

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06877

研究課題名(和文) Ym1陽性単球由来マクロファージによる肝線維症の進展機序解明

研究課題名(英文) Development of liver fibrosis by monocyte-derived macrophages

研究代表者

浅野 謙一 (ASANO, Kenichi)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10513400

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)：MASHの肝臓に浸潤した単球で最も発現の亢進する転写因子Egr2を同定した。単球・マクロファージでEgr2を欠損したマウス(Egr2-cKOマウス)では、単球由来マクロファージに占める線維化促進サブセットhLAMの割合が減少し、MASHの肝線維症が改善した。さらに、長鎖飽和脂肪酸がマクロファージのEgr2発現を促進すること、一方で長鎖不飽和脂肪酸が飽和脂肪酸によるEgr2亢進を抑制することを発見した。オレイン酸をMASHマウスに経口投与することで、MASHの肝臓単球由来マクロファージに占める線維化促進サブセットの割合を速やかに減少させ、しかも肝線維症を改善することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、単球からマクロファージへの分化をコントロールする転写因子と環境因子が同定できた。Egr2によって誘導される単球由来マクロファージのサブセットが肝線維症の増悪に関与することを生体レベルで証明し、MASH進展における単球由来マクロファージの役割は何かという肝臓病学の課題に解答することができた。オレイン酸を2週間経口投与することで、線維化マクロファージの割合を減少できることを示した。この研究成果は、単球 長鎖飽和脂肪酸 Egr2経路を標的とした肝線維症への介入療法開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found a long chain saturated fatty acid-Egr2 pathway controls the progression of MASH in mice. The transcription factor Egr2 drives the differentiation of monocytes into hepatic lipid-associated macrophages (hLAMs) within MASH liver. Egr2-deficiency biases monocyte differentiation towards a macrophage subset resembling resident Kupffer cells, hampering hLAM formation. This shift suppressed the transition from benign steatosis to liver fibrosis, demonstrating the critical pro-fibrotic role played by hLAMs in MASH pathogenesis. Long chain saturated fatty acids that accumulate in MASH liver enhanced Egr2 expression in macrophages, a process counteracted by unsaturated fatty acids. Oral oleic acid administration promptly and effectively reduced hLAMs in MASH mice. In summary, our work highlights the therapeutic promise of targeting the saturated fatty acid-Egr2 axis in monocytes for MASH management.

研究分野：免疫学

キーワード：MASH 代謝障害関連脂肪肝炎 EGR2 マクロファージ 単球 肝線維症 長鎖脂肪酸 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝線維症には、骨髄単球に由来するマクロファージが深く関与すると言われている。線維化を促進するマクロファージは、肝線維症の治療標的として有力であるが、炎症状態の肝臓には性質の異なる複数のマクロファージが混在し、それらを識別する分子基盤が確立していないため、線維化機序解明が進んでいなかった。申請者は以前に、線維化や組織修復を担うマクロファージのもととなる Ym1 陽性単球が、炎症後期の骨髄で産生されることを発見した。次いで、代謝障害関連脂肪肝炎(MASH)の線維化進行期に、肝臓に浸潤する単球の Ym1 発現が著明に亢進することを見出した。

2. 研究の目的

Ym1 陽性単球から分化するマクロファージが、MASH に伴う線維化を制御するとの考えの元、単球・マクロファージによる線維化機序解明を目指して本研究を開始した。

研究期間の目標として

- ① MASH の病態形成における Ym1 陽性単球の役割の解明
- ② MASH の肝臓における単球からマクロファージへの分化機構解明
- ③ 単球・マクロファージを標的とした、MASH に伴う肝線維症抑制戦略の開発の3点を掲げた。

3. 研究の方法

① Ym1 陽性細胞を可視化したマウス(Ym1-Venus マウス)に、コリン欠乏高脂肪食 CDA-HFD を投与し MASH を誘導した。そのマウスの肝臓における、Ym1 陽性単球の動態や局在を解析し、肝線維症との相関を評価した。

② MASH を誘導したマウスの肝臓単球とマクロファージを RNA-seq 解析し、MASH 誘導時に強発現する転写因子を探索した。当該因子を欠損したマウスを作製し、そのマウスの MASH の病態や、単球・マクロファージの変化を評価した。さらに、単球・マクロファージにおける当該転写因子発現を誘導する環境因子を探索した。

③ 単球からマクロファージへの分化を阻害することで、MASH に伴う肝線維症を抑制できるか検討した。

4. 研究成果

① 当初の予想に反し、MASH を誘導しても肝臓単球に占める Ym1 陽性単球の割合はほとんど増加しなかった。少数の Ym1 陽性単球が何らかの役割を担う可能性を完全には排除できないが、MASH の病態形成における同細胞の関与はかなり小さいと考え、他の単球・マクロファージ亜集団の評価を優先して進めることにした。

