

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15965

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎における間質細胞由来因子による線維化の解明と治療への応用

研究課題名(英文)Effects of stromal cell-derived factors on fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

安藤 航 (Ando, Wataru)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：60586387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は、メタボリックシンドロームの代表的疾患の一つと知られているが、発症メカニズムについては不明な点が多い。NASH患者の血液中および肝組織において、間質細胞由来因子(Stromal derived factor 1; SDF-1)とその受容体であるChemokine Receptor4(CXCR4)の発現が上昇していることから、本研究ではNASH進展におけるSDF-1/CXCR4シグナルの関与について、マウスモデルを用いて検討したところ、NASH進展過程においてSDF-1/CXCR4シグナルは脂肪滴の形成や肝線維化の抑制に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝炎にはNASHのほかにC型およびB型肝炎や自己免疫性肝炎などがあるが、C型肝炎治療にはC型肝炎ウイルスに対して極めて効果的な経口治療薬が登場したことで、容易に治療可能な疾患となりつつある。C型肝炎とB型肝炎を除くと、将来NASHが最も罹患者数の多い肝疾患となる事が予想されるため、NASHから進展する肝硬変・肝癌の予防や治療が重要であると考えられる。本研究によって今後の発展的な研究としてSDF-1/CXCR4経路阻害剤のNASH治療への臨床応用に繋がることは、NASH治療薬の開発や治療効果の予測、予後の判定に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is known to be one of the most common diseases of the metabolic syndrome. Stromal derived factor 1 (SDF-1) and its receptor, Chemokine Receptor 4 (CXCR4), are upregulated in blood and liver tissues of NASH patients. Therefore, in this study, we investigated the involvement of SDF-1/CXCR4 signaling in NASH progression using a mouse model, and found that SDF-1/CXCR4 signaling is involved in the formation of fat droplets and suppression of liver fibrosis during NASH progression.

研究分野：肝臓学

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は肝臓に蓄積した脂肪によって肝臓が炎症を起こす疾患である。この炎症によって肝細胞がコラーゲン線維に置換される線維化が引き起こされ、進展すると肝硬変や肝癌の原因となることが知られている。しかしながら、NASHの線維化メカニズムはヒトの慢性C型肝炎や四塩化炭素を用いた肝障害動物モデルとは異なる機序が報告されており、脂肪の蓄積による炎症や惹起されたサイトカインなどのさまざまな要因が関与するとされている(Caligiuri A. et al. *Int J Mol Sci.* 2016)。

間質細胞由来因子(SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1)はその受容体であるC-X-Cケモカインレセプター4(CXCR4)のリガンドであり、SDF-1 /CXCR4経路を形成する。SDF-1 /CXCR4経路は骨髄における造血幹細胞の分化や移動に密接な関与を持ち、肝臓では肝星細胞の活性化を誘導することが知られている(Media B et al. *Clinical Science.* 2015)。CXCR4は7回膜貫通型のGタンパク共役受容体であり、マクロファージ系列のKupffer細胞や肝星細胞にヒトおよびマウスに共通して発現している。Kupffer細胞ではPI3K-Akt経路を介したNF- κ Bの活性化によって炎症性サイトカインやケモカインの産生を増加させることで線維化を誘導することが知られている。研究代表者らは肝線維化が高度に進展したNASH患者群において血中SDF-1が高値を示し、また、SDF-1の受容体であるCXCR4も線維化が進展したNASH患者で発現が増加を観察してきた。これらの知見から、肝類洞に存在するKupffer細胞におけるSDF-1/CXCR4経路が肝線維化の形成に寄与していると考えられた。そこで、Kupffer細胞におけるSDF-1 /CXCR4経路の活性化に注目し、NASHの病態形成における役割について、CXCR4コンディショナルノックアウトマウスを用いて解析することを計画した。さらに、SDF-1 /CXCR4経路阻害剤を用いることで、NASHにおける線維化の進展を抑制する治療アプローチを計画した。SDF-1 /CXCR4経路阻害剤として報告されている化合物や天然物由来物質はいくつか報告されているが、本研究では生薬であるマリアアザミから抽出されるシリピニンに着目した。シリピニンは急性肝炎などに対する肝保護作用が報告されているが(Kosina P. et al. *Phytother. Res.* 2002, Yan Wang, et al., *Phytomedicine.* 2014), NASHに対する効果は未知である。シリピニンによるSDF-1 /CXCR4経路の抑制を介した線維化抑制効果の解明は、NASHにおける新しい治療アプローチに繋がると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、肝線維化の過程におけるSDF-1 /CXCR4の発現機構について、食餌誘導性NASHモデルマウスおよびKupffer細胞特異的CXCR4ノックアウトマウスを用いて生化学的手法および細胞生物学的手法によって詳細を明らかにする。続いて、NASHモデルマウスにおけるSDF-1 /CXCR4経路阻害剤がKupffer細胞による炎症性サイトカイン・ケモカイン産生にどのような影響を与えるかについて検討し、肝線維化の進展抑制効果について治療アプローチを開拓することを目的とした。

