

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15881

研究課題名(和文) NASHを背景とした急性心筋梗塞発症への臓器間クロストークの影響

研究課題名(英文) Nonalcoholic steatohepatitis and cardiovascular disease

研究代表者

宮尾 昌(Masashi, Miyao)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90711466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎、NASHは肥満を中心としたメタボリック症候群の肝臓病変である。NASHは心筋梗塞の発症および死亡に強く関与しており、法医解剖でよくみられる疾患のひとつである。しかし、その病態機序には不明な点が多い。私たちはモデルマウスを用いて、NASH病態初期に肝臓内皮障害が起こり、内皮障害からKupffer細胞や肝星細胞が異常に活性化することを明らかにした。反対に、Kupffer細胞の活性化が内皮障害や肝星細胞の異常な活性化を起こすことを明らかにした。これらの研究成果は増え続ける肥満やメタボリック症候群による健康障害を抑えるための新しい予防・治療戦略に繋がることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満・NASH・メタボリック症候群は全世界で増え続けており、その予防・治療法開発は持続可能な社会の発展にとって重要である。私たちはモデルマウスを用いた実験研究で、血管内皮障害がNASHを発症してしまう原因となること、肝臓に分布する白血球のKupffer細胞が内皮障害を起こす原因となることを明らかにした。このように、NASHの病態に関連するものを明らかにしていくことで、メタボリック症候群によって死亡してしまう人を一人でも多く減らすことに貢献したい。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis is a liver manifestation of a metabolic syndrome. Growing evidence suggests that NASH is an independent risk factor for cardiovascular disease mortality and morbidity. However, the association between NASH and cardiovascular diseases remain elusive. We aimed to investigate the association of NASH and cardiovascular disease progression using several mouse models. We found that sinusoidal endothelial dysfunction plays gatekeeper role for NASH progression and is associated with other metabolic disorders including obesity. We also revealed that Kupffer cells lead to sinusoidal endothelial dysfunction and hepatic stellate cell activation, and ultimately leading to cirrhosis. These data provide new insights into mechanisms for obesity-related metabolic syndrome.

研究分野：法医学

キーワード：法医病理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

法医学者が関与する異状死の種類としては病死が最も多く、その4分の3程度を占める(平成26年自験例)。法医学者は外因死だけでなく、病死、特にその多くを占める急性心臓死の正確な死因究明が望まれている。一方、運動不足や過剰な食生活などから非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を含めたメタボリック症候群が急増しており、NASHは急性心筋梗塞発症の重要な原因の一つであるため、法医病理学的観点からNASHを背景とした急性心臓死に関する研究を進める必要がある。

単純性脂肪肝やNASHを発症すると急性心筋梗塞の死亡率を30%以上増加させ、病態進展するとその死亡率は約5倍以上になる(GB Goh et al. Dig Dis Sci. 2016)。また、急性心筋梗塞には冠動脈内皮障害が早期病態のキーとなるが、NASHにおいても肝臓の類洞内皮障害が病態進展のキーとなる。従って、法医解剖において急性心臓死を診断する際には、NASHの寄与と内皮障害の影響を調べる必要がある。つまり、死因を急性心臓死と正確に判断するためには、急性心臓死におけるNASHの病態に関する知見を集積しなければならない。しかしながら、これまでの研究は急性心筋梗塞患者の臨床疫学研究が主体で、死因究明を念頭においた法医病理学的研究は殆ど行われてこなかった。また、モデル動物を用いた研究は、NASHに対する薬剤効果判定を目的としたものが多く、急性心臓死とNASHの関係における病態解明は進んでいないのが現状であった。

申請者らの研究室では、これまで硬化性胆管炎やNASHモデルマウスを用いて内皮細胞、肝細胞、Kupffer細胞の早期変化を明らかにしてきた(M Miyao et al. Dig Liver Dis. 2013, M Miyao et al. Lab Invest. 2015)。また、単一臓器障害のみに焦点を当てるのではなく、多臓器連関にも注目して、肝、肺、腎などの多臓器不全の病態解明の研究を行ってきた(C Kawai et al. Am J Pathol. 2016, T Ishida et al. PLOS ONE 2016)。今回、モデルマウスを用いてNASH病態における内皮細胞、肝細胞、Kupffer細胞の病理学的変化と互いの細胞間クロストークを探り、急性心筋梗塞など他臓器への臓器間クロストークについての展望に広げたいと考えている。また、得られた知見を急性心筋梗塞解剖事例におけるNASH病態の検索に応用して、急性心臓死の正確な死因推定の向上やその予防に向けた知見蓄積に貢献したい。

