

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16205

研究課題名(和文) 脂肪組織由来分泌タンパク質による肝マクロファージ機能制御とNASH病態への関与

研究課題名(英文) Regulation of macrophage function by adipose derived secreted protein and its involvement in NASH

研究代表者

黒田 雅士 (KURODA, Masashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任助教

研究者番号：00803579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：過剰の内臓脂肪蓄積は肝臓における慢性炎症・線維化を悪化させ、非アルコール性肝炎(NASH)病態の進行に関与する。本研究では肥満マウス脂肪組織のDNAマイクロアレイ解析より分泌タンパク質MFG-E8(Milk fat Globule EGF-8)を同定し、そのNASH病態への関与を検討した。MFG-E8欠損マウスを用いてNASHモデルマウスを作成したところ、肝臓における炎症性サイトカイン発現の低下、浸潤したマクロファージの減少、繊維化の程度や病理スコアの改善、平均生存期間の延伸などが観察された。以上より、MFG-E8は肝臓での炎症・線維化の状態に影響することでNASH病態に関与すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内臓脂肪型肥満がNASH病態において重要であることは様々な疫学的研究より明らかである。一方でその分子メカニズムは十分に明らかでないため、治療は栄養指導や運動療法など減量を目的としたものであり、NASH病態を直接的に標的としたものは少ない。

本研究によりNASHにおける肝臓-脂肪の分子基盤を明らかとすることは予防法や治療法確立の上で必須である。また、近年ではNASHに起因する肝細胞癌が増加し、最も重要な発がん危険因子は肝線維化である。MFG-E8とNASH線維化との関連を解明する本研究は新たな発癌リスク因子の提示・早期発見に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Excessive visceral fat is known to promote hepatic inflammation and fibrosis, and involved in the progression from simple steatosis to NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis). Based on DNA microarray analysis, we have found that secretory protein, MFG-E8 (Milk fat Globule EGF-8) was highly expressed in white adipose tissue from obese mouse model. In this study, we aimed to investigate the role of MFG-E8 in the pathogenesis of NASH. We created a murine model of NASH with MFG-E8 knocked out mice, and examined hepatic gene expressions and performed histological analysis. In knockout mice, the expressions of pro-inflammatory cytokines, activated macrophage marker genes and type II collagen were suppressed. Histological analysis revealed that macrophages infiltration into liver and hepatic fibrosis were suppressed, and overall disease activity score was significantly improved.

研究分野：代謝栄養学、分子生物学

キーワード：メタボリックシンドローム 肥満 炎症 線維化 NASH アディポサイトカイン

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの肝病変として非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease) は国民の 20~40%が罹患する国民病である。さらに 10~20%の NAFLD は進行性の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: Nonalcoholic steatohepatitis) で単純性脂肪肝と異なり、慢性炎症や線維化を特徴として肝がん発症の重大なリスクとされる。

NASH 肝組織での炎症・高度な線維化は単球由来マクロファージの慢性的な活性化および筋線維芽細胞の細胞外マトリックス (ECM: Extracellular Matrix) 産生が重要である。NASH では高い炎症性を有した M₁ が増加しており、TNF- α 、TGF- β や PDGF 等を分泌する。これらサイトカインは炎症の増悪に関与するとともに肝星細胞 (HSC: Hepatic Stellate Cells) を筋線維芽細胞へ分化させ、ECM 産生を促進させる。

肝マクロファージの活性化機序として近年細胞死が注目される。NASH では過剰脂肪蓄積とともに種々のストレスで肝実質細胞が細胞死に陥る。生じた死細胞はマクロファージなどによる貪食によって排除されると考えられ、実際に NASH 肝組織内では貪食途中のマクロファージが死肝細胞周囲を取り囲んだ貪食巣 (hCLS: hepatic Crown-Like Structure) 構造が多数観察される。さらに興味深いことに hCLS 構造周囲では活性化線維芽細胞やコラーゲン沈着などが観察される。すなわち hCLS はマクロファージ-死細胞の相互作用の場であり、死細胞は貪食によって直接的にマクロファージを活性化することで炎症や線維化を誘導し単純性脂肪肝から NASH 進展を規定することが推察される (*Sci Rep.* 7: 44754, 2017. *PLoS ONE.* 8: e82163, 2013.)。