3. 研究の方法

食餌誘導性NASHモデルの作製

食餌誘導性NASHモデルは、6週齢の野生型C57BL/6J雄性マウスおよび6週齢の雄性Cxcr4 cKOマウスにRESEARCH DIETS, Inc.製のNASH作製用飼料A06071302 [60kcal% 脂肪含有量, ラード使用, コリン欠乏, メチオニン減量(0.1%)] (以下HFD; High Fat Diet)を自由摂取させNASH様の病態を発症させ作製した。HFD摂取から0, 4, 8, 12週後に全血を採取し、血清中AST, ALT, ALP, LDH濃度を測定した。また、肝臓組織を採取し、ホルマリン固定後に薄切片を作成し、HE染色、オイルレッド染色ならびにマッソン・トリクローム染色を用いて肝臓における脂肪化と線維化を解析した。比較対象群には通常飼料を給餌したマウス(通常飼料群)を用いた。

SDF-1 /CXCR4経路阻害物質による線維化抑制効果の検証

NASH形成に対する抑制効果の検証は、シリピニン100 mg/kgを0.5w/v%メチルセルロース400溶液に懸濁し24時間おきに野生型のNASHモデルマウスに経口反復投与した。対照群は生理食塩水をメチルセルロースに溶解したものを同様に野生型のNASHモデルマウスに投与した。4, 8, 12週間の時点における肝臓の炎症および線維化の進行度を生化学的および組織学的にて解析した。

Lys-M Cre-Cxcr4^{flox/flox}マウスの作製

Lysozyme M遺伝子プロモーター制御下でDNA組換え酵素(Cre)を発現するLys-M Creマウスと、Cxcr4^{flox/flox}マウスを掛け合わせることでLys-M Cre-Cxcr4^{flox/flox}(Cxcr4 cKO)マウスを作製した。CXCR4の全身性ノックアウトは胎性致死であるため、コンディショナルノックアウトマウスの作成は必至である。Lys-M CreマウスおよびCxcr4^{flox/flox}マウスは理研バイオリソースセンターより譲渡されたものを使用した。作製したCxcr4 cKOマウスにHFD給餌させ、NASHモデルを作製し、4, 8, 12週間の時点における肝臓の炎症および線維化の進行度を生化学的および組織学的にて解析した。対照群はLysM-Creを発現しないCxcr4^{flox/flox}マウスを用いた。

Cxcr4 cKO マウス骨髄由来マクロファージにおけるインフラマソーム活性化の検討

Cxcr4 cKO マウスから骨髄を採取し、M-CSF を用いて骨髄由来マクロファージ (BMM) へ分化誘導させた。BMM にオレイン酸およびパルミチン酸を添加し、48 時間培養したのち細胞を回収し、インフラマソームの形成に關与するシグナル伝達物質として Caspase-1 および Cleaved Caspase-1 の発現をウエスタンブロットにて解析した。

4. 研究成果

食餌誘導性 NASH モデルにおける CXCR4 阻害剤の検討

HFD を給餌した野生型マウスは一過性の体重減少を認めたが、給餌開始から 12 週にかけて緩やかな体重増加を示した。シリビニン (SLB) の投与による体重の増加量におよび増加割合に有意な差は認められなかった。

SLB 投与群と対照群では HFD 給餌開始から 4 週後までは AST および ALT に差は見られなかったが 8 週後において ALT が有意に減少した。(図 1)

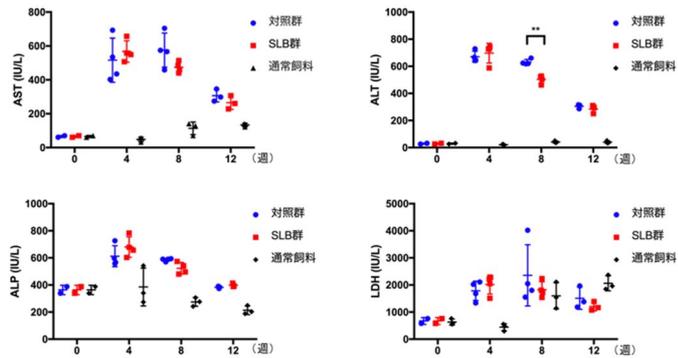


図 1 SLB 投与における NASH モデルにおける生化学検査値の推移

HFD 摂取 8 週後および 12 週後の SLB 投与群は対照群と比較して門脈域の線維化の抑制が認められた。12 週後では対照群において門脈域の線維化がさらに進行していることが認められたのに対し、SLB 投与群では、線維化の消退または改善が認められた。(図 2) 肝の脂肪化については、8 週後および 12 週後の SLB 投与群では対照群と比較して、脂肪滴の蓄積の抑制が認められた。