2. 研究の目的

本研究では、NASHにおける肝臓と心臓の内皮細胞を病理学的に解析し、多臓器障害機序を解明する。

本研究のモデルは肝臓病変が肝細胞や血管内皮、Kupffer細胞、肝星細胞などにより受動的または能動的に放出されたメディエーターを介して時間的・空間的に互いに影響を与え合っている(M Miyao et al. Lab Invest. 2015)。本研究では、異なる時期の細胞間・臓器間の関連を解明することで病期・臓器に合わせた適切な診断・治療法を提示できる可能性がある。これは、最近の医学研究のトピックの一つである「多臓器円環」、つまり病気を臓器単位ではなく、システムでとらえようとする新たな研究分野にも通じるモデルである。本研究課題ではNASHを病期ごとに分け臓器間クロストークを時間的・空間的に捉えることを目的としたことがこれまでにない新規性である。また、今回、臓器間クロストークを解明するために、肝臓内の血管内皮細胞を中心とした細胞間クロストークを検索する。急性心筋梗塞は冠動脈内皮傷害がキーとなるが、障害された内皮は受動的な反応だけにとどまらず、能動的にも接着分子やサイトカインを放出し病態に関連する(KJ Moore et al. Cell 2013)。肝臓においても内皮細胞はの大きなフラクションであり、肝実質細胞以外の細胞群の50%以上を占める。また、内皮細胞は各臓器の栄養分や酸素を運ぶための生命に必須の細胞であり、他の細胞と肝臓においても他の細胞とのクロストークにより、NASH病態に密接に関連していると考えられる。しかし、これまでのモデルマウスを用いた研究は、例えば炎症時にはKupffer細胞の遺伝子を改変させるなど、シンプルかつ単一臓器の病変に限定した実験モデルが利用されてきた。今回、全臓器に分布する内皮細胞を中心とした細胞間クロストークを調べることで、肝臓病変だけでなく、心臓や他の臓器疾患との関連性を明らかにできると期待される。

また、申請者らは日頃、法医解剖を行うことで日本における死因究明の一部を担っている。解剖は死因診断の要であり、その診断精度を向上させ続けることは必須である。本研究は全身の恒常性維持に関わる肝臓の細胞間クロストークから始めているが、得られた知見は単一臓器に留まらず、多臓器連関に応用できるものである。従って、ヒトに応用できれば、全身のさまざまな臓器疾患の診断基準の構築につながり、法医解剖診断の精度向上にとって大きな意義があると考えている。

3. 研究の方法

コリン欠乏食および高脂肪食投与によるNASHモデルマウスにおいて、NASH病態と急性心筋梗塞発症の関係性を解明するため、下記項目についての観察や分析を行う。

A. NASHモデルマウスにおける早期および進展期における内皮細胞の病理学的変化

A - 1. 組織学的および超微細構造学的分析

2種のモデルマウスにおいて、HE染色などで脂肪沈着、炎症、巨細胞化、線維化を組織学的に病期診断し各反応の重要病期を決定する。また、蛍光免疫染色を用いて機能学的にも解析を行う。さらに、三次元の超微細構造分析のための走査型電子顕微鏡を用いて内皮障害をさらに詳細に

検索する。具体的には、内皮傷害を定量化するため内皮の孔の消失程度を評価する(図、M. Miyao et al. Dig. Liver Dis. 2013)。

A - 2. ミトコンドリア障害などの酸化ストレス評価と細胞間シグナル伝達の変化の同定

上記 A - 1 で決定した各反応の重要な時期のマウスを用いて、ミトコンドリア障害や小胞体ストレスなどのマーカータンパク質や ATP 産生、各細胞の放出するサイトカインの遺伝子・タンパク質発現の定量を行い、重要病期におけるシグナル伝達経路を検索する。

B . NASHモデルマウスにおける進展期における Kupffer 細胞による内皮障害への影響

Kupffer 細胞は、早期、進展期の全過程にかけ異なる重要な働きをする。この Kupffer 細胞をクロドロネートで一時的に機能欠損させ、各重要病期の際に Kupffer 細胞が内皮障害にどのような影響を及ぼしているかを解明する。例えば、早期においてクロドロネート群の病態進展が抑制されていた場合、NASH 病態に対して、Kupffer 細胞が内皮障害とともに病態を促進させてしまう働きがあることが分かり、Kupffer 細胞のみの変化だけでなく、内皮障害への寄与も明らかにできる。対照群はプラセボを投与した同時期のマウスを用いる。

C . NASHにおける肝臓と心臓の内皮障害の関連

上記 A、B で NASH 病態の知見が、心、肺、腎などの多臓器障害とも関連するかをモデルマウスで調べる。また、ヒトの病態においても応用できるかを研究するため、当研究室で行った法医解剖事例のうち、過去 5 年間における急性心筋梗塞による死亡事例を抽出する。そして、心臓、肝臓標本を用いて、NASH の有無と病態進行の程度を解析する (unpublished data)。対照群は同様の年齢分布を示す交通事故事例などを用いて、比較検討を行う。

