

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08983

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の病態進展におけるGPR84の意義の検討

研究課題名(英文)The role of GPR84 in NASH

研究代表者

宮澤 崇(Miyazawa, Takashi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30443500

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)：本研究は、NASHの肝臓で観察される慢性炎症や線維化の起点となる特徴的な組織像であるhepatic crown-like structures (hCLS)に着目し、hCLSを形成するマクロファージで高発現しているGタンパク質共役型受容体で中鎖脂肪酸をリガンドとするGPR84のNASHの病態発症・進展における役割の解明を目指したものである。我々が独自に開発したヒトNASH病態と酷似した経過を取る新しいNASHマウスとGPR84KOマウスを用いて、NASHの肝臓における肝細胞死や線維化の進展にGPR84シグナルが関与する可能性を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、糖尿病・肥満などの生活習慣病の増加や超高齢化が進む我が国において、NASHの罹患率が急増している。現在、世界中でNASHの病態進展に関するメカニズムの解明と治療法の開発が精力的にすすめられているが、いまだ有効な治療法が確立しておらず、脂肪肝からNASHを経て癌を発症する一連の病態変化の解明と予防・治療戦略の開発は喫緊の課題である。本研究により、NASHの病態に特徴的なhCLSを形成するマクロファージに発現する中鎖脂肪酸をリガンドとするGPR84シグナルがNASHの病態進展に関与する可能が示唆され、現在治療法のないNASHに対する医学応用の手掛かりが得られた。

研究成果の概要(英文)：Hepatic crown-like structures (hCLS), a characteristic histological structure observed in the liver of NASH are an origin of hepatic inflammation and fibrosis in NASH. We found that the GPR84 receptor, whose ligand is medium-chain fatty acids, is highly expressed in macrophages forming hCLS. To elucidate the role of GPR84 signaling in the pathogenesis and progression of NASH we generated NASH model mice deficient in GPR84. We demonstrated that NASH model mice lacking GPR84 exacerbated hepatocellular death, inflammation, and fibrosis compared to control mice. Using bone marrow transplantation techniques macrophage-specific GPR84-deficient NASH mice were generated and examined the liver phenotype. There are no significant differences in hepatocyte death, inflammation and fibrosis compared to control mice. Using bone marrow-derived macrophages, we demonstrated that macrophages deficient in GPR84 showed enhanced phagocytic activity.

研究分野：内分泌代謝学、糖尿病学

キーワード：NASH 慢性炎症 マクロファージ 線維化 G蛋白質共役型受容体 GPR84 中鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型であり、その一部は肝細胞の壊死・炎症所見から肝線維化を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に進行して肝硬変や肝癌を発症する。我が国の NASH の有病者数は 200 ~ 300 万人と推定されており、糖尿病・肥満などの生活習慣病の増加や超高齢化が進む我が国において、NASH あるいは NASH 肝癌の罹患率が急増している。現在、世界中で NASH の病態進展に関するメカニズムの解明とそれに基づく治療法の開発が精力的にすすめられているが、いまだ有効な治療法が確立しておらず、脂肪肝から NASH を経て肝線維化・肝癌に至る NASH の発症・進展機構の解明と予防・治療法の開発は喫緊の課題である。

我々はこれまで、中枢性摂食調節に關与する melanocortin4 receptor を欠損するマウス (MC4RKO マウス) に高脂肪食を負荷して、脂肪肝からヒト NASH に酷似した肝病理組織像を経てほぼ全例が肝癌を発症する新しい NASH マウスの開発に成功した (Am. J. Pathol. 179: 2454-2463, 2011)。また、NASH マウスや NASH 患者の肝臓において、過剰なストレスにより細胞死をきたした肝細胞をマクロファージが取り囲む特徴的な形態を示す組織像として hepatic crown-like structure (hCLS) を世界に先駆けて同定し、NASH の発症過程で hCLS が起点となって炎症の慢性化と線維化が生じることを明らかにした (PLoS ONE 8: e82163, 2013)。さらに、hCLS を構成するマクロファージが主に常在性マクロファージに由来し、細胞死に陥った肝細胞との相互作用によって CD11c 陰性から CD11c 陽性に形質変換して線維化を促進すること、CD11c 発現制御下にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現する CD11c-DTR マウスを用いて CD11c 陽性細胞を消去すると、hCLS の形成や肝線維化が抑制されることを見出した (JCI Insight 2: e92902, 2017)。以上の研究成果から、hCLS を起点として細胞死に陥った肝細胞を取り囲む CD11c 陽性マクロファージの機能異常が、NASH における慢性炎症や線維化といった病態進展に重要である可能性が想起された。そこで NASH マウスの肝臓から CD11c 陽性と CD11c 陰性のマクロファージを別々に単離し、野生型マウスの肝臓から単離したマクロファージとともにマイクロアレイ解析を実施し、その中から、創薬ターゲットとして重要な G タンパク質共役型受容体を中心に、NASH マウスのマクロファージで野生型と比較して発現が増強し、CD11c 陽性と陰性のマクロファージで発現に差が見られたものを検索したところ、GPR84 が抽出された。

