

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 1 9 日現在

機関番号： 3 2 6 2 0

研究種目： 若手研究

研究期間： 2019 ~ 2021

課題番号： 1 9 K 1 7 4 7 4

研究課題名 (和文) 脂肪肝炎関連疾患の病態形成における好中球細胞外トラップ (NETs) の役割

研究課題名 (英文) The Role of neutrophil extracellular trap (NETs) in the pathogenesis of steatosis-related diseases

研究代表者

深田 浩大 (Fukada, Hiroo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号： 2 0 7 2 7 4 8 2

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) : 本研究では既存の論文を参考にしてELISA法による血清中のNETsの測定系を用い、各種アルコール性肝障害モデルマウス (NIAAAモデル、エタノール経口投与後LPS腹腔内投与、NIAAAモデルにコンカナバリン投与マウス) を作製してNETsを測定したが検出は乏しかった。今後更なる検証が必要である。臨床検体として重症型アルコール性肝炎からNETsの産生を認めたものの、アルコール性急性肝炎患者の検体からはNETsは検出されなかった。本研究では安定的なNETsの産生を検出できなかったため他の測定系の開発や肝組織での測定を検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の慢性的な炎症は線維化を引き起こし、肝予備能を低下させ肝不全に至る。NETosisは好中球を中心とした炎症細胞が中心静脈に炎症を起こすアルコール性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎の病態形成に重要な役割を果たしている可能性がある。本研究ではNETosisの定量法を用い、各種アルコール性肝障害マウスや患者の血清を測定した。肝障害においてNETosisの関与を示した。本研究において得られた成果は、肝炎の病態形成にNETosisが関与している可能性を示唆しており、病態解明や創薬の開発に寄与する可能性があり、学術的、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we established a measurement system for NETs in serum by ELISA, referring to existing papers. We measured NETs in various mouse models of alcoholic liver injury (NIAAA model, mice treated with oral ethanol followed by intraperitoneal LPS, and NIAAA model with concanavalin), but the detection of NETs was poor. We need to further investigate the cause of the weak detection of NETs. As for clinical specimens, the production of NETs was observed in serum from patients with severe alcoholic hepatitis, but NETs were not detected in serum from patients with acute alcoholic hepatitis. Since stable production of NETs could not be detected in this study, it is necessary to consider the development of other measurement systems and measurement in liver tissue.

研究分野： 消化器病学

キーワード： NETs NETosis 脂肪肝 NASH NAFLD アルコール性肝炎

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景好中球は自然免疫において、感染部位に遊走し、細菌などの微生物に接触すると活性化して細菌を貪食することにより感染防御のうえで大きな役割を担っている。しかし、対象が大きすぎて貪食だけでは微生物を十分に排除できない場合、活性化した好中球が核内のクロマチンと結合した抗菌たんぱく質を細胞外に放出することにより生体を防御していることが2004年に発見された (Brinkmann et al, Science 303:1532-1535, 2004)。この好中球によるクロマチン網を放出する免疫応答は NETs; neutrophil extracellular traps と呼ばれ、NETs は網状となり局所に留まり、細菌を捉える。補足された細菌は好中球やマクロファージに貪食されやすくなるばかりでなく、NETs そのものにも殺菌作用がある (Parker et al, J. Leukoc. Biol 91: 369-376, 2012)。NETs では細胞の生存に必要な DNA を放出するため、NETs を放出した好中球はそのまま細胞死に至る。ネクロシスやアポトーシスとは異なる全く新しい細胞死の過程であり、NETosis と命名された。NETosis 発生の機序には酸化ストレスの増加が関与していると考えられ、これまでに敗血症の病態における NETosis の活性が証明されている。アルコール性肝障害 (ALD) は過剰飲酒による肝障害の総称だが、常習飲酒者が大量飲酒をすることで激しい肝炎を生じ、重症化すると速やかに急性肝不全に至るアルコール性肝炎や、強い炎症を生じずに緩徐に進行し、最終的に肝硬変に至るアルコール性肝線維症が含まれる。これらの病態は飲酒習慣の変遷によって動的に推移し、長期にわたると肝硬変・肝癌へと進行する。ALD はアルコール依存症と密接にかかわっており、断酒ができれば予後改善が見込めるが、それが出来ない症例については有効性が証明された治療法はほとんどなく、極めて予後不良である。重症急性アルコール肝炎ではサイトカインストームと呼ばれる猛烈な免疫過剰反応を呈し、臨床ではステロイドによって非特異的に炎症を抑制して病態を改善させる試みが行われているが、アルコール性肝炎では外敵に対する免疫防御力はむしろ極度に減弱しており、ステロイド治療が感染症のリスクをさらに上昇させてしまうことが大きな問題点になっている。近年では、肥満・糖尿病を背景に発症し、有意な飲酒歴がないにも関わらず ALD に酷似した肝病理像を呈する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH; nonalcoholic steatohepatitis) が広く知られるようになった。NASH は慢性的な経過をたどり、肝硬変・肝癌をきたすことが明らかになっているが、NASH も有効な薬物療法は確立されていない。

