

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 2 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460968

研究課題名(和文)非アルコール性脂肪肝炎におけるMIFの役割とその制御による治療応用

研究課題名(英文)Role of Macrophage migration inhibitory factor in non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

大川原 辰也(OHKAWARA, Tatsuya)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00374257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎においてマクロファージ遊走阻止因子の役割を解析した。非アルコール性脂肪性肝炎モデルとしてメチオニン・コリン欠損食を用い発症させた。マウスの肝臓において脂肪滴が発生しマクロファージ遊走阻止因子の発現増強がみられた。マクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤であるISO-1を継続投与したが肝炎所見の軽減はみられなかった。アセトアミノフェン投与による肝炎にISO-1を投与したところ肝炎の著明な改善を認めた。非アルコール性脂肪性肝炎においてマクロファージ遊走阻止因子は免疫・脂質代謝ではその病態に対して複雑な関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigate the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in non alcoholic steatohepatitis (NASH) using animal model. Methionine and choline-deficient diet(MCD) induces NASH in mice. The expression of MIF was up-regulated in liver of mice given MCD. However, ISO-1, an inhibitor of MIF bioactivity, did not ameliorated the severity of NASH in mice. In another hepatitis model induced by acetaminophene, ISO-1 reduced the severity of liver injury and decrease the level of inflammatory mediator. Taken together, our data suggest that the role of MIF is perplexing in NASH.

研究分野：消化器病学

キーワード：マクロファージ遊走阻止因子 非アルコール性脂肪性肝炎 薬剤性肝障害 コリン・メチオニン欠損食
アセトアミノフェン

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibitory factor: マクロファージ遊走阻止因子) は約 40 年前に活性 T リンパ球より分泌され遅延型アレルギー反応など細胞性免疫に關与する液性因子として発見された。その後、1990 年代に分子レベルで機能の解析が始まり様々な機能が解明された。マクロファージ遊走阻止因子の発現についてはマクロファージ遊走阻止因子は免疫細胞のみならず身体の様々な組織や細胞での発現も確認されてるようになった。マクロファージ遊走阻止因子の主たる作用としては主に以下のものが明らかとなっている。1) 炎症を促進する炎症性サイトカイン作用、2) ショック状態やストレス状態で産生されるステロイドホルモンへの拮抗作用、3) 生活習慣病などに関係する代謝経路、特に糖質・脂質代謝への作用、4) 腫瘍などに関連した細胞増殖・発癌機構への関与。1) についてマクロファージ遊走阻止因子の活性が高まると炎症が促進され、その活性をコントロールすると炎症が程良く収まってくるのが細胞実験のみならず個体を用いた実験でも証明されており、さらにその対象となる疾患の応用分野は呼吸器疾患、消化器疾患他、実に様々な分野の疾患の炎症に關与していることが分かってきている。2) についてマクロファージ遊走阻止因子はショック状態などの際に下垂体より大量放出され急性反応に影響していると考えられている。急性反応やストレス反応、ショック状態の際に副腎より産生されるステロイドホルモンに対して拮抗作用をもち、その病態に影響しており、マクロファージ遊走阻止因子活性の制御によりそれら重篤な状態からの救命が可能であることを示唆する報告も出ている。3) についてはマクロファージ遊走阻止因子の代謝への影響も明らかになっており、特に糖尿病や脂質異常症への関与も示されている。さらに4) について腫瘍細胞増殖、そして癌発生についてもマクロファージ遊走阻止因子は促進的な作用を有していることが解ってきており、このことから癌進行の制御をマクロファージ遊走阻止因子活性の調節により可能ではないかということが示唆されている。このような作用の中で、特にマクロファージ遊走阻止因子活性の制御により炎症と同時に癌発生に対する抑制効果も期待されている。こうした代謝、炎症、そして発癌にマクロファージ遊走阻止因子活性が同様に關与していることからこれらの病態が同時に起きてくる疾患についてマクロファージ遊走阻止因子の役割の重要さが解明されると思われた。我々は以前、炎症性大腸発癌においてマクロファージ遊走阻止因子が重要な役割を持っていることを明らかにしてきたが、今回は後述する非アルコール性脂肪性肝炎においてもその病状の進行過程においてマクロファージ遊走阻止因子が重要な働きを持ってい

