

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461007

研究課題名(和文) 脂肪肝における肝脂肪化のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of formation of hepatic steatosis in Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)

研究代表者

藤井 英樹 (Hideki, Fujii)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：20382070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)の肝脂肪化の

メカニズムの解明。マクロファージはacrophage scavenger receptor(MSR)を介して修飾されたLDLを取り込んでいる。我々は以前よりMSR-Aノックアウトマウスを用いて、NASH(Non-alcoholic steatohepatitis)モデルの肝線維化進展、肝発癌が减弱する可能性を指摘してきた。今回の研究では、in vivoモデル、in vitroモデルの両者を用いて、肝細胞の脂肪化のメカニズムにおけるマクロファージの役割を検討した。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of formation of hepatic steatosis in Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Macrophages actively uptake modified LDL (acetyl- and oxidized LDL) via macrophage scavenger receptors (MSR). In 1990, Kodama et al. isolated cDNAs encoding two versions of the bovine macrophage scavenger receptor, MSR-AI and MSR-AII. Functional MSR-As are trimers of 2 C-terminally different subunits generated by alternative splicing. A number of studies have reported the importance of MSR-A in the process of atherosclerosis. We have examined the mechanism of formation of hepatic fibrosis and carcinogenesis in Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using mouse model. In this research, we examined the role of macrophage in formation of hepatic steatosis using both in vivo and in vitro model.

研究分野：消化器内科学

キーワード：マクロファージ 肝脂肪化 MSR-A

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満の増加に従い、脂肪肝の患者数も増加の一途を辿っている。特に、脂肪肝の一部は肝硬変に進展しうるということが明らかになった (Gastroenterology 1999;116:1413)。このような疾患を総称して非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) と呼ぶ。又、NAFLD の進行型で脂肪化に加え炎症細胞浸潤、線維化を認める疾患を非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) と呼ぶ。NASH は 10 年で 5-20% の患者が肝硬変に進行し、肝癌を合併しうるため、早急な病態の解明と治療法の確立が急務である (*J Gastroenterol* 2012;47:215)。

(2) MSR-A (CD204) は分子量 77 kDa のサブユニットのホモ 3 量体からなる 220-240 kDa の膜蛋白で、粥状硬化におけるマクロファージの泡沫化のみならず、生体防御や種々の炎症におけるマクロファージの機能に深く関与している。MSR-A ノックアウトマウスは、Suzuki らにより 1997 年に初めて報告された。MSR-A ノックアウトマウスの発育や成長は正常であるが、腹腔内マクロファージによる酸化 LDL、アセチル LDL 等修飾された LDL の取り込みが低下する (*Suzuki H, et al. Nature* 1997;386:292-6)。

(3) 申請者らは、マクロファージ機能が低下したマウス (Macrophage scavenger receptor A; MSR-A ノックアウトマウス) では NASH モデルにおいて肝細胞の脂肪化の程度がコントロール群に比し有意に低下することを見出した。この結果より NASH の病態進展において、肝細胞とマクロファージの相互作用が促進的に作用する事が想定される。 (*Fujii H, The 9th JSH Single Topic Conference "NASH 2010"*)

2. 研究の目的

本研究では、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 肝細胞の脂肪化における MSR-A の役割
- (2) 肝細胞の脂肪化における肝細胞とマクロファージの相互作用

3. 研究の方法

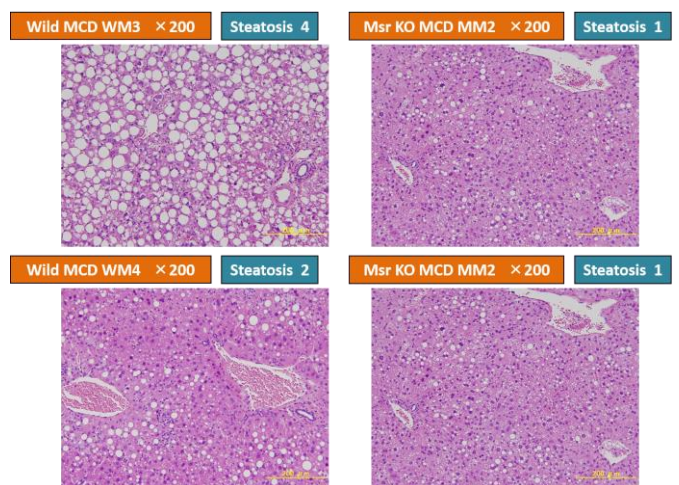
C57BL/6 マウスおよび MSR-A ノックアウトマウス (各群 n=3~6) にメチオニン・コリン欠乏食 (MCD) 及び MCD コントロール食 (MCC) を 3 週間投与して NASH モデル、単純性脂肪肝モデルを作成し、以下の点につき検討を行った。

