

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590360

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎発症におけるマクロファージ活性化の意義の解明

研究課題名(英文)The significance of activation of macrophage in the development of nonalcoholic steatohepatitis

研究代表者

永井 義夫(Nagai, Yoshio)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：90402718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：4型Toll-like受容体(TLR4)の野生型(C3H/HeN)と変異型(C3H/HeJ)のマウスについて、初代培養肝細胞と腹腔マクロファージ(M $\phi$ )を単離する系を確立し、それぞれ野生型と変異型で2×2の組み合わせで共培養を行い、インスリン刺激に対するAktのリン酸化を検討した。その結果、肝細胞のタイプ、M $\phi$ のタイプに関わらず、共培養環境にするだけで肝インスリン抵抗性が惹起された。この効果はLPSによるM $\phi$ の活性化と無関係に認められた。肝細胞の近傍へのM $\phi$ の遊走が、肝インスリン抵抗性を惹起させる要因と考えられた。本研究により、肝インスリン抵抗性発症におけるTLR4の重要性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We established a nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model in vitro by isolating peritoneal macrophages and primary hepatocytes from the mouse variant of type 4 Toll-like receptor (TLR4) (C3H/HeJ) and its wild-type (C3H/HeN), respectively. The isolated macrophages and hepatocytes were co-cultured with a combination of 2 × 2 in the wild type and the mutant to investigate the phosphorylation of Akt in response to insulin stimulation. Hepatic insulin resistance occurred regardless of the type of hepatocytes and macrophages, simply under the co-cultured environment. These results suggest that the migration of macrophages near the hepatocytes is an essential factor to induce hepatic insulin resistance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・分子病態栄養学

キーワード：NASH TLR4

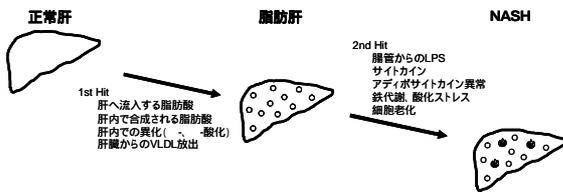
1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis ; NASH) は、肥満、2 型糖尿病、脂質異常症などインスリン抵抗性を背景にもつアルコール非摂取者に発症するアルコール性肝炎と類似した肝病変である。

B 型肝炎、C 型肝炎の感染予防が図られ、今後新規の感染者が激減していくことが予想されることから、ウイルス性肝炎の次の肝臓病の治療目標として注目されている。

現在最も支持されている NASH の発症機序は、最初に脂肪肝がおこり、その後に脂肪肝炎に移行するという Two-hit 仮説である (図 1)。

図 1



これまで我々は、果糖による栄養素に特異的な肝臓での脂質合成誘導機構が存在し、メタボリックシンドロームを誘導することを明らかにしてきた (Shinozaki K et al, Diabetes 1999, Circ Res 2000)。そのメカニズムとして、果糖は肝臓での脂肪合成酵素群の発現を調節する転写因子 Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP)-1 の発現を増加させ de novo の脂肪合成を促進させること (Nagai Y et al, Am J Physiol 2002)、そして SREBP-1 の転写補助因子である peroxisome proliferators activated receptor coactivator (PGC) -1 をノックダウンさせると、果糖誘導性のメタボリックシンドロームが改善したことから、高果糖食によるメタボリックシンドローム発症には、転写補助因子 PGC-1 を介した SREBP-1 の発現上昇が不可欠であることを報告してきた (Nagai Y et al, Cell Metabolism 2009)。

しかし、こうした肥満・インスリン抵抗性誘導食負荷が、短期間かつ高頻度に脂肪肝を誘発した一方で、NASH の特徴である炎症細胞浸潤の誘導は困難であったことから、脂肪肝が NASH にまで進展するには肝細胞内の中性脂肪蓄積に加えて、やはり何らかの新たなファクターが必要であるとの考えに至った。

図 2



アルコール性肝障害の病態の場合、増加した門脈中のエンドトキシンが 4 型 Toll-like 受容体 (TLR4) を介して肝マクロファージである Kupffer 細胞を活性化し、肝臓における TNF の遺伝子発現を増加、炎症・線維化を促進する可能性が示されている (Uesugi T et al, Hepatology, 2001)。

最近の研究により、血中の遊離脂肪酸が代謝産物として肝細胞内で中性脂肪合成の基質となるのみでなく、TLR4 などの膜型受容体を介してシグナルを伝達することが明らかとなってきた (Lee JY et al, J Biol Chem, 2001)。TLR4 は栄養過多に起因する「代謝異常である脂肪肝」と、それに加わる「免疫異常を伴う NASH」とを結び付ける接点となる可能性がある。