るのではと考えたのが本研究の開始にいたる背景であった。

我々は消化器疾患におけるマクロファージ遊走阻止因子の機能解析を継続して行ってきており、炎症性腸疾患においてマクロファージ遊走阻止因子が病状の発症に深く關与しており、腸炎モデルの炎症プロセスにおいてはマクロファージ遊走阻止因子が TNF- α の上流に位置することやマクロファージ遊走阻止因子活性制御による腸炎の治療効果を明らかにした (Ohkawara T, et al. Gastroenterology 2002)。また、マクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスおよびトランスジェニックマウスにおいて実験腸炎の発症が大きく変化すること、自然免疫や熱ショック蛋白を介した炎症への関与も解明してきた (Ohkawara T et al. Clin Exp Immunol 2005, Ohkawara T et al. Immunol Lett 2006, Ohkawara T et al. Scand J Gastroenterol 2008)。さらに下部消化管に留まらず、食道・胃の炎症におけるマクロファージ遊走阻止因子の促進的作用も明らかにしてきた (Ohkawara T et al. J Gastroenterol 2005, Ohkawara T et al. Internal Med 2007, Ohkawara T et al. Int Immunopharmacol, 2011)。

さらにマクロファージ遊走阻止因子活性の制御法として新規 DNA ワクチンを開発し、消化管炎症に対する抑制効果があることを示してきた (Ohkawara T et al. Clin Exp Immunol 2011)。

今回、以上のように我々が培ってきたマクロファージ遊走阻止因子における解析ツールを用いてマクロファージ遊走阻止因子の役割を解析を行なうあたり、先程の背景を鑑みて、対象とする疾患として非アルコール性脂肪性肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: 非アルコール性脂肪性肝炎) を候補に挙げたが、この疾患は単なる脂肪肝に留まらず、炎症性細胞の浸潤による肝炎の発症、肝線維化・肝硬変への進行、そして肝臓癌の発症を引き起こすもので通常の脂肪肝と比べて予後が悪い。本邦における罹患数は近年増加傾向であり、様々なサイトカインやケモカイン発現異常が発病に關与していることが報告されてきてはいるが未解明の部分も多い。従って非アルコール性脂肪性肝炎の病態解明や新規診断・治療開発が待たれているところである。

2. 研究の目的

マクロファージ遊走阻止因子はその特性から非アルコール性脂肪性肝炎において脂質代謝・炎症・発癌の全てにおいて關与する可能性が考えられ、本研究で非アルコール性脂肪性肝炎発症及び進行について新たな機序を解明することができることが期待された。その上にマクロファージ遊走阻止因子活性を上手く調整する手法を用いることで、非アルコール性脂肪性肝炎の発症を抑えるのみならず発症後の治療としても有用であ

ること期待されると考え非アルコール性脂肪性肝炎におけるマクロファージ遊走阻止因子の役割を探求することを本研究の主目的とした。さらにマクロファージ遊走阻止因子活性制御による非アルコール性脂肪性肝炎の変化を検証することで治療応用への基盤的研究となることも目的とした。特に臨床的に重要と思われる以下の点について明らかにすることを目的とした。

(1) 非アルコール性脂肪性肝炎 実験モデルにおける マクロファージ遊走阻止因子発現の解析

(2) マクロファージ遊走阻止因子 活性制御による治療効果の検証

3. 研究の方法

(1) コリン・メチオニン欠損食(コリン・メチオニン欠損食)をマウスに自由に摂取させると数週間の経過で肝組織内に脂肪滴が沈着し、さらに経過すると肝組織内への炎症細胞の浸潤、肝線維化がおきるとされている。現在のところヒトにおける非アルコール性脂肪性肝炎の疾患モデルとされている。本研究においてはこの疾患モデルをマクロファージ遊走阻止因子の解析のために用いることとした。

コリン・メチオニン欠損食(コリン・メチオニン欠損食)摂取による非アルコール性脂肪性肝炎の発症における マクロファージ遊走阻止因子 の発現及びサイトカインおよびケモカイン発現の解析

マウスにメチオニン・コリン欠乏食を摂取させ経時的に肝組織の変化を観察した。8週間の摂取にてヒト非アルコール性脂肪性肝炎に類似した肝病変を生じる。この方法で肝炎を誘発させ肝組織を採取した。サンプルとして採取した肝組織をヘマトキシリン・エオジン染色し、その組織標本を顕微鏡にて観察することで肝障害の程度を評価した。肝線維化についてはマッソントリクローム染色で染色した肝組織標本を顕微鏡にて観察して評価した。同時に血液中の炎症性サイトカインの値を酵素反応に基づく抗原抗体反応法(ELISA法)を用いて計測した。また組織標本のミエロペルオキシダーゼ染色やマクロファージ遊走阻止因子免疫染色にてマクロファージ遊走阻止因子の分布および組織浸潤細胞の程度を解析した。血液中の肝トランスアミナーゼやサを生化学検査法にて計測した。