- A) HE 染色、Oil red 染色
- B) 肝内脂質量 (コレステロール、中性脂肪、遊離脂肪酸、リン脂質等)
- C) 血清中脂質プロファイル (高感度ゲル濾過 HPLC 法)
- D) 肝障害の程度 (血清 ALT)
- E) NAFLD activity score (NAS)

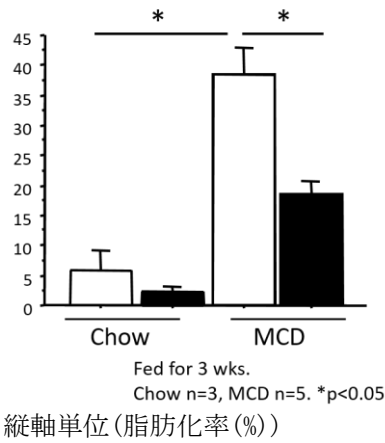
4. 研究成果

a) MCD 3 週間投与により、Wild type に誘導された肝脂肪化は、MSR-A KO マウスにおいては減弱した (図 1; H-E 染色、図 2; Oil red 染色の面積率)。

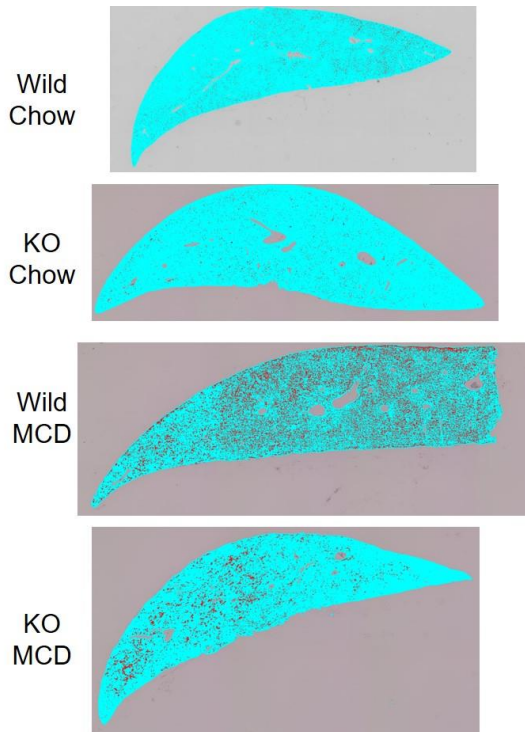
(図 1)



(図 2)

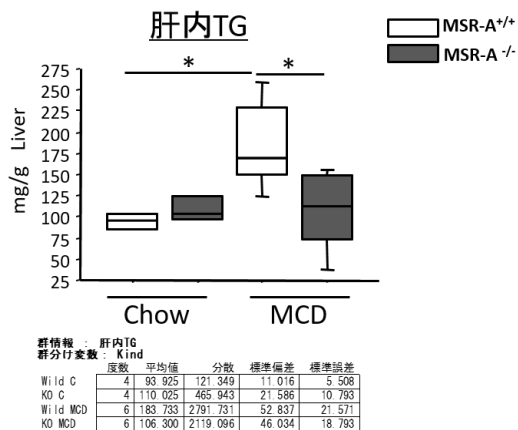


(図 2 補足;画像取得;キーエンス BZ-9000、解析ソフト; BZ-II)



b) MSR-A KO マウスは wild type に比し肝臓内 TG 含有量が減少した(図 3)

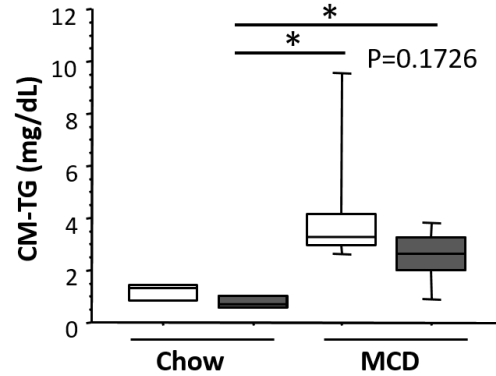
(図 3)



c) 上記のグループにおいて、血清 ALT 値は有意な減少を認めなかった (Wild vs. KO; 208±177 vs. 130±30.8, p=0.1168)。

d) 脂質 in flow の指標の一つである血清 CM-TG の値は MSR-A ノックアウトによる有意な減弱を認めなかった (図 4)

(図 4)