② 肝臓に浸潤した単球からマクロファージへの分化をコントロールする転写因子を探索するため、MASH 誘導マウスの肝臓単球とマクロファージの遺伝子発現を RNA-seq 解析した。肝臓浸潤後の単球で最も発現レベルの高い転写因子 Egr2 を同定した(図1左)。単球・マクロファージで Egr2 を欠損するマウス(Egr2-cKO マウス)を作製し、そのマウスの MASH の病態とマクロファージの変化を解析した。Egr2-KO マウスの肝臓における、免疫細胞の構成比は野生型と同程度だったが、MASH に伴う肝線維症は著明に改善した(図1右)。Egr2 欠損時の単球・マクロファージの変化を理解するため、野生型マウスと Egr2-cKO マウスの肝臓自然免疫細胞を一細胞 RNA-seq 解析した。MASH の肝臓では、常在型マクロファージ(クッパー細胞として知られる)がほとんど消失し、単球由来マクロファージで置換される。この単球由来マクロファージは、SAM あるいは hLAM と呼ばれる亜集団と、常在型に類似した

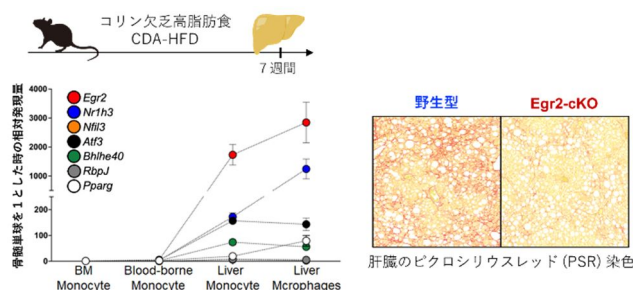
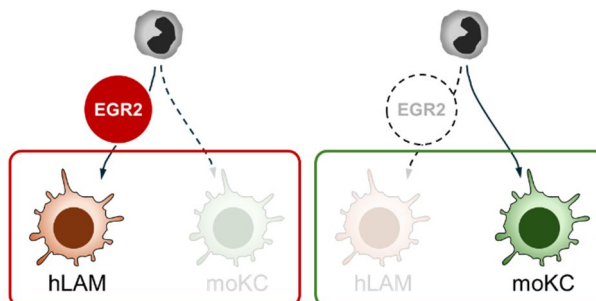


図1 Egr2欠損マウスではMASHに伴う肝線維症が改善する



線維化を促進するマクロファージ

図2 Egr2は単球からhLAMへの分化を促進する

moKC と呼ばれる亜集団で構成されることが分かった。野生型では、単球は hLAM へと優先的に分化するのに対し、Egr2 欠損時には、hLAM への分化が阻害され、分化が moKC へと偏向することを突き止めた(図2)。さらに、hLAM と moKC が、CD11c と Mincle の発現を指標に識別できることを示した。hLAM (CD11c Mincle 二重陽性)は、細胞質に脂肪滴を豊富に抱えた大型の細胞で、moKC(CD11c Mincle 二重陰性)よりも炎症性サイトカイン(TNF- α や IL-6)を高産生した。以上の結果は、転写因子 Egr2 が、肝臓に浸潤した単球から hLAM への分化を促進すること、またそれが MASH に伴う肝線維症の進展に関与することを示す。

③ Egr2 発現レベルは、骨髄ならびに末梢血の単球では低値だが、肝臓に浸潤後の単球で劇的に亢進し、マクロファージに分化する過程でさらに増加する(図1左)。この結果は、Egr2 発現を誘導する何らかの環境因子が MASH の肝臓に存在する可能性を示す。そのような因子の候補として、MASH 患者の肝臓で選択的に増加することが知られている、長鎖飽和脂肪酸に着目した。

長鎖飽和脂肪酸が、Egr2 を誘導する可能性を検証するため、骨髄誘導マクロファージを長鎖飽和脂肪酸(パルミチン酸あるいはステアリン酸)存在下で培養し、Egr2 発現レベルを PCR で定量した。長鎖飽和脂肪酸は、濃度依存的に Egr2 発現を亢進することが分かった。興味深いことに、一価不飽和脂肪酸(パルミトレイン酸やオレイン酸)は、長鎖飽和脂肪酸による Egr2 発現を抑制した。長鎖飽和脂肪酸(オレイン酸)を2週間経口投与した MASH マウスでは、単球由来マクロファージに占める hLAM の割合が減少し、肝臓の線維化が改善した(図3)。