非アルコール性脂肪性肝炎モデルマウスにおけるマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤 ISO-1 投与による脂肪性肝炎抑制効果の解析

コリン・メチオニン欠損食を摂取開始したマウスに対してマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤である ISO-1 を週2回、一回あたり 0.4mg を腹腔内投与した。それを8週間計 16 回投与し、コリン・メチオニン欠損食摂取開始から 8 週間後に肝臓や血液をサン

プリングした。肝組織について顕微鏡にて組織標本から組織学的所見について脂肪滴の沈着の程度、肝細胞の膨張化の程度、炎症細胞浸潤の程度、肝組織線維化の程度を評価したが、肝脂肪滴の肝組織に対する割合、肝組織内の炎症細胞の浸潤、肝線維化を評価した。また血液中のサイトカイン濃度や血清肝トランスアミナーゼ値を前述の方法と同様に測定した。

(2) アセトアミノフェン誘発性肝障害におけるマクロファージ活性阻害剤治療による肝障害軽減効果の解析

半日絶食としたマウスにアセトアミノフェン 200mg/kg をマウスに単回腹腔内投与し、アミノアセトフェン投与 24 時間後に肝組織と血液を採取して肝組織標本を作製し肝障害の程度について評価した。その中でアセトアミノフェン投与直前に ISO-1 を 0.4mg/匹を同時間に投与したマウスを ISO-1 治療群、ISO-1 だけを除いた基質を投与したマウスをコントロール群と分けた。

上記のマウスにおいて肝組織中の細胞死の程度をタネル染色を用いてその陽性細胞数の計測することで評価した。同様に肝ミエロペルオキシダーゼ染色で急性炎症細胞の浸潤の程度をその陽性細胞数を計測することで評価した。

上記のマウスにおいて血液中の肝トランスアミナーゼを計測し両群を比較検証した。血液中のサイトカイン濃度を ELISA 法により測定した。

4. 研究成果

(1) コリン・メチオニン欠損食摂取による非アルコール性脂肪性肝炎発症およびマクロファージ遊走阻止因子発現の解析

MCD 摂取により、MCD 摂取マウスは通常食を摂取したマウスと比べ有意に体重減少がみられ、その現象は経時的に進行した。これはヒト非アルコール性脂肪性肝炎と比べると逆の現象であった。

MCD 摂取により、2 週間後、4 週間後、8 週間後経過するにつれ肝組織内への脂肪滴沈着が増加していった。また血清肝トランスアミナーゼの上昇が見られた。(図 1, 2)

MCD 摂取 8 週間後のマウス肝組織標本において肝細胞内のマクロファージ遊走阻止因子蛋白の発現が増強していた。

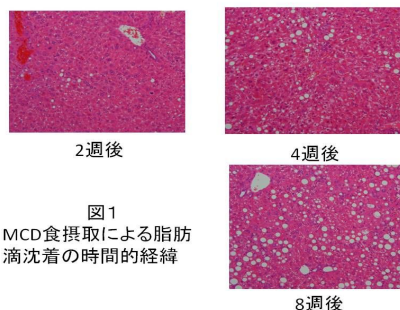


図1
MCD食摂取による脂肪滴沈着の時間的経緯

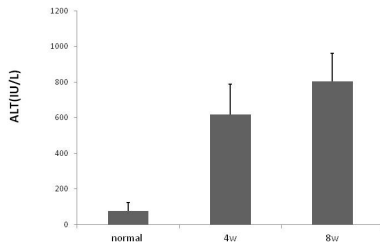


図2
MCD食摂取による肝機能検査の変化

(2) マクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤 ISO-1 による非アルコール性脂肪性肝炎抑制効果の検証

ISO-1 治療による肝組織の変化

肝組織内への脂肪滴沈着の程度や免疫細胞浸潤、肝線維化においてコントロール群と比べ有意な差が得られず、ISO-1 治療による効果が確認されなかった。

ISO-1 治療による血清肝トランスアミナーゼ値の変化

血清肝トランスアミナーゼ値についても 8 週間にわたる MCD 摂取による肝トランスアミナーゼ値の上昇は ISO-1 治療によってもその値に有意な変化は見られなかった。