2. 研究の目的

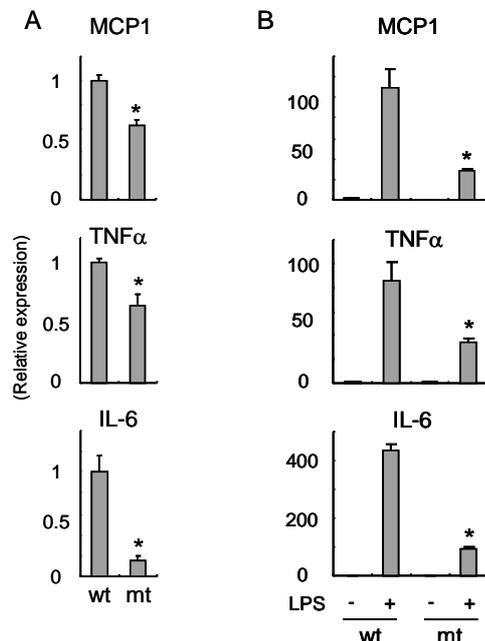
本研究では、TLR4 の天然変異モデルマウスである C3H/HeJ を用いて、NASH 発症におけるマクロファージ活性化の意義およびそのメカニズムを明らかにする。また、肝臓における炎症の惹起による肝インスリン抵抗性への影響も併せて検討を行った。

3. 研究の方法

野生型マウス、TLR4 変異型マウスより腹腔内マクロファージ (M ) および初代培養肝細胞を単離し、それぞれを 4 通りの組み合わせで共培養することにより、in vitro NASH モデル系の確立をした (図 2)。

そして TLR4 のリガンドである LPS 刺激によりマクロファージを活性化させた後、肝細胞と共培養することによって肝細胞に炎症性変化が見られるかどうかを、それぞれの組み

図 3



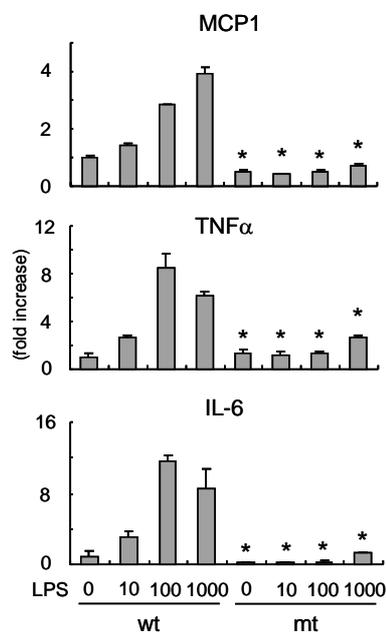
合わせてメディウムと細胞を回収し、ELISA、RT-qPCR法を用いてTNF、MCP-1などの炎症マーカーの遺伝子発現を解析した。また、肝インスリン抵抗性をインスリンシグナル経路であるAktのリン酸化をウエスタンブロット法により解析した。

#### 4. 研究成果

変異型マウスより単離したM $\beta$ では、炎症性マーカーの遺伝子発現が、ベースラインおよびLPS刺激による反応性ともに減弱していた(図3)。

また、変異型マウスより単離した肝細胞でも、LPS刺激に対する炎症性マーカーの遺伝子発現が減弱していた(図4)。

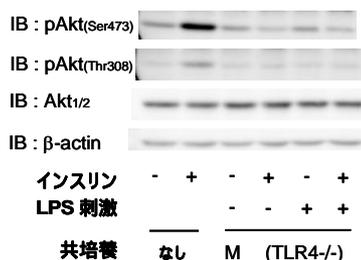
図4



肝インスリン抵抗性についての検討では、単離した肝細胞に直接LPS、TNF $\beta$ 刺激してもインスリン抵抗性は生じなかった。一方、肝細胞とM $\beta$ とを共培養すると、肝細胞、M $\beta$ の種類、またM $\beta$ に対する刺激の有無に関わらず肝インスリン抵抗性が惹起された(図5)。

TLR4変異型では元々M $\beta$ が遊走しにくく、インスリン抵抗性が惹起されにくいですが、強制的に遊走させた条件では、肝細胞の

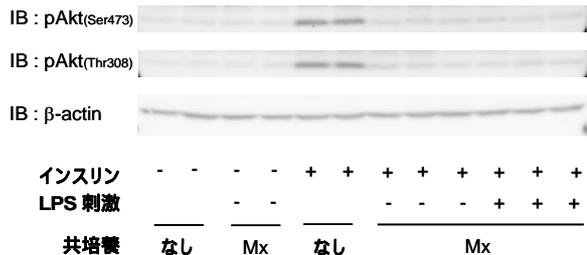
図5A 共培養実験(肝;野生型、M $\beta$ ;変異型)



TLR4の変異の有無に関わらず、肝インスリン抵抗性が惹起されると思われた。

以上より、肝インスリン抵抗性発症にはM $\beta$ 遊走が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また、その遊走にはTLR4が重要な役割を果たしていることが示唆された。

図5B 共培養実験(肝;変異型、M $\beta$ ;変異型)



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

永井 義夫 (Nagai, Yoshio)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号: 90402178

(2)研究分担者

西尾 善彦 (Nishio, Yoshihiko)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号：40281084

(3)連携研究者

吉崎 健 (Yoshizaki, Takeshi)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：20510324