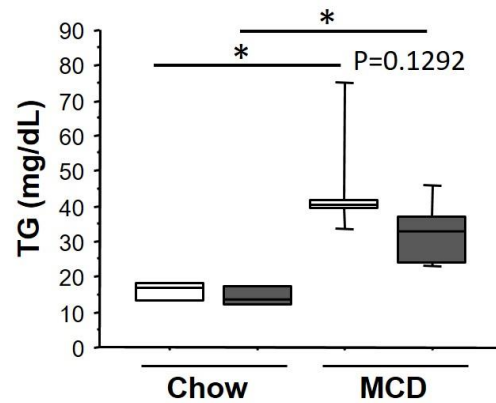


群情報 : CM-TG
群分け変数 : Kind

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
Wild Chow	4	1.120	.322	.567	.284
KO Chow	4	.770	.097	.312	.156
Wild MCD	6	4.377	8.416	2.901	1.184
KO MCD	6	2.512	1.258	1.122	.458

e) 血清 TG は MCD により Wild 群で有意に増加したが、MSR-A ノックアウトによる有意なキャンセルは認めなかった(図 5)

(図 5)



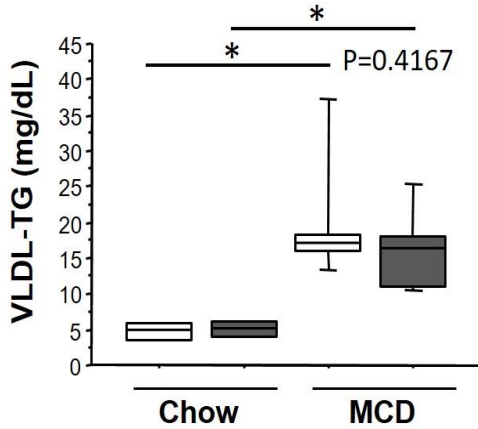
群情報 : TG

群分け変数 : Kind

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
Wild Chow	4	15.825	11.271	3.357	1.679
KO Chow	4	14.673	12.725	3.567	1.784
Wild MCD	6	45.538	273.509	16.538	6.752
KO MCD	6	32.815	81.668	9.037	3.689

f) 血清 VLDL-TG は MCD により Wild 群で有意に増加したが、MSR-A ノックアウトによるキャンセルは認めなかった(図 6)

(図 6)

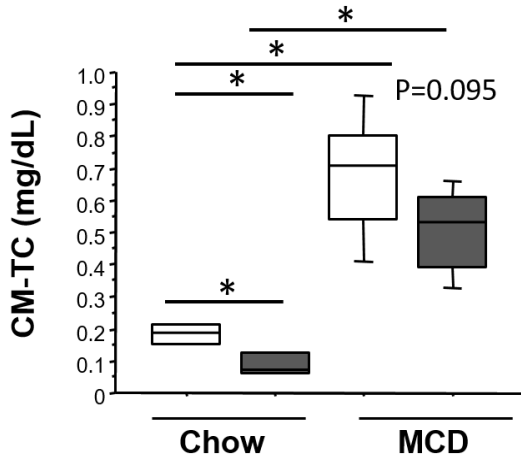


群情報 : VLDL-TG
群分け変数 : Kind

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
Wild Chow	4	4.660	2.365	1.538	.769
KO Chow	4	5.135	1.839	1.356	.678
Wild MCD	6	20.242	91.680	9.575	3.909
KO MCD	6	16.390	32.343	5.687	2.322

g) 血清 CM-TC は MCD により Wild 群で有意に増加したが、MSR-A ノックアウトにより境界域の有意低下を認めた(図 7)

(図 7)

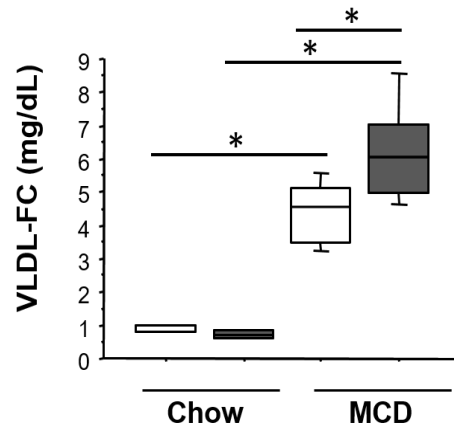


群情報 : CM-C
群分け変数 : Kind

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
Wild Chow	4	.183	.002	.046	.023
KO Chow	4	.095	.003	.051	.025
Wild MCD	6	.683	.037	.191	.078
KO MCD	6	.508	.018	.133	.054

h) 血清 VLDL-FC は MCD により Wild 群で有意に増加し、MSR-A ノックアウトにより更なる有意な上昇を認めた(図 8)