NASH 患者の 90%以上に内臓脂肪肥満が認められることなどから、内臓脂肪型肥満は NASH の重要な増悪因子と認識される。肥大した脂肪組織より放出される過剰の脂肪酸が門脈を介して肝臓へ流入し脂肪肝を形成すると考えられている。一方で、肝炎症や線維化は脂肪肝の程度で調整してもなお内臓脂肪量と関連が認められることから、肝臓の脂肪蓄積とは独立した機序の存在が推察される。肥満脂肪組織由来の因子が血流を介して肝臓に作用し線維化を制御していること想定されるが、詳細は明らかでない。特に肝線維化の起点ともいべきマクロファージ-死肝細胞クロストークに対する影響は全く不明である。

2. 研究の目的

申請者は以前に、分泌タンパク質 MFG-E8 (Milk fat Globule EGF-8) が肥満マウスの脂肪組織で特異的に誘導されることを発見した。MFG-E8 は主にマクロファージ等から分泌され、死細胞の貪食を制御する。死細胞は "Eat me (私を食べて)" シグナルとして細胞表面にホスファチジルセリンを表出させるが MFG-E8 はこのホスファチジルセリンに特異的に結合する。同時にマクロファージ表面のインテグリンと結合することで MFG-E8 は M₁ による死細胞の認識・貪食を促進させる (*Nature.* 437: 754-758, 2006)。以上のように MFG-E8 はマクロファージ-死細胞の相互作用を仲介することから、NASH の慢性炎症・線維化に関与している可能性が考えられた。

本研究では肥満した際に増加する脂肪組織由来 MFG-E8 が肝臓 M₁ 活性化および線維化促進に係るとする仮説の下、NASH 病態形成における脂肪組織の役割を分子レベルから解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) STAM®-NASH モデルマウスの作製

本研究では NASH モデルとして STAM®マウスを使用した。出生後 48 時間の仔マウスにストレプトゾトシンを皮下投与し (200 μ g/animal) 離乳 (4 週齢) 時より高脂肪食 HFD60 (オリエンタル酵母) を給餌した。高脂肪食を給餌開始後 4 週間で肝組織における炎症・線維化、脂肪蓄積の所見、血清 AST/ALT 濃度上昇を確認している。特に断りのない限り、実験には 4 週間高脂肪食を給餌したマウスを使用した。

試験中はマウスの状態に留意し、活動量の著しい低下または体重の著明な減少 (-25%/7 日間以上) をエンドポイントとした。

(2) 肝組織の病理学的解析

STAM®-NASH モデルマウスより摘出した肝組織をホルマリン固定・包埋・薄切後、以下のように染色・解析に用いた。

NAFLD Activity Score (NAS)

HE 染色後、顕微鏡で観察し「脂肪肝」(40 倍視野観察領域における脂肪肝の面積に応じて 0~3 点)、「実質炎」(200 倍観察視野における免疫細胞の集積個数 0~3 点)、「風船様変性」(200 倍観察視野における変性した細胞の個数 0~2 点) の 3 項目で評価した。評価はすべてブラインド試験にて実施した。

Sirius Red 染色

Direct Red 染色液 (Sigma, 365548) に薄切切片を浸漬した。200 倍視野にて観察・画像取得後、画像解析ソフト ImageJ にて染色面積% (染色面積/観察視野面積 × 100) にて定量した。

F4/80 免疫染色

一次抗体に anti-F4/80 (BioRad, MCA497GA)、二次抗体に Goat anti-Rat (KPL, 14-16-12) を使用し、DAB を基質とした免疫染色を行った。200 倍視野にて観察・画像取得し、観察視野中の F4/80 陽性細胞数をカウントした。評価はブラインドにて実施した。

(3) イムノブロット

採取した組織は RIPA lysis buffer にてホモジナイズし、タンパク質試料として解析に供した。血清は超遠心 (100,000G-60min) にて得られたペレットを RIPA lysis buffer に溶解させた。