GPR84 は C9-C14 の中鎖脂肪酸をリガンドとする Gi 共役型受容体であり、単球、マクロファージ、好中球など血球系の細胞に高発現する (J. Leukoc. Biol. 69: 1045-1052, 2001, J. Biol. Chem. 281: 34457-34464, 2006, J. Biol. Chem. 288: 10684-10691, 2013)。これまでの研究により、GPR84 の遺伝子発現は、高脂肪食を負荷した脂肪組織 (FEBS Lett. 586: 368-372, 2012)、動脈硬化病変の炎症性マクロファージ (Circ. Res. 107: 737-746, 2010)、リポポリサッカライド (LPS) 刺激下の単球・マクロファージで増加する。また、中鎖脂肪酸などのリガンド刺激により LPS 誘導性の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-12, IL-8) が増加し、マクロファージの遊走能や貪食能が促進する (Front. Immunol. 9: 1419, 2018)。一方、GPR84 ノックアウト (GPR84KO) マウスの T 細胞では抗炎症性サイトカインである IL-4 分泌が亢進していることから (Immunol. Lett. 101: 144-153, 2005)、GPR84 シグナルは肥満などの慢性炎症状態において誘導され、炎症を促進しマクロファージ機能を制御するシグナルであると考えられる。以上のように、マクロファージ機能における GPR84 シグナルの関与が明らかになりつつあるが、メタボリックシンドロームを背景として進展するヒト NASH 病態における GPR84 シグナルの重要性やそのメカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、脂肪肝から NASH を経てほぼ全例が肝癌を発症するヒトの病態に酷似した NASH マウスを用いて、NASH の肝臓において過剰な脂肪蓄積により細胞死に陥った肝細胞を取り囲んで貪食・処理する特徴的な組織像 hCLS を形成するマクロファージに発現する G タンパク質共役型受容体 GPR84 に着目し、NASH の発症・進展機構の解明と医学応用を目指すものである。

3. 研究の方法

実験 1. GPR84KO マウスを用いた NASH マウスの表現型解析

本研究では NASH の病態進展における GPR84 の意義を明らかにするために、NASH マウスと GPR84KO マウスを交配して GPR84 が欠損した NASH マウス (double KO; DKO マウス) を作製し、炎症性サイトカインや肝線維化マーカーの遺伝子発現および、免疫組織学的解析を用いて hCLS の数や肝線維化の程度を定量的に評価する。

実験 2. 骨髄移植によるマクロファージ特異的 GPR84KO マウスを用いた解析

これまでの研究により、GPR84 シグナルはマクロファージに作用している可能性が高い。本研究

では、GPR84KO マウスの骨髄を NASH マウスに移植したマクロファージ特異的 GPR84KO マウスを用いて実験 1 と同様の表現型解析を実施し、GPR84 シグナルがマクロファージで作用するのかを明らかにする。

実験 3. 単離マクロファージを用いた検討

野生型および GPR84-KO マウスから各々骨髄由来マクロファージを単離し、マクロファージのサイトカイン産生能、遊走能および貪食能を評価する。さらに GPR84 のアゴニストを投与して下流シグナルの解析を行うことにより、GPR84 シグナルのマクロファージにおける作用メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

実験 1. GPR84KO マウスを用いた NASH マウスの表現型解析

GPR84KO マウスと NASH マウスの交配により GPR84 が欠損した NASH マウス (DKO マウス) を作製し、高脂肪食負荷を 20 週間負荷した後、肝臓における表現型を検討した。DKO マウスは NASH マウスと比較して体重や摂食量、血糖値などに有意な差を認めなかった (図 1)。DKO マウスは NASH マウスと比較して肝重量が有意に増加し、肝細胞死のマーカーである ALT 値の有意な増加を認めた。一方、単位重量当たりの肝脂肪含有量は DKO マウスで有意に低下していた (図 2)。そこで肝組織を組織学的に解析したところ、DKO マウスは NASH マウスと比較して炎症細胞浸潤や肝線維化の起点となることが知られている hCLS の数が増加傾向にあり、シリウスレッド陽性の面積が有意に増加していた (図 3)。以上の結果から、NASH マウスに GPR84 を欠損した DKO マウスでは、肝細胞死が進み、炎症、線維化が進展する可能性が示唆された。