(図 8)

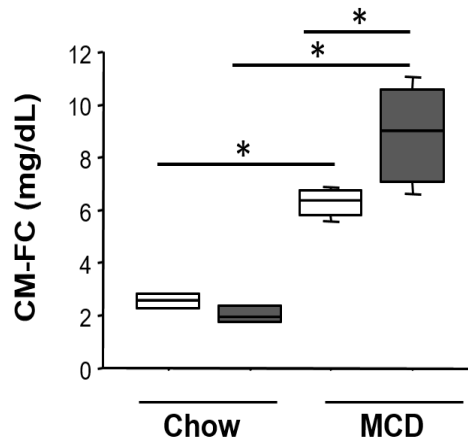


群情報 : VLDL-FC
群分け変数 : Kind

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
Wild Chow	4	.910	.020	.143	.072
KO Chow	4	.728	.029	.170	.085
Wild MCD	6	4.410	.896	.947	.387
KO MCD	6	6.248	2.553	1.598	.652

i) 血清 CM-FC は MCD により Wild 群で有意に増加し、MSR-A ノックアウトにより更なる有意な上昇を認めた(図 9)

(図 9)

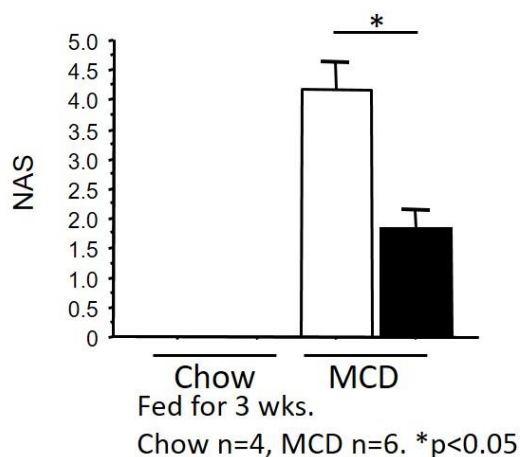


群情報 : LDL-FC
群分け変数 : Kind

	度数	平均値	分散	標準偏差	標準誤差
Wild Chow	4	2.543	.103	.320	.160
KO Chow	4	2.050	.167	.408	.204
Wild MCD	6	6.305	.282	.531	.217
KO MCD	6	8.882	3.756	1.938	.791

j) NAFLD の病勢の指標である NAFLD activity score (NAS) は MSR-A 欠損により有意に減少した(図 10)

(図 10)



今回の検討の結果、MSR-A のノックアウトによりマウス MCD モデルにおける肝細胞の脂肪化が減弱することが明らかになった。NAS も有意な低下を認めたが、肝脂肪化の低下の影響を受けた可能性がある。実際、肝障害のマーカーである ALT 値は MSR-A ノックアウトによる有意な減少を認めていない。血清並びに肝組織中の脂肪含有量も図に示したように大きく変化した。更に、今回の研究では肝組織中における Plin2 や Emr1 の遺伝子発現も検討したが、再現性のあるデータは得られなかった。また、マクロファージと肝細胞の相互作用についても検討したが、相互作用における詳細なメカニズムは依然不明であり、今後さらなる検討が必要である。

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 2 件)

- ① Fujii H, Yamaguchi S, Kurai O, Miyano M, Ueda W, Oba H, Aoki T, Enomoto M, Kawada N, Okawa K. Putting "sticky notes" on the electronic medical record to promote intra-hospital referral of hepatitis B and C virus-positive patients to hepatology specialists: an exploratory study. *BMC Infect Dis.* 2016 Aug 12;16:410. doi: 10.1186/s12879-016-1765-y. (査読有)
- ② Fujii H, Nishimoto N, Yamaguchi S, Kurai O, Miyano M, Ueda W, Oba H, Aoki

T, Kawada N, Okawa K. The Alcohol Use Disorders Identification Test for Consumption (AUDIT-C) is more useful than pre-existing laboratory tests for predicting hazardous drinking: a cross-sectional study. *BMC Public Health.* 2016 May 10;16:379. doi: 10.1186/s12889-016-3053-6. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 英樹 (FUJII, Hideki)

大阪市立大学大学院医学研究科・非常勤講師
研究者番号：20382070

(2) 研究分担者

村上 善基 (MURAKAMI, Yoshiki)

大阪市立大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号：397556

河田 則文 (KAWADA, Norifumi)

大阪市立大学大学院医学研究科・教授
研究者番号：30271191