得られたタンパク質試料は SDS-PAGE で電気泳動した後、Immobilin-P メンブレン (Millipore, IPVH00100) に転写した。転写したメンブレンは 5% スキムミルクによるブロッキングし、TBS-T buffer (Tris-buffered saline containing 0.05% Tween20) にて希釈した一次抗体で一晩 4 にてインキュベートした。反応後のメンブレンは TBS-T で洗浄後、同じく TBS-T で希釈した二次抗体で室温 1 時間反応させ、Clarity Western ECL substrate (BioRad, # 1705060) を用いて検出した。一次抗体に anti-MFG-E8 (R&D systems, AF2805)、二次抗体に anti-goat (Zymed, 61-1620) を使用した。

(4) 細胞培養実験

6 ~ 12 週齢の野生型または MFG-E8 欠損マウスに 3% チオグリコレートを腹腔内投与し (2ml/animal)、72 時間後、腹腔内マクロファージの回収を行った。培養皿に播種して 1 時間培養し、接着したものを使用した。

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより MFG-E8 を欠損させたマウス肝細胞 Hepa1c1c7 細胞はスタウロスポリン 0.1 μM で処理し、24 時間の細胞を腹腔より抽出したマクロファージと共培養させた。

4. 研究成果

(1) STAM[®]-NASH モデルマウスにおける MFG-E8 発現解析

野生型 STAM[®]-NASH モデルマウスの各組織における MFG-E8 発現をリアルタイム PCR により定量したところ、高脂肪食を給餌したのみのマウス (コントロール) に比べて精巣周囲を中心とした白色脂肪組織において顕著な発現誘導が観察された。

さらに同じマウスを用いて血清中 MFG-E8 をイムノブロット法により定量したところ、STAM[®]-NASH モデルマウスにおける MFG-E8 の顕著な増加が確認された。

(2) 組織病理学的評価

野生型および MFG-E8 ヘテロ/ホモ欠損マウスを用いて STAM[®]-NASH モデルマウスを作製し、摘出した肝組織を染色し解析に用いた。

HE 染色後、NAS による疾患活動度の評価を実施したところ、MFG-E8 ヘテロ/ホモ欠損マウスの NAS スコアは野生型のそれに比べて優位に低く、特に炎症および風船様変性スコアの顕著な改善が認められた。一方で脂肪肝の程度に差は認められず、肝組織重量なども各遺伝子型で同程度であった。

さらに Sirius Red 染色により肝線維化評価を行うと野生型マウスに比べてヘテロ/ホモ欠損マウスでは Sirius Red 陽性面積の縮小が観察され、肝線維化の改善が認められた。

また、肝臓へ浸潤してくるマクロファージについて F4/80 免疫染色により定量したところ、野生型マウスに比べて欠損マウスでは F4/80 陽性細胞が顕著に減少しており hCLS 構造もほとんど認められなかった。

なお飼育期間中、体重の推移や血糖値について遺伝子型による違いは認められず、剖検時の各組織重量も野生型と欠損マウスで差は認められなかった。

(3) 肝組織遺伝子発現解析

各遺伝子型 STAM[®]-NASH モデルマウスより摘出した肝組織についてリアルタイム法による遺伝子発現解析を実施した。

STAM[®]-NASH モデルマウスの肝臓ではコントロールに対して炎症性サイトカイン (TNF、IL1、IL6、MCP1 など) や活性化マクロファージマーカー (CD11c)、I 型コラーゲンなどの遺伝子の発現が顕著に増加する。一方で MFG-E8 ヘテロ/ホモ欠損マウスではこれら遺伝子の発現が野生型 STAM[®]-NASH マウスに比べて優位に減弱していた。

(4) 長期的予後の評価

本研究にて採用した STAM[®]-NASH モデルマウスは長期飼育することにより、肝臓の著明な繊維化・肝がんを発症する。NASH/肝細胞癌の長期的予後に対する MFG-E8 の影響を評価する目的で STAM[®]-NASH モデルマウスにおける生存試験を実施した。

