

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07911

研究課題名(和文) 脂肪性肝疾患の肝線維化におけるB細胞活性化因子の役割

研究課題名(英文) The role of B cell activating factor in liver fibrosis of fatty liver disease

研究代表者

阿部 雅則 (Abe, Masanori)

愛媛大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40432786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アディポカインBAFFの脂肪性肝疾患の線維化進展への関わりについてノックアウトマウスを用いて解析した。コレステロール含有高脂肪食飼育に加えて四塩化炭素を投与することにより線維化を伴う脂肪性肝炎モデルを確立した。BAFF欠損マウスでは野生型に比べて肝脂肪化、炎症、線維化が軽減した。BAFF欠損マウスの肝臓では野生型に比しM1マクロファージ数およびM1/M2マクロファージ比が低下していた。以上から、BAFFはマクロファージの活性化を介して脂肪性肝疾患の炎症および線維化に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの疫学研究から、肝炎ウイルス非感染者からの肝発癌の多くが、肥満や糖尿病などの代謝異常を合併していることが明らかとなっており、非常に多数の肥満、糖尿病患者の中から肝病態進行例を抽出すること、またその治療戦略を確立する必要がある。申請者はアディポカインであるBAFFが肥満・糖尿病と免疫異常・発癌を繋ぐ重要な因子の一つではないかと考えており、消化器病学のみならず、代謝および免疫の両者の観点から発展が期待される特色のある研究であり、本研究成果は脂肪性肝疾患のみならず、肥満関連疾患や臓器線維化などの領域に波及することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of B cell-activating factor (BAFF) in the fibrosis progression of fatty liver disease using BAFF-knockout (BAFF-KO) mice. We established mouse model with steatosis and fibrosis by feeding with high fat-high cholesterol diet and administration of carbon tetrachloride. Hepatic steatosis, inflammation and fibrosis was ameliorated in BAFF-KO mice compared with wild-type mice. The number of M1-like macrophages and M1/M2 ratio were significantly lower in BAFF-KO mice than in wild-type mice. These findings suggest that BAFF may contribute to the M1-like macrophage-dominant phenotype and the subsequent liver inflammation and fibrosis in fatty liver disease.

研究分野：肝臓病学

キーワード：脂肪性肝疾患 肝線維化 アディポカイン

## 1. 研究開始当初の背景

多くの疫学研究から、肝炎ウイルス非感染者からの肝発癌の多くが、肥満や糖尿病などの代謝異常を合併していることが明らかとなっており、非常に多数の肥満、糖尿病患者の中から肝病態進行例を抽出すること、またその治療戦略を確立する必要がある。

申請者は、肝疾患を中心に免疫応答の解析と免疫療法の臨床応用に向けた研究を継続する傍ら、肥満、糖尿病などの代謝異常や脂肪性肝疾患の病態解析にも取り組んできた。これらの研究を継続する中で、B細胞の生存、分化や活性化に關与するサイトカインであるB細胞活性化因子(BAFF)がインスリン抵抗性を誘導するアディポカインであることを見出した。その後の解析により、以下の知見を明らかにしてきた。高脂肪食(HFD)誘導肥満マウスでは内臓脂肪組織のBAFF発現が高く、血清BAFF濃度が上昇する。HFDで飼育したBAFFノックアウト(BAFF-KO)マウスではコントロールに比し肝脂肪化が軽減するが、血清BAFF濃度が増加するBAFF-Rノックアウト(BAFF-R-KO)マウスでは肝脂肪化が増悪する。以上の結果から、BAFFが肥満に伴う肝脂肪化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、申請者らは、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)では、肝線維化の進展に伴い血清BAFF濃度が増加していることを報告している。慢性肝疾患治療の最終目標は肝不全への進展阻止および発癌予防と考えられるが、肝線維化は肝不全、肝発癌の母地となりうるため、肝線維化の機序の解明と治療法の確立は重要な課題である。しかし、脂肪性肝疾患の肝線維化に対するBAFFの關与およびその機序は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、BAFFの脂肪性肝疾患の肝線維化への役割について、ノックアウトマウスを用いた動物モデルや細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝星細胞のBAFF受容体発現とBAFFによる肝星細胞の活性化

