

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461010

研究課題名(和文) NASH発症における自然免疫防御反応とKupffer細胞の機能分化の解析

研究課題名(英文) The study for the protective response by innate immune system and functional specialization of Kupffer cells in the pathogenesis of NASH

研究代表者

小野 正文 (ONO, Masafumi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：70304681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：NASH発症病態においてKupffer細胞の機能異常は重要である。本研究において、NASH肝組織ではKupffer細胞サブセットであるCD11b+Kupffer細胞が増加し、CD68+Kupffer細胞が減少していた。また、1 Gy放射線照射にてCD11b+Kupffer細胞数を減少させると、肝脂肪化に変化はないが肝臓の炎症と線維化は著明に改善した。一方、クロドロネート投与にてCD68+Kupffer細胞を減少させると肝障害は増悪した。以上より、CD68+Kupffer細胞および骨髄由来CD11b+Kupffer細胞の肝臓内集積はNASH発症病態に極めて重要な役割を果たしている。

研究成果の概要(英文)：Although impairment of Kupffer cells are important for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH), the precise mechanisms of the impairment have not been well clarified yet. In this study, we have clarified that the CD11b+Kupffer cells increased and CD68+Kupffer cells decreased in the liver of NASH. In addition, inflammation and fibrosis were improved without attenuation of hepatic steatosis, when CD11b+Kupffer cells were decreased by exposing of 1Gy irradiation. In contrast, depletion of the resident subset, CD68+Kupffer cells, by clodronate liposome (c-lipo) treatment exacerbated disease progression. It was clarified that recruited CD11b+CD68+ Kupffer cells may play an essential role in steatohepatitis and fibrosis in the pathogenesis of NASH. We concluded that recruitment and activation of bone marrow derived macrophages, CD11b+Kupffer cells, may have the important key factor to develop steatohepatitis from simple steatosis.

研究分野：NASH

キーワード：NASH Kupffer細胞 CD68+Kupffer細胞 CD11b+Kupffer細胞 腸内細菌

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓における自然免疫防御において Kupffer 細胞は中心的かつ最前線として重要な細胞で、サイトカイン分泌や貪食作用を有している。これまで、NASH の Kupffer 細胞は機能が亢進しており、TNF- $\alpha$ 、IL-1b などの炎症性サイトカインが過剰分泌されていることが知られていた (Am J Physiol 1998 など)。一方、貪食能については、NASH 肝ではその機能が明らかに低下していることがこれまでの我々の報告を始め (Gut. 2010;59:2586)、他の研究室からも報告がなされるようになった。さらに、正常肝の Kupffer 細胞は門脈域で主に活性化された状態で存在しているが、NASH 肝では活性化した Kupffer 細胞の数は明らかに増加し、肝小葉全体に分布して存在しており、Kupffer 細胞の異常状態が NASH 発症とは密接な関連があると考えられる。

近年、本研究分担研究者の中島らは、Kupffer 細胞はその役割により大きく 2 つの subset (CD68+Kupffer 細胞：貪食能、ROS 産生能、CD11b+Kupffer 細胞：炎症性サイトカイン分泌) に分類され、LPS 刺激や高脂肪食により、その subset や役割が変化することを報告した (J Hepatol. 2010;53:903、Shock. 2011;36:484)。

しかし、NASH 発症における Kupffer 細胞サブセットの経時的変化および肝小葉における存在場所の変化、さらにその発生のメカニズムと NASH の病態との関わりについて明らかではない。