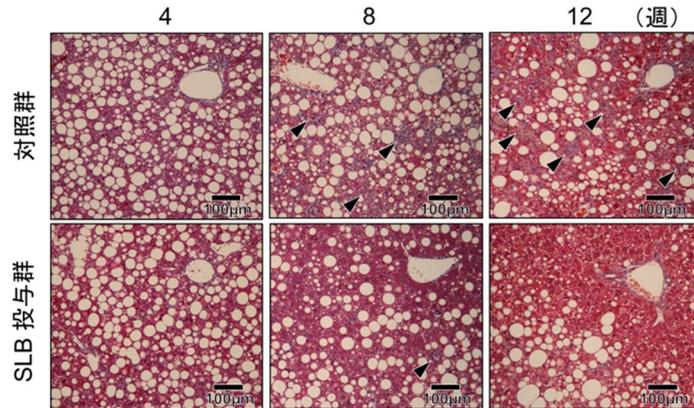


図 2 SLB を投与した NASH モデル肝組織における線維染色像

Cxcr4 cKO マウスを用いた NASH モデルにおける検討

4 週後における AST および ALP は対照群と比較して高値であった。一方で、ALT 値に違いはなかった。4 週後における Cxcr4 cKO の総コレステロール値および TG 値が有意に低かったことから、SDF-1/CXCR4 経路は早期の脂肪肝において脂質代謝機能の調節に係る可能性が示唆された。8 週から 12 週目では肝機能ならびに脂質に関する値に違いは認められなかった。

8 週後において、Cxcr4 cKO と対照群の両方で中心静脈域および小葉間では線維化がみられたが、cKO 群では門脈域の線維化が対照群と比較して抑制されていた(図 3)。12 週後においても同様の傾向が見られたが、小葉構造の崩壊から明確な差は判別できなかった。

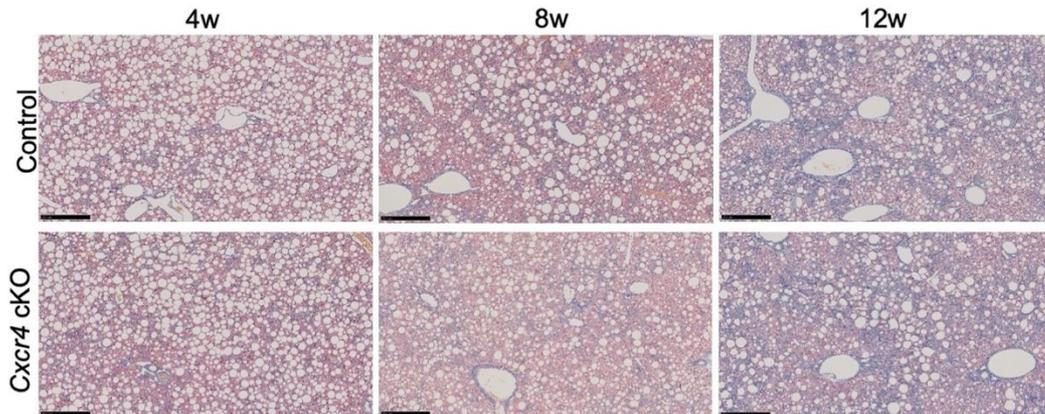


図 3 NASH モデル化した Cxcr4 cKO における肝組織の線維染色像

脂肪酸を添加した *Cxcr4* cKO 由来 BMM では Caspase-1 発現の減少と, Cleaved Caspase-1 発現の増加がみられたことから, CXCR4 ノックアウトによってインフラマソームの活性化が誘導されていることが示唆された。これは SDF-1/CXCR4 経路において脂肪酸による刺激がミトコンドリアの脂肪酸代謝による ROS による NLRP3, ASC, pro-caspase-1 からなるインフラマソーム複合体の活性化を介してパイロトーシスが誘導され, 肝組織に対して保護的な役割を示すと考えられた。

本研究の結果, NASH 進展過程において SDF-1/CXCR4 シグナルを阻害することにより, 脂肪滴の形成や肝線維化を抑制することが示唆された。今後は本研究で得られた知見をもとに, 詳細な肝線維化進展メカニズムの解析に繋げていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------