C57BL/6マウスから分離した肝星細胞上のBAFF受容体(BAFF-R, TAC1, BCMA)の発現についてreal-time RT-PCRで解析した。また、分離した肝星細胞をBAFF、TGF- $\beta$ で刺激し、肝星細胞の活性化マーカー(SMA, collagen Iなど)の発現をreal-time RT-PCRで解析した。

### (2) NASHモデルの作成

これまでに報告されている脂肪性肝疾患モデル、とくに食餌誘導性モデルは肥満、インスリン抵抗性、脂質異常を呈するなど、ヒトとの類似性はみられるものの、病態が軽微で発症までに長期間必要であるという問題点がある。今回、C57BL/6マウスを用いて高脂肪食コリン欠乏メチオニン減量飼料(CDAHFD)モデル、コレステロール含有高脂肪食(HFHC)モデルに加えて、HFHC(8週間)に四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)を短期間(4週間)投与するNASHモデルを作成し、このモデルを中心に解析した。

肝組織のHE染色、OsO<sub>4</sub>染色、Sirius-Red染色により肝脂肪化、炎症、線維化の評価を行った。また、肝機能検査と肝臓の脂肪含量、コラーゲン含有量を測定した。

肝星細胞の活性化の評価のため肝組織の SMA の染色を行うとともに、SMA、collagen I などの発現を real-time RT-PCR で解析した。また、マクロファージ浸潤についても免疫染色で解析した。

### (3) NASH モデルの肝線維化における BAFF の役割

C57BL/6 マウスと BAFF-KO マウスを用いて上記の NASH モデルを作成した。

肝組織像（脂肪化、炎症、線維化の程度）、肝機能検査と肝脂肪含量、コラーゲン含有量を（2）と同様に解析した。

各群の肝臓を用いて炎症・免疫異常、星細胞活性化および線維化に関する遺伝子発現の相違を real-time RT-PCR で解析し、蛋白発現については免疫染色を行った。

各群の肝内浸潤細胞をフローサイトメトリーで解析し、M1/M2 マクロファージの動態を比較した。

RAW246.7 細胞に recombinant BAFF を添加し、炎症性サイトカインの発現を real-time RT-PCR で解析した。また、BAFF-Fc を添加した際の発現変化についても解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 肝星細胞の BAFF 受容体発現と BAFF による肝星細胞の活性化

マウス肝臓から星細胞を単離して BAFF 受容体 (BAFF-R, TACI, BCMA) を real-time RT-PCR で解析したが、発現はみられなかった。また、単離した星細胞に BAFF を添加して培養しても、SMA、collagen I、TGF- $\beta$  の発現変化はなかった。ヒト星細胞株 (LX-2) を用いた検討でも同様な結果であった。

### (2) NASH モデルの作成

CDAHFD 食、HFHC 食では高度の脂肪沈着がみられたが、既報のような線維化の進展は明らかではなかった。また、これらのマウスモデルでは NASH の病態が形成されるまでに長期間の飼育が必要であることから、HFHC 食に CCl<sub>4</sub> 投与を加えた NASH モデルを作成した。生後 6 週から 8 週間 HFHC を与え、9~12 週に週 2 回、計 8 回 CCl<sub>4</sub> (0.4  $\mu$ l/kg) を腹腔内へ投与することで、脂肪化、炎症、線維化を伴うヒト NASH に類似した肝組織像が観察され、肝脂肪含量、コラーゲン含有量の増加も確認された。また、血清 ALT 値の上昇と炎症性サイトカインの増加もみられた。