## 2. 研究の目的

NASH 発症病態において Kupffer 細胞の機能的、質的異常の重要性が明らかとなっている。また、Kupffer 細胞はその役割により大きく 2 つの subset (CD68+Kupffer 細胞：貪食能、ROS 産生能、CD11b+Kupffer 細胞：炎症性サイトカイン分泌) の存在が明らかとなっているが、NASH 発症や病態における Kupffer 細胞サブセットの役割については未だ明らかではない。このため、NASH 発症や病態における Kupffer 細胞サブセット役割を明らかにするために、CD11b+Kupffer 細胞および CD68+Kupffer 細胞の肝臓における経時的変化および肝小葉における存在場所の変化、さらにその発生のメカニズムと NASH の病態との関わりを明らかにすることを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、高脂肪食誘発 NASH マウスにおける CD11b+Kupffer 細胞および CD68+Kupffer 細胞それぞれサブセットの数を確認するために、肝臓内のそれら細胞の数を

FACS を用いて評価を行う。また、肝臓における数および分布を確認するために免疫組織学的に検討するとともに、蛍光マイクロビーズ法を用いた貪食能検査を行う予定である。さらに、それぞれのサブセットを分離し、それぞれの細胞におけるサイトカイン分泌能の変化および貪食能の変化についても検討を行う。さらに、疾患背景に関わらず NASH に共通の要因が Kupffer 細胞サブセットの変化へのトリガーとなっていることが予想されるため、CD11b+Kupffer 細胞の増加と CD68+Kupffer 細胞が NASH 発症のどの段階から始まるのかを検討するために、正常および単純性脂肪肝の段階から NASH 発症、さらには線維化進展の状態まで経時的に Kupffer 細胞のサブセットの変化を解析することにする。さらに、それぞれ経時的段階での CD11b+Kupffer 細胞および CD68+Kupffer 細胞の形態学的、分子生物学的比較検討、さらに蛍光ビーズによる貪食能の比較検討を行い、Kupffer 細胞のサブセットの変化と分化の経時的変化を検討する。

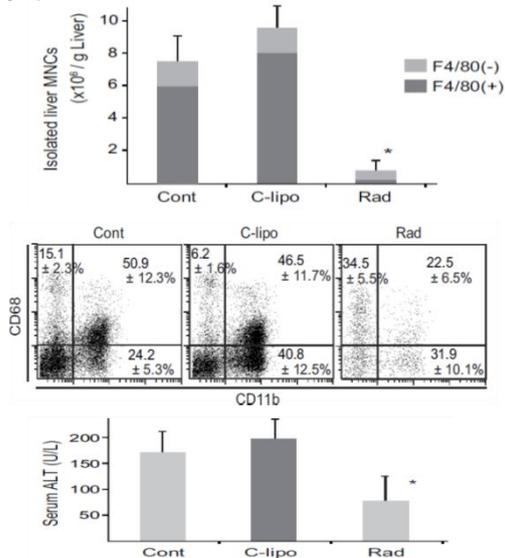
さらに、clodronate liposome 投与や放射線照射などにより CD68+Kupffer 細胞および CD11b+Kupffer 細胞をそれぞれ個別に減少させる手法を用いて肝臓における肝脂肪化、炎症および線維化の変化を検討することで、それら Kupffer 細胞サブセットが NASH 発症病態における役割を明らかにする。

## 4. 研究成果

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発症において Kupffer 細胞の機能異常が、その病態進展において重要な役割を果たしていることをこれまで明らかにしてきた。本研究では、Kupffer 細胞サブセットである CD11b+Kupffer 細胞が増加し CD68+Kupffer 細胞が減少することが明らかになった。さらに、NASH モデル動物ではサイトカイン分泌を主に担う CD11b+Kupffer 細胞が増加し、貪食能を主に担う CD68+Kupffer 細胞が減少することが明らかとなった。NASH 肝においては Kupffer 細胞が全体的に増加するが、そのサブセットの変化がサイトカインの過剰分泌とともに貪食能の低下という自然免疫の異状状態を来していることが明らかとなった (PLoS One. 2014 Mar 25;9(3):e92515.)。

さらに、fibroblast growth factor 5 (FGF5) 欠損 mice に対して高脂肪食負荷により NASH を惹起したところ、高度の脂肪性肝炎と肝線維化を来すとともに、CD68+Kupffer 細胞および CD11b+Kupffer 細胞の強い集積を認めた。1 Gy の放射線照射により CD11b+Kupffer 細胞数を減少すると、肝脂肪化は変化しないにも関わらず肝臓の炎症と線維化は著明に改善した (図 1)。一方、