野生型マウスでは生存期間の中央値は 65 日で離乳後 90 日程度で全例死亡するのに対し、MFG-E8 ホモ欠損マウスでは生存日数中央値が 83 日で最長生存期間が 150 日であった。現在、肝細胞癌形成における MFG-E8 の意義について長期飼育 STAM-NASH マウスの肝腫瘤数、肝腫大などの項目を検討している。

(5) マクロファージ-肝細胞共培養実験

MFG-E8 欠損マウスより腹腔マクロファージを抽出してプレーティングした。そこへスタウロスポリン処理によってアポトーシスを誘導した MFG-E8 欠損マウス由来培養肝細胞 Hepa1c1c7 細胞を加えて共培養させた。培地中にリコンビナント MFG-E8 を添加し、マクロファージ-肝細胞相互作用における MFG-E8 タンパク質の影響について評価した。

MFG-E8 欠損マクロファージに対するアポトーシス肝細胞の添加は MCP1、TNF などの炎症性サイトカイン発現を顕著に誘導した。この時 MFG-E8 リコンビナントを培地中に加えておくと、これら炎症性サイトカイン発現のさらなる増強が観察された。

以上より、MFG-E8 は肝組織における炎症及び繊維化状態の形成に関与し、NASH 病態の進展に関わるものと示唆された。本研究をさらにすすめることにより、「MFG-E8 を標的とした NASH 治療・予防法の確立」や「MFG-E8 の肝線維化バイオマーカーとしての利用」など臨床応用への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Harada Nagakatsu, Hatakeyama Adzumi, Okuyama Maiko, Miyatake Yumiko, Nakagawa Tadahiko, Kuroda Masashi, Masumoto Saeko, Tsutsumi Rie, Nakaya Yutaka, Sakaue Hiroshi	4. 巻 502
2. 論文標題 Readthrough of ACTN3 577X nonsense mutation produces full-length α -actinin-3 protein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 422 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.193	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 Chikugo Momoko, Sebe Mayu, Tsutsumi Rie, Iuchi Marina, Kishi Jun, Kuroda Masashi, Harada Nagakatsu, Nishioka Yasuhiko, Sakaue Hiroshi	4. 巻 65
2. 論文標題 Effect of Janus kinase inhibition by tofacitinib on body composition and glucose metabolism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 166 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.65.166	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 Bando Masahiro, Masumoto Saeko, Kuroda Masashi, Tsutsumi Rie, Sakaue Hiroshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Effect of olive oil consumption on aging in a senescence-accelerated mice-prone 8 (SAMP8) model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 241 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.66.241	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 Kuroda Masashi, Onoyama Rumi, Sasaki Waka, Sebe Mayu, Kitamura Tadahiro, Masumoto Saeko, Tsutsumi Rie, Harada Nagakatsu, Sakaue Hiroshi	4. 巻 525
2. 論文標題 DNA methylation status influences insulin-induced glucose transport in 3T3-L1 adipocytes by mediating p53 expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 39 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.038	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masashi Kuroda, Etsuko Ishikawa, Naho Ugawa, Saeko Masumoto, Rie Tsutsumi, Nagakatsu Hrada, Hiroshi Sakaue
2. 発表標題 Adipose tissue-derived protein, MFG-E8, regulates chronic inflammation and obesity-related liver disease
3. 学会等名 第91回 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 雅士、阪上 浩
2. 発表標題 肥満病態形成におけるIRF7の二つの役割
3. 学会等名 第39回 日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masashi Kuroda
2. 発表標題 Adipose tissue-derived protein, MFG-E8, regulates chronic inflammation and obesity-related liver disease
3. 学会等名 Asia-Pacific Diabetes and Obesity Study Group symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川端 康代、黒田 雅士、石川 悦子、宇川 菜穂、佐々木 和佳、升本早枝子、堤 理恵、阪上 浩
2. 発表標題 肥大化脂肪細胞における転写因子IRF7の同定と生理的役割の検討
3. 学会等名 第39回 日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木 和佳、黒田 雅士、石川 悦子、宇川 菜穂、川端 康代、升本 早枝子、堤 理恵、阪上 浩
2. 発表標題 脱メチル化3T3-L1脂肪細胞のインスリン感受性調節因子の探索
3. 学会等名 第39回 日本肥満学会
4. 発表年 2018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