本マウスモデルの肝臓では、肝類洞内に SMA 陽性細胞が散見された。また、F4/80 陽性細胞の著明な浸潤も観察された。

### (3) NASH モデルの肝線維化における BAFF の役割

C57BL/6 マウスおよび BAFF-KO マウスを用いて上述の NASH モデルを作成した。

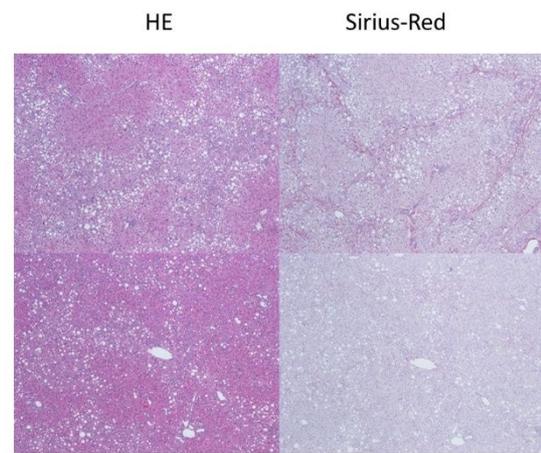
肝組織像では BAFF-KO マウスで肝脂肪化、炎症、線維化が C57BL/6 マウスより軽度であった。Sirius-red 陽性領域の面積は BAFF-KO マウスで有意に低く、コラーゲン含有量も少なかった ( $p < 0.01$ )。肝臓の中性脂肪含有量も BAFF-KO マウスで有意に少なかった ( $p < 0.05$ )。また、BAFF-KO マウスでは血清 ALT 値が低く ( $p < 0.01$ )、肝組織での NAS

スコアも低値であった。

BAFF-KO マウスの肝臓では MCP-1、TNF、IL-6、IL-1、CD11c、iNOS の発現が C57BL/6 マウス肝臓より有意に低かった ( $p < 0.05$ )。また、TGF- $\beta$  や Col1a も BAFF-KO マウスの肝臓で低発現であった ( $p < 0.05$ )。免疫染色では C57BL/6 マウス肝臓と比べて BAFF-KO マウスの肝臓では F4/80 陽性細胞と SMA 陽性細胞が減少していることが観察された。

C57BL/6

BAFF-KO



BAFF-KO マウス肝臓では F4/80 陽性マクロファージが C57BL/6 マウスより少なかった。また、M1 マクロファージ (CD11c(+)CD11b(+)) と M2 マクロファージ (CD11c(-)CD11b(+)) の比率は C57BL/6 マウスより BAFF-KO マウスで有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。

RAW246.7 細胞に BAFF を添加すると、iNOS、TNF、IL-6 の発現が上昇した ( $p < 0.05$ )。BAFF-Fc を添加すると発現上昇はみられなくなった。