図1



clodronate liposome 投与により CD68<sup>+</sup>Kupffer 細胞を減少したところ、逆に肝障害は増悪を来した。以上のことから、NASH 発症および肝障害の増悪において CD68<sup>+</sup>Kupffer 細胞および CD11b<sup>+</sup>Kupffer 細胞の肝臓内集積は肝障害の進展に極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Sci Rep. 2016 Oct 6;6:34466. doi: 10.1038/srep34466)。

以上のことから、NASH 発症および肝障害の増悪において CD68<sup>+</sup>Kupffer 細胞および CD11b<sup>+</sup>Kupffer 細胞の肝臓内集積は肝障害の進展に極めて重要な役割を果たしている。骨髓由来のマクロファージによる肝内 Kupffer 細胞、特に CD11b<sup>+</sup>Kupffer の増加とその活性化は単純性脂肪肝から NASH への病状進展に重要な要因となっていることが明らかとなった。

#### 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 16 件)

- ① Amano A, Ono M, Saibara T, Ishigami A. (他 12 名): Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. Arch Biochem Biophys. 622: 47-58, 2017 査読有 doi:10.1016/j.abb.2017.03.007
- ② Nakashima H, Seki S. (他 6 名): Activation and increase of radio-sensitive CD11b<sup>+</sup> recruited Kupffer cells/macrophages in diet-induced steatohepatitis in FGF5 deficient mice. Sci Rep. Oct 6;6:34466. 2016 査読有 doi: 10.1038/srep34466

- ③ Masuda K, Ono M, Saibara T. (他 5 名): High fasting insulin concentrations may be a pivotal predictor for the severity of hepatic fibrosis beyond the glycemic status in non-alcoholic fatty liver disease patients before development of diabetes mellitus. Hepatol Res. 2016 査読有 doi: 10.1111/hepr.12832
- ④ Ochi T, Munekage K, Ono M, Oben JA, Saibara T. (他 6 名): Patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 is involved in hepatic fatty acid and triglyceride metabolism through X-box binding protein 1 and modulation of endoplasmic reticulum stress in mice. Hepatol Res. 46: 584-92. 2016 査読有 doi:10.1111/hepr.12587
- ⑤ Tokushige K, Ono M, Saibara T, Hashimoto E. (他 33 名): Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease: multicenter survey. J Gastroenterol. 51: 586-96. 2016 査読有 doi:10.1007/s00535-015-1129-1
- ⑥ Toda K, Hayashi Y, Ono M, Saibara T: Characterization of Ovarian Responses to Equine Chorionic Gonadotropin of Aromatase-Deficient Mice With or Without 17 $\beta$ -Estradiol Supplementation. Endocrinology. 157: 2093-103, 2016 査読有 doi:10.1210/en.2015-1701
- ⑦ Takahashi H, Ono M, Saibara T, Eguchi Y. (他 8 名): Biphasic effect of alcohol intake on the development of fatty liver disease. J Gastroenterol. 50: 1114-23. 2015 査読有 doi:10.1007/s00535-015-1058-z
- ⑧ Toda K, Hayashi Y, Ono M, Saibara T: Co-administration of insulin with a gonadotropin partly improves ovulatory responses of estrogen-deficient mice. Mol Cell Endocrinol. 411:177-86. 2015 査読有 doi:10.1016/j.mce.2015.04.027
- ⑨ Kamada Y, Ono M, Hyogo H, Saibara T, Takehara T, Miyoshi E. (他 14 名): A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis using two glycomarkers. Hepatology. 62: 1433-43. 2015 査読有 doi 10.1002/hep.28002
- ⑩ Nishiyama K, Nakashima H, Seki S, Yamamoto J. (他 4 名): Mouse CD11b<sup>+</sup>Kupffer Cells Recruited from Bone Marrow Accelerate Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. PLoS One. 10: e0136774. 2015 査読有