4 . 研究成果

法医学は、これまでに予防医学に関する多くの提言を行ってきており、メタボリック症候群も我が国の予防医学における克服すべき課題の一つで重要な研究対象である。本研究では、法医解剖における死因診断精度を向上させるために肥満、糖尿病、非アルコール性脂肪性肝炎などのメタボリック症候群における病理学的診断方法の開発を目指すことを目的にしている。そのために、非アルコール性脂肪性肝炎を背景とした急性心筋梗塞発症への臓器間クロストークの影響を明らかにすることが重要と考えた。研究期間中には以下のことを明らかにした。

NASH 進展期病態に共通点の多い慢性胆汁うっ滞疾患モデルマウスにおいて、炎症反応を引き起こすキーとなる Kupffer 細胞が病態が進展するごとに質的にも量的にも病的変化が増悪することが分かった。同モデルにおいて、Kupffer 細胞の病的変化と病態進展に因果関係があるかどうかを調べるため、Kupffer 細胞を枯渇化させる薬剤を投与しプラセボ群と比較、解析したところ、Kupffer 細胞を枯渇化させると病態進展が緩やかになることが分かり、Kupffer 細胞の病的変化が原因で病態進展を促進していることが分かった。Kupffer 細胞は炎症の誘導だけでなく、病原体などの外的要因や壊死した細胞由来の老廃物を取り除く作用もあるため、病態回復期には回復を促進させる働きがあると仮説を立て、同モデルの回復期に Kupffer 細胞を枯渇化させて解析を行った。すると、仮説通り、病態進展期とは逆に、枯渇化させた群ではプラセボ群と比較し病態回復が有意に遅延することが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Jemai Leila, Miyao Masashi, Kotani Hirokazu, Kawai Chihiro, Minami Hirozo, Abiru Hitoshi, Tamaki Keiji	4. 巻 8
2. 論文標題 Pivotal roles of Kupffer cells in the progression and regression of DDC-induced chronic cholangiopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-24825-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyao M, Cicalese S, Cooper HA, Eguchi S.	4. 巻 133(19)
2. 論文標題 Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial biogenesis are potential therapeutic targets for abdominal aortic aneurysm.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Science	6. 最初と最後の頁 2023-2028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/CS20190648.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Jemai L, Miyao M, Hamayasu H, Minami H, Abiru H, Baba S, Osamura T, Tamaki K, Kotani H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Fatal Mumps Myocarditis Associated With Left Ventricular Non-Compaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Case Reports	6. 最初と最後の頁 e921177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.12659/AJCR.921177.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miyao M, Cicalese S, Kawai T, Cooper HA, Boyer MJ, Elliott KJ, Forrester SJ, Kuroda R, Rizzo V, Hashimoto T, Scalia R, Eguchi S.	4. 巻 21(9)
2. 論文標題 Involvement of Senescence and Mitochondrial Fission in Endothelial Cell Pro-Inflammatory Phenotype Induced by Angiotensin II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 E3112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21093112.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Forrester SJ, Preston KJ, Cooper HA, Boyer MJ, Escoto KM, Poltronetti AJ, Elliott KJ, Kuroda R, Miyao M, Sesaki H, Akiyama T, Kimura Y, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Mitochondrial Fission Mediates Endothelial Inflammation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 ジェマイル・レイラ、宮尾昌、阿比留仁、小谷泰一、玉木敬二
2. 発表標題 慢性胆汁うっ滞性肝疾患におけるKupffer細胞を中心とした細胞間クロストーク
3. 学会等名 第65回日本法医学会学術近畿地方集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 ジェマイル・レイラ、宮尾 昌、川合千裕、南 博蔵、小谷泰一、玉木敬二
2. 発表標題 Kupffer細胞は慢性胆汁うっ滞性肝疾患の進展期と寛解期で相反する役割を果たす。
3. 学会等名 第64回日本法医学会学術近畿地方集会。
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hannah Cooper, Masashi Miyao, Tatsuo Kawai, Kyle Preston, Kathy Elliott, Rosario Scalia, Victor Rizzo, Satoru Eguchi
2. 発表標題 Mitochondrial Fission in Vascular Cells Mediates Hypertensive Vascular Remodeling and Inflammation
3. 学会等名 American Heart Association's Hypertension 2019 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Stephanie M Cicalese, Hannah Cooper, Tatsuo Kawai, Masashi Miyao, Kyle Preston, Victor Rizzo, Rosario Scalia, Satoru Eguchi
2. 発表標題 Inhibition of Ang II-Induced Mitochondrial Fission and Endoplasmic Reticulum Stress Attenuates Protein Aggregate Accumulation, Inflammation, and Senescence in Vascular Smooth Muscle Cells
3. 学会等名 American Heart Association's Hypertension 2019 Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.fp.med.kyoto-u.ac.jp/

6. 研究組織		
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)
		備考