ALD と NASH に共通した病理像の特徴として、大滴性の脂肪変性、肝細胞の風船様膨化、肝細胞を取り囲むような特徴的な肝線維化像に加えて、好中球を中心とした炎症細胞浸潤がある。これは、リンパ球を主体としたウイルス性肝炎の病理像とは対照的である。ALD と NASH、いずれにおいても好中球は中心静脈周囲の風船様変性した肝細胞を囲むように浸潤し、炎症形成の中心的役割を果たしていると考えられる。ALD と NASH の病態形成機序はまだ十分に明らかになっていないが、腸内細菌由来の因子 - 病原体関連分子パターン - (PAMPs; pathogen-associated molecular patterns) が経門脈的に肝臓に到達し、炎症細胞の活性化をきたす機序が注目されている。また、ALD と NASH いずれも肝細胞障害を示す風船様変性をきたすことから、細胞死に至った肝細胞から放出される因子 - 傷害関連分子パターン - (DAMPs; damage-associated molecular patterns) も炎症増悪に寄与している可能性も考えられている。PAMPs、DAMPs のいずれも肝在住マクロファージのクッパー細胞を活性化させ、肝炎の増悪に寄与することが示されている。しかし、ALD および NASH の病態形成において好中球が優位に活性化する機序については十分に解明されておらず、NETosis が果たしている役割については全く不明である。

2. 研究の目的

本研究ではヒトを対象とした研究で ALD および NASH の病態における NETosis の関与を明らかにすると共に、ALD および NASH のモデルマウスを用いて NETosis の肝病態に関与する機序を解明することを目的とする。さらに、ヒトの研究では ALD および NASH 治療反応性と予後と NETosis の関連性を検証し、動物モデルでは NETosis を標的とした治療の可能性についての実験を行う。

NETosis と病態への関与はほとんど不明といってよく、本研究は NETosis と ALD および NASH といった非ウイルス性脂肪性肝疾患と NETosis の関連をみる全く新しい試みで、極めて独自性の高いものである。ALD、NASH のいずれも病態の解明が不十分で、かつ薬物療法が確立しておらず、本研究で NETosis との関連が明らかになれば、重症化予防、予後予測、新規治療、創薬研究への応用が期待できる。申請者が所属している研究グループでは、20 年来の ALD

および NAFLD の病態を研究しており、特に腸管由来の細菌叢関連因子による肝病態の形成機序の研究についての第一人者であり、これまでの豊富なデータの蓄積を元にした、当研究グループならではの研究である。

3. 研究の方法

NETs はミエロペルオキシダーゼおよび好中球エラスターゼと DNA の複合体として、サンドイッチ ELISA で検出できる。ポジティブコントロールとして、白血球株 HL-60 を Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)で刺激し NETosis を誘導したものをを用いる。

ヒトを対象とした NETosis の評価

ALD および NASH 患者の血清を用いて、血清中の NETs を検出する。肝生検の組織像との関連、特にミエロペルオキシダーゼ染色で好中球浸潤を確認し、肝組織中の白血球浸潤と血清中 NETs との関連性を評価する。肝障害の活動性および薬剤反応性、予後などの臨床情報および臨床経過と NETs との関連性を解析し、ALD および NASH における NETs の意義を明らかにする。

動物モデルを用いた NETosis の評価(急性期モデル): アルコール性急性肝障害モデルとしては、野生型マウスに Lieber-Decarli エタノール含有食を与え、慢性的エタノール暴露状態とした後にリボポリサッカライド(LPS)を腹腔内投与して重症急性アルコール性肝炎モデルとする。各動物モデルから血清を採取し、NETs 産生を測定する。

動物モデルを用いた NETosis の評価(慢性モデル): アルコール性肝障害モデルマウスとしては野生型マウスに Lieber-Decarli エタノール含有食を与え、慢性的エタノール暴露状態とした上で経胃管投与で高濃度のエタノールを注入して肝障害を惹起する。十分な NETosis が惹起されなかった場合は、週 1 回、繰り返し高濃度エタノールの注入を行う。NASH モデルマウスとしては肥満糖尿病モデル KK-Ay マウスに高脂肪食を与え脂肪性肝炎を惹起する。NASH 発癌モデルとしては STAM マウス(ストレプトゾトシン+高脂肪食モデル)を用いる。各動物モデルから血清を採取し、NETs 産生を測定する。

4. 研究成果

2019 年度は、既存の論文を参考に ELISA 法による血清中の NETs の測定系を確立した。アルコール性肝障害モデルマウスである NIAAA モデルを作成し NETs を測定したが検出は乏しかった。

2020 年度は、エタノール経口投与後 LPS 腹腔内投与による急性肝障害モデルマウス、アセトアミノフェン肝障害モデルマウス、NIAAA モデルにコンカナバリンの静脈投与による肝炎モデルマウスを作成し血清中の NETs を測定したが検出は乏しかった。

臨床検体としては入院適応となるような重篤な肝機能障害を呈した患者の血清の収集を継続した。背景肝疾患についてはアルコール性肝炎だけでなく対象としてウイルス性肝炎なども含まれている。それらの患者血清を用いて、臨床検体における NETs 産生を ELISA 法で定量的に測定し評価した。重症型アルコール性肝炎患者の一例から NETs の産生を認めたものの、アルコール性急性肝炎患者の検体からは NETs は検出されなかった。

2021 年度は、前年度までに作成した肝障害モデルマウスの肝組織を用い、好中球の指標となるラット抗マウス Ly6b 抗体、および NETs の指標となるシトルリン化ヒストン H3(ウサギ抗 CitH3 抗体)を用いた免疫染色を試みた。肝組織での NETosis の免疫染色の既報はなく検出は困難であった。

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