以上の結果から、本研究では BAFF が脂肪性肝疾患の肝脂肪化、炎症に加えて線維化を進展させることが明らかになった。本研究で用いたモデルマウスでは星細胞の活性化がみられていたことから、当初は星細胞への直接作用を想定していたが、BAFF の星細胞への直接作用ではなく、マクロファージを中心とした炎症および免疫異常が関与している可能性が高いと考えられた。現在、星細胞とマクロファージの共培養実験など実験を進行しており、予備実験ではマクロファージから分泌される生理活性物質が星細胞の活性化に寄与しているのではないかという結果を得ている。本モデルでは発症までの時間が短縮され、病態が明瞭になるという利点があるが、ヒトでの再現性には課題も残されている。今後、マウスモデルでのさらなる詳細な解析をすすめていくとともに、臨床例での解析も進める予定としている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura Y, Abe M, Kawasaki K, Miyake T, Watanabe T, Yoshida O, Hirooka M, Matsuura B, Hiasa Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Depletion of B cell-activating factor attenuates hepatic fat accumulation in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 977
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-37403-y	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 Yoshida N, Miyake T, Yamamoto S, Furukawa S, Senba H, Kanzaki S, Koizumi M, Ishihara T, Yoshida O, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Kitai K, Matsuura B, Hiasa Y	4. 巻 58
2. 論文標題 The serum creatinine level might be associated with the onset of impaired fasting glucose: a community-based longitudinal cohort health checkup study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 505-510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.0760-18	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 Imai Y, Yoshida O, Watanabe T, Yukimoto A, Koizumi Y, Ikeda Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Abe M, Hiasa Y	4. 巻 14
2. 論文標題 Stimulated hepatic stellate cell promotes progression of hepatocellular carcinoma due to protein kinase R activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0212589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0212589	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 Atsukawa M, Tsubota A, Okubo T, Arai T, Nakagawa A, Itokawa N, Kondo C, Kato K, Hatori T, Hano H, Oikawa T, Emoto N, Abe M, Kage M, Iwakiri K	4. 巻 48
2. 論文標題 Serum Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein more reliably distinguish liver fibrosis stages in non-alcoholic liver disease than serum Mac-2 binding protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 424-432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.13046	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 Konishi K, Miyake T, Furukawa S, Senba H, Kanzaki S, Nakaguchi H, Yukimoto A, Nakamura Y, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O, Tokumoto Y, Hirooka M, Kumagi T, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y	4. 巻 299
2. 論文標題 Advanced fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis affects the significance of lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 32-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.atherosclerosis.2020.02.026	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 Miyake T, Miyazaki M, Yoshida O, Kanzaki S, Nakaguchi H, Nakamura Y, Watanabe T, Yamamoto Y, Koizumi Y, Tokumoto Y, Hirooka M, Furukawa S, Takeshita E, Kumagi T, Ikeda Y, Abe M, Toshimitsu K, Matsuura B, Hiasa Y	4. 巻 21
2. 論文標題 Relationship between body composition and the histology of non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12876-021-01748-y	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

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Abe M, Nakamura Y, Miyake T, Watanabe T, Yoshida O, Hirooka M, Hiasa Y
2. 発表標題 B cell activating factor exacerbates unhealthy adipose tissue expansion and liver steatosis during obesity
3. 学会等名 APASL Single Topic Conference on Liver Immunology and Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部雅則、中村由子、日浅陽一
2. 発表標題 B細胞活性化因子 (BAFF) の脂肪性肝疾患への関与と治療標的としての可能性
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部雅則、中村由子、日浅陽一
2. 発表標題 B細胞活性化因子の脂肪性肝疾患の病態への関与
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村由子、阿部雅則、日浅陽一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) における肝脂肪化におけるB細胞活性化因子の役割
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部雅則、中村由子、砂金光太郎、行本敦、今井祐輔、小泉洋平、渡辺崇夫、三宅映己、吉田理、廣岡昌史、松浦文三、日浅陽一
2. 発表標題 B細胞活性化因子がインスリン抵抗性と肝脂肪化に与える影響
3. 学会等名 第5回肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe M, Nakamura Y, Miyake T, Yukimoto A, Imai Y, Koizumi Y, Watanabe T, Yoshida O, Hirooka M, Hiasa Y
2. 発表標題 Increased frequency of myeloid-derived suppressor cells in patients with non-alcoholic fatty liver disease
3. 学会等名 FALK symposium: IBD and Liver (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura Y, Abe M, Sunago K, Yukimoto A, Imai Y, Tanaka T, Watanabe T, Koizumi Y, Yoshida O, Hirooka M, Hiasa Y
2. 発表標題 B-cell activating factor deficiency improves hepatic steatosis in a non-alcoholic fatty liver disease mouse model
3. 学会等名 AASLD Liver Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村由子、阿部雅則、三宅映己、渡辺崇夫、小泉洋平、吉田理、小泉洋平、廣岡昌史、日浅陽一
2. 発表標題 B細胞活性化因子の非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスにおける肝脂肪化への影響
3. 学会等名 第38回Cytoprotection研究会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------