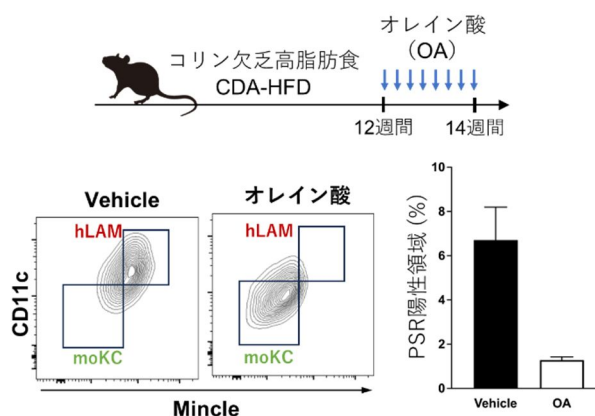


図3 不飽和脂肪酸は単球から hLAM への分化を阻害する

以上一連の研究により、MASH の肝臓に蓄積する長鎖飽和脂肪酸が単球における Egr2 発現を誘導し、それが hLAM への分化を促進すること、hLAM が肝線維症の進展に関与することが明らかになった。また単球由来マクロファージを構成する hLAM と moKC を、CD11c と Mincle という2つの表面分子に基づいて明確に識別し、分取、機能解析、標的化できるようになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ikeda Naok et al.	4. 巻 42
2. 論文標題 The early neutrophil-committed progenitors aberrantly differentiate into immunoregulatory monocytes during emergency myelopoiesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112165 ~ 112165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112165	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 Kurematsu Chihiro, Sawada Masato, Asano Kenichi (他18名、20番目)、Sawamoto Kazunobu	4. 巻 219
2. 論文標題 Synaptic pruning of murine adult-born neurons by microglia depends on phosphatidylserine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20202304	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 -
1. 著者名 Camara Abdouramane, Lavanant Alice C., Abe Jun, Desforges Henri Lee, Alexandre Yannick O., Girardi Erika, Igamberdieva Zinaida, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Hehlhans Thomas, Pfeffer Klaus, Pfeffer S?bastien, Mueller Scott N., Stein Jens V., Mueller Christopher G.	4. 巻 119
2. 論文標題 CD169 ^{<sup>+</sup> macrophages in lymph node and spleen critically depend on dual RANK and LTbetaR signaling}	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108540119	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 Song Xiaojia, Li Na, Liu Yuan, Wang Zehua, Wang Tixiao, Tan Siyu, Li Chunyang, Qiu Chunhong, Gao Lifan, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Liang Xiaohong, Liu Xinyong, Ma Chunhong	4. 巻 15
2. 論文標題 CD169-positive macrophages enhance abscopal effect of radiofrequency ablation therapy in liver cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101306 ~ 101306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101306	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 Honda Fumika, Tsuboi Hiroto, Ono Yuko, Abe Saori, Takahashi Hiroyuki, Ito Kiyooki, Yamada Kazunori, Kawano Mitsuhiro, Kondo Yuya, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Malissen Marie, Malissen Bernard, Matsumoto Isao, Sumida Takayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Pathogenic roles and therapeutic potential of the CCL8?CCR8 axis in a murine model of IgG4-related sialadenitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Research & Therapy	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13075-021-02597-6	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 -

1. 著者名 Friedrich Sarah-Kim, Schmitz Rosa, Bergerhausen Michael, Lang Judith, Duhan Vikas, Hardt Cornelia, Tenbusch Matthias, Prinz Marco, Asano Kenichi, Bhat Hilal, Hamdan Thamer A., Lang Philipp Alexander, Lang Karl Sebastian	4. 巻 10
2. 論文標題 Replication of Influenza A Virus in Secondary Lymphatic Tissue Contributes to Innate Immune Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 622 ~ 622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pathogens10050622	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 Takahashi Naohiro, Kikuchi Hiroaki, Usui Ayaka, Furusho Taisuke, Fujimaru Takuya, Fujiki Tamami, Yanagi Tomoki, Matsuura Yoshiaki, Asano Kenichi, Yamamoto Kouhei, Ando Fumiaki, Susa Koichiro, Mandai Shintaro, Mori Takayasu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi, Arita Makoto, Sohara Eisei	4. 巻 25
2. 論文標題 Deletion of Alox15 improves kidney dysfunction and inhibits fibrosis by increased PGD2 in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02021-y	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 -

1. 著者名 Shibuya Takumi, Kamiyama Asami, Sawada Hirotaka, Kikuchi Kenta, Maruyama Mayu, Sawado Rie, Ikeda Naoki, Asano Kenichi, Kurotaki Daisuke, Tamura Tomohiko, Yoneda Atsuko, Imada Keisuke, Satoh Takashi, Akira Shizuo, Tanaka Masato, Yotsumoto Satoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.663115	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 -

1. 著者名 Iwata Ayaka, Maruyama Juri, Natsuki Shibata, Nishiyama Akira, Tamura Tomohiko, Tanaka Minoru, Shichino Shigeyuki, Seki Takao, Komai Toshihiko, Okamura Tomohisa, Fujio Keishi, Tanaka Masato, Asano Kenichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Egr2 drives the differentiation of Ly6Chi monocytes into fibrosis-promoting macrophages in metabolic dysfunction-associated steatohepatitis in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-06357-5	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ayaka Iwata, Masato Tanaka, Kenichi Asano
2. 発表標題 EGR2 plays a pivotal role in the differentiation of Ly6Chi monocytes into fibrosis-promoting macrophages in non-alcoholic steatohepatitis.
3. 学会等名 第52回 日本免疫学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ayaka Iwata, Masato Tanaka, Kenichi Asano
2. 発表標題 EGR2は単球から線維化促進マクロファージへの分化を促進し、NASHにおける肝線維症を増悪する
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	濱田 理人 (HAMADA Michito) (20567630)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

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