実験 2. 骨髄移植によるマクロファージ特異的 GPR84KO マウスを用いた解析

DKO マウスで確認された肝臓組織の表現型がマクロファージに発現している GPR84 によるものか否かを明らかにする目的で、骨髄移植によるマクロファージ特異的 GPR84KO マウスを作製した。具体的には、コントロールマウス (GFP マウス) と GPR84KO マウスのそれぞれから採取した骨髄細胞を放射線照射した NASH マウスに移植する実験を行い、1 か月の回復期ののち高脂肪食を 20 週間負荷して、表現型の解析を行った。GFP マウスを移植したコントロールマウスと比較して GPR84KO マウスの骨髄を移植したマクロファージ特異的 GPR84 欠損 NASH マウスの体重や摂食量、血糖値などに有意な差は見られなかった (図 4)。また骨髄細胞特異的 GPR84 欠損マウスでは DKO マウスと異なり ALT の上昇や肝線維化の増悪は見られなかった (図 5)。

実験 3. 単離マクロファージを用いた検討

GPR84 シグナルのマクロファージ機能に対する影響を評価するため、骨髄より調整した単球から M-CSF 添加によりマクロファージに分化誘導してサイトカイン分泌能と貪食能を検討した。野生型マウスから単離したマクロファージを LPS で刺激すると炎症性サイトカインである TNF や MCP-1 の発現が増加する。その際に、GPR84 受容体のリガンドで

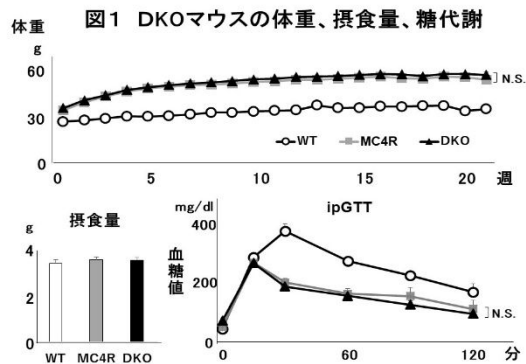


図 2 DKOマウスの肝臓の表現型

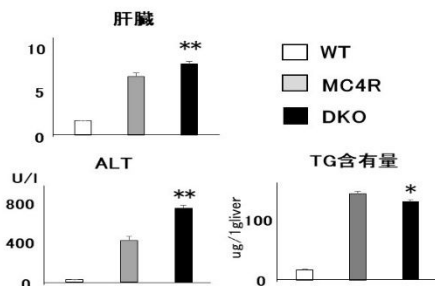


図 3 DKOマウスの肝臓における線維化と炎症細胞浸潤

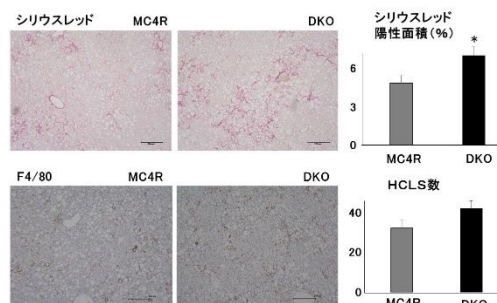


図 4 骨髄特異的GPR84KOマウスの体重、摂食量、糖代謝

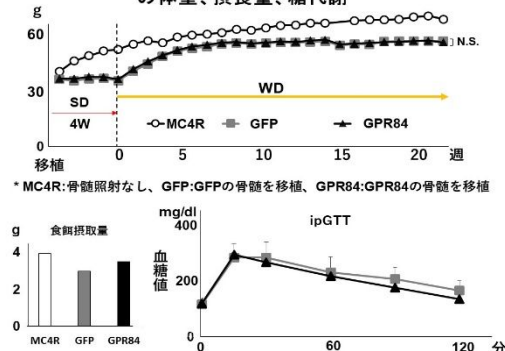
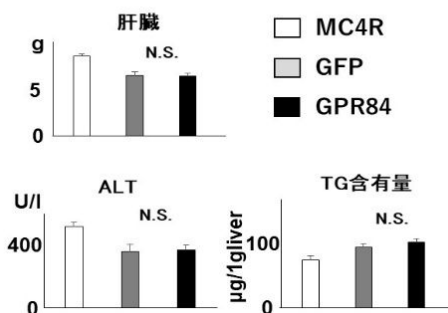