ISO-1 治療による肝組織中 F4/80 陽性細胞、ミエロペルオキシダーゼ陽性細胞数の変化

8 週間のコリン・メチオニン欠損食摂取による F4/80 陽性細胞とミエロペルオキシダーゼ陽性細胞の変化に対して組織標本を免疫染色や特殊染色を用い評価したが、ISO-1 治療によっても毎視野あたりの陽性細胞数はコントロール群と比べてその数に有意な差を認めなかった。

ISO-1 投与による血液中の炎症性サイトカイン値の変化

8 週間のコリン・メチオニン欠損食摂取による血液中の炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-1, IL-6, MIP-2) について ELISA 法にて測定したが、ISO-1 治療群とコントロール群の間に有意な差を認めなかった。

(3) アセトアミノフェン投与による肝障害におけるマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤の抑制効果の検証

マクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤の効果が期待される肝疾患モデルにおいてマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤 ISO-1 の肝組織傷害に対する抑制効果を解析した。先行研究によってマクロファージ遊走阻止因子ノックアウトマウスを用いたアセトアミノフェン肝障害モデルにおいて、マクロファージ遊走阻止因子がアセトアミノフェンによる肝障害に促進的な作用を持っていることが示されているが、本モデルを用いマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤 ISO-1 を投与しその肝障害を評価することで、その結果を非アルコール性脂肪性肝炎モデ

ルへの ISO-1 治療効果判定の評価と比較検討でき、またそれによりマクロファージ遊走阻止因子の非アルコール性脂肪性肝炎の病態への影響を評価できるものと判断した。

アセトアミノフェン投与および ISO-1 治療による肝組織所見の解析

アセトアミノフェン投与によりマウスの肝組織に広汎な炎症と細胞破壊が見られた。それらはマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤 ISO-1 投与により著明に抑制されていた。

タネル染色によるアセトアミノフェン投与及び ISO-1 治療での肝細胞死の評価

タネル染色により細胞死を起こしている細胞を標本の中より識別することが出来る。アセトアミノフェン投与のみのコントロール群においてはタネル染色陽性細胞が多数見られたのに対して、ISO-1 治療を行なったマウスの肝臓においてはその陽性細胞数が著明に抑えられていた。

肝組織ミエロペルオキシダーゼ染色によるアセトアミノフェン投与と肝障害における ISO-1 治療効果の解析

ミエロペルオキシダーゼ染色により急性期に浸潤する好中球について解析することができる。これにより急性障害についての評価を行なった。ミエロペルオキシダーゼ陽性細胞数はアセトアミノフェン投与により増加したが、ISO-1 治療により著明に低下した。

アセトアミノフェン投与による肝障害マウスにおける血液中の因子における ISO-1 治療の効果の解析

アセトアミノフェン投与により上昇した血中肝トランスアミナーゼは ISO-1 治療により著明に低下していた。血液中のマクロファージ遊走阻止因子及び炎症性サイトカインはアセトアミノフェン投与によって上昇したが ISO-1 治療により低下傾向が見られた。

以上のような結果から ISO-1 というマクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤はアセトアミノフェン投与によって引き起こされる肝障害においては著明な抑制効果がみられたのと対照的に、非アルコール性脂肪性肝炎モデルにおいては、マクロファージ遊走阻止因子はその病状の進展とともに発現を高めてはいるが、マクロファージ遊走阻止因子活性阻害剤である ISO-1 によって病状の進展を抑えることはできなかった。これは非アルコール性脂肪性肝炎においてマクロファージ遊走阻止因子が本疾患に置いて中心的な役割ではない可能性が示唆されたが、またそれは非アルコール性脂肪性肝炎が代謝、炎症、線維化と進展する中でかなり複雑なステップを踏んでいる可能性がありマクロファージ遊走阻止因子単独の制御ではその進展の主経路を抑えることが難しいのではないかと考察することも可能である。したがって、別のツールを用いたマクロファージ遊走阻止因子活性の制御により非アルコール性脂

肪性肝炎のコントロールが可能かもしれず、さらにワクチン治療としてマクロファージ遊走阻止因子 DNA ワクチンのような持続的・長期間にわたるマクロファージ遊走阻止因子活性制御による効果を検討することを進めていきたい。

(3)連携研究者
無し

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

大川原 辰也 (OHKAWARA, Tatsuya)

北海道大学薬学研究院臨床病態解析学
・研究員

研究者番号：00374257

(2)研究分担者

武田 宏司 (TAKEDA, Hiroshi)

北海道大学薬学研究院臨床病態解析学
・教授

研究者番号：60261294

大西 俊介 (OHNISHI, Shunsuke)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：10443475