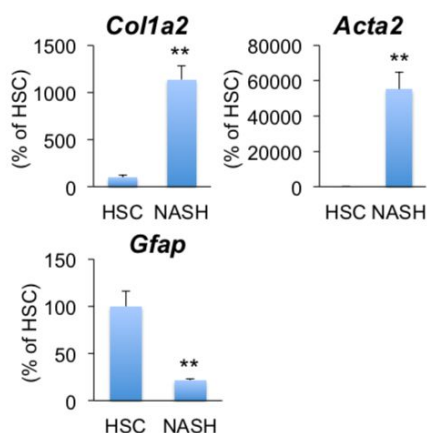


図2. 単離細胞における遺伝子発現

HSC: 肝星細胞, NASH: NASH肝の線維芽細胞

** $P < 0.01$

積み重ね、十分量の細胞が採取可能となった。定量的 PCR により、肝星細胞と比較して I 型コラーゲンや SMA (*Acta2*) の発現増加、活性化時に発現が低下するとされる GFAP の発現抑制が確認されたため(図2) 適切に線維芽細胞が採取されていると判断し、RNAseq を施行した。

その結果、肝星細胞と比較して NASH の線維芽細胞で発現が 2 倍以上増加したものが 396 因子、4 倍以上増加したものは 166 因子認められた。これら増加因子の GO 解析では細胞接着、細胞外基質制御関連、創傷治癒に係わる因子が抽出されており、活性化筋線維芽細胞の特徴が捉えられていると考えられた。

以上より、肥満・インスリン抵抗性を背景に NASH を発症するマウスモデルを用いて、コラーゲン産生能を指標に線維芽細胞を解析可能なモデルを確立した。病態から単離した線維芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析データを取得した。今後 NASH の病態を特徴付ける因子の抽出、線維化発症・改善過程における線維芽細胞の機能的変化を明らかにすることで、NASH の病態解明や新規治療標的の探索に繋がることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

- (1) Itoh M, Suganami T, Kato H, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, Goto T, Asakawa M, Hidaka I, Sakugawa H, Ohnishi K, Komohara Y, 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. 査読有り
doi: 10.1172/jci.insight.92902

[学会発表](計 3 件)

- (1) Itoh M, Suganami T, Kanai S, Shirakawa I, Sakai T, Goto T, Asakawa M, Hidaka I, Sakaida I, Ogawa Y. "Hepatocyte death-triggered CD11c-positive macrophage accumulation induces liver fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. AASLD The Liver Meeting 2017 (Washington DC, USA) 2017/10/23
- (2) 伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、白川伊吹、酒井建、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-」第 38 回日本肥満学会(大阪)2017
年 10 月 7 日

- (3) 酒井建、伊藤美智子、後藤俊宏、浅川雅
博、白川伊吹、金井紗綾香、菅波孝祥、
小川佳宏「NASH 動物モデルに対する減
量介入が肝病変に及ぼす効果の検討」第
37 回日本肥満学会(東京)2016 年 10 月
7 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 建 (SAKAI, Takeru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・非常勤講師

研究者番号：20727078