図 5 骨髄特異的GPR84KOマウスの肝臓の表現型



ある 6-OAU を添加しても炎症性サイトカインの分泌能に有意な差は見られなかった（図 6）。さらに野生型マウスと GPR84KO マウスから単離したマクロファージを用いて貪食能を評価したところ、GPR84 欠損マクロファージの貪食能は野生型マウスと比較して有意に増加することが明らかとなった（図 7）。

図6 GPR84アゴニスト投与によるサイトカイン産生

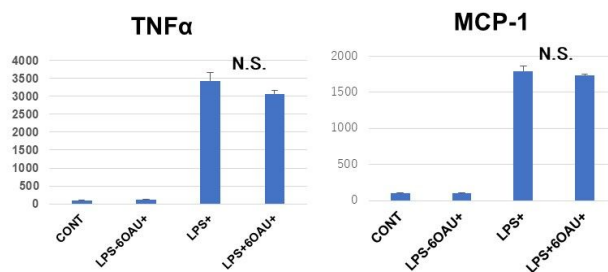
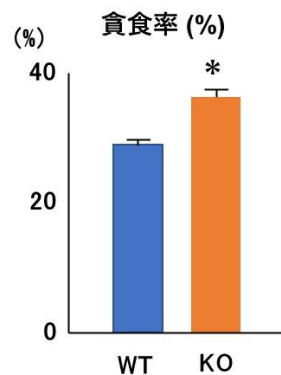


図7 GPR84KOマクロファージの貪食能



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeichi Yukina, Miyazawa Takashi, Sakamoto Shohei, Hanada Yuki, Wang Lixiang, Gotoh Kazuhito, Uchida Keiichiro, Katsuhara Shunsuke, Sakamoto Ryuichi, Ishihara Takaya, Masuda Keiji, Ishihara Naotada, Nomura Masatoshi, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 64
2. 論文標題 Non-alcoholic fatty liver disease in mice with hepatocyte-specific deletion of mitochondrial fission factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetologia	6. 最初と最後の頁 2092 ~ 2107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00125-021-05488-2	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田 尚宏、畑山 朋美、藤田 政道、北村 知美、内田 啓一郎、坂本 竜一、宮澤 崇、小川 佳宏
2. 発表標題 NASH病態形成におけるGPR84シグナルの役割
3. 学会等名 第42回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮澤 崇、武市 幸奈、畑山 朋美、小川 佳宏
2. 発表標題 NASHの病態進展におけるミトコンドリアダイナミクスの意義
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武市幸奈、宮澤 崇、坂本昌平、藤原俊亮、松田やよい、坂本竜一、野村政壽、小川佳宏
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎発症過程におけるミトコンドリアダイナミクスの病態生理的意義
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 政道、宮澤 崇、畑山 朋美、勝原 俊亮、内田 尚宏、北村 知美、寺田英季子、内田 啓一郎、坂本 昌平、小川 佳宏
2. 発表標題 NASHの発症・進展における自然免疫受容体Dectin-2の病態生理的意義の検討
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田 政道、宮澤 崇、畑山 朋美、勝原 俊亮、内田 尚宏、北村 知美、内田 啓一郎、坂本 昌平、小川 佳宏
2. 発表標題 NASHの発症・進展における自然免疫受容体Dectin-2の病態生理的意義の検討
3. 学会等名 第20回日本内分泌学会九州支部学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 内田 尚宏、宮澤 崇、小川 佳宏	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学	

1. 著者名 宮澤 崇、小川 佳宏	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医学出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 月刊糖尿病	

1. 著者名 藤田 政道、宮澤 崇、小川 佳宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 6
3. 書名 医学のあゆみ	

1. 著者名 宮澤 崇、小川 佳宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 6
3. 書名 生体の科学	

1. 著者名 宮澤 崇、小川 佳宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 先端医学社	5. 総ページ数 4
3. 書名 炎症と免疫	

1. 著者名 宮澤 崇、小川 佳宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 別冊BIO Clinica 慢性炎症と疾患	

〔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
---------	---------