doi:10.1371/journal.pone.0136774

- ⑪ Toda K, Ono M, Saibara T. (他 3 名): Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. *Transgenic Res.* 23: 293-302, 2014 査読有  
doi:10.1007/s11248-013-9771-y
- ⑫ Hanaka H, Nakashima H, Seki S. (他 5 名): Fibroblast growth factor-5 participates in the progression of hepatic fibrosis. *Exp Anim.* 63: 85-92. 2014 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4160928/>
- ⑬ Sato A, Nakashima H, Seki S. (他 4 名): Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/macrophages in CCl4-induced acute hepatic injury. *PLoS One.* 25; 9: e92515. 2014 査読有 doi 10.1371/journal.pone.0092515
- ⑭ Nakahara T, Ono M, Saibara T, Okanoue T. (他 16 名): Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. *J Gastroenterol.* 49: 1477-84. 2014 査読有 doi:10.1007/s00535-013-0911-1
- ⑮ Kessoku T, Ono M, Saibara T, Nakajima A, Okanoue T (他 16 名): Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 20: 10108-14. 2014 査読有 doi 10.3748/wjg.v20.i29.10108
- ⑯ Tanaka K, Hyogo H, Ono M, Saibara T, Eguchi Y (他 7 名): Upper limit of normal serum alanine aminotransferase levels in Japanese subjects. *Hepatol Res.* 44: 1196-207. 2014 査読有 doi:10.1111/hepr.12293

[学会発表] (計 27 件)

【国際学会】

- ① Taniuchi K, Okabayashi T, Shima Y, Saibara T: A GLYCOPROTEIN AS NOVEL SEROLOGICAL MARKER FOR PANCREATIC CANCER. uegweek2016(24th United European Gastroenterology Week). Poster, Vienna(Austria), 2016.10.15-19.
- ② Yano Y, Mizuta H, Ono M, Saibara T. (他 6 名): POTASSIUM-COMPETITIVE ACID BLOCKER-BASED THIRD-LINE TRIPLE THERAPY IN HELICOBACTER PY-LORI ERADICATION AND STUDY OF THE DIVERSITY OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES. uegweek2016(24th United European Gastroenterology Week). Poster, Vienna(Austria), 2016.10.15-19.
- ③ Munekage K, Ono M, Ochi T, Saibara T. (他 4 名): INVOLVEMENT OF AGE-RAGE SYSTEM FOR THE DEVELOPMENT OF HEPATIC FIBROSIS IN NASH. uegweek2016(24th United European Gastroenterology Week). Poster, Vienna(Austria), 2016.10.15-19.
- ④ Kohsaki T, Oe K, Kigi A, Saibara T, Munekage M, Hanazaki K: A case of osteoclast-like giant cell tumor of the pancreas without epithelial differentiation. The Joint Conference of the 47<sup>th</sup> annual meeting of the Japan Pancreas Society(JPS), the 20<sup>th</sup> meeting of the International Association of Pancreatology(IAP) and the 6<sup>th</sup> meeting of the Asian Oceanic Pancreatic Association(AOPA). Poster, Miyagi (Japan), 2016.8.4-7.
- ⑤ Kessoku T, Ono M, Egushi, Nakajima A. (他 13 名): EFFICACY OF GLUTATHIONE FOR THE TREATMENT OF NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE: AN OPEN-LABEL, MULTICENTER, PROSPECTIVE STUDY. EASL(51th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver). Poster, Barcelona(Spain), 2016.4.13-17.
- ⑥ Ono M, Ochi T, Oben J, Saibara T. (他 6 名): PNPLA3 IS INVOLVED IN HEPATIC LIPIDS METABOLISM THROUGH XBPI AND MODULATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN MICE. EASL(51th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver). Poster, Barcelona(Spain), 2016.4.13-17.
- ⑦ Taniuchi K, Furihata M, Iwasaki S, Saibara T: BCL enhances cell motility and invasion of pancreatic cancer cells. Asia-Pacific Digestive Week 2015. Taipei(Taiwan), 2015.12.3-6.
- ⑧ Kamada Y, Ono M, Saibara T, Takehara T, Miyoshi E. (他 15 名): A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis(NASH) using two glyco-biomarkers. AASLD The Liver Meeting. Poster, Sanfrancisco (USA) (Moscone west convention center), 2015.11.13-17.
- ⑨ Kogiso T, Ono M, Tokushige K. (他 13 名): Risk factors for hepatocellular carcinoma recurrence in patients with nonalcoholic and alcoholic fatty liver

- disease : A Japanese multicenter survey. ASLD The Liver Meeting . Poster , Sanfrancisco(USA), 2015. 11. 13-17.
- ⑩Taniuchi K, Saibara T. (他 5 名): Ruvbl1 directly binds actin filaments and induces formation of cell protrusions to promote pancreatic cancer cell invasion. Asian Pacific Digestive week 2014 . poster , Bali (Indonesia) , 2014. 11. 22-25.
- ⑪Taniuchi K, Saibara T. (他 5 名): Prdx1 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion by modulating p38 mapk activity. uegweek2014. poster, vienna(Austria), 2014. 10. 18-22.
- ⑫Ohmi S, Ono M, Saibara T, Fujimoto S. (他 8 名 ): Correlation between glucose intolerance and histological severity in non-alcoholic fatty liver disease. American Diabetes Association 74th Scientific Sessions 2014, San Francisco (USA), 2014. 6. 13-17
- ⑬Eguchi Y, Kitajima Y, Ono M, Anzai K(他 8 名): Insulin secretory function and HbA1c are related to liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease . EASL(49th Annual Meeting of The European Association For The Study of The Liver). London (UK), 2014. 4. 9-13.
- 【国内学会】
- ⑭川口巧, 小野正文, 鳥村拓司: 非B非C肝がんの発症・予後とアルブミンの関連: Random Forest 分析. 第 20 回日本肝臓学会大会(JDDW). パネルディスカッション3 「肝炎ウイルス制御下時代の肝臓診療」, 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市), 2016. 11. 3-11. 6.
- ⑮宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: NASH の肝線維化進展における AGE-RAGE 系の関与について. 第 52 回日本肝臓学会総会. ワークショップ 5 「NASH・NAFLD 研究の新展開」, ホテルニューオータニ幕張(千葉県・千葉市), 2016. 5. 19-20.
- ⑯谷内恵介, 西原利治: 膵がん患者血清を用いたエクソソーム mRNA の膵がん新規診断法の確立に向けた検討. 第 102 回日本消化器病学会総会. ワークショップ 10 「臨床検体が切り拓く新たな消化器疾患病態研究」, 京王プラザホテル(東京都・新宿区), 2016. 4. 21-23.
- ⑰宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: NAFLD 患者の肝線維化進展抑制には早期からの高インスリン血症, 血糖変動, DM 発症抑制への対策が重要である. 第 102 回日本消化器病学会総会. ワークショップ 3 「NAFLD/NASH 研究の新知見から臨床への新たな戦略」, 京王プラザホテル(東京都・新宿区), 2016. 4. 21-23.
- ⑱小野正文, 江口有一郎, 西原利治: 高知県における佐賀県方式肝炎対策導入の問題点とそれを補う本県独自の取り組みの効果について. 第 41 回日本肝臓学会西部会. ワークショップ「ウイルス性肝炎患者の受検・受療率の向上を目指して」, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015. 12. 3-4.
- ⑲宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: 高インスリン血症は糖尿病未発症 NAFLD 患者の肝線維化進展に重要な因子である. 第 41 回日本肝臓学会西部会. パネルディスカッション「NAFLD の病態と治療」, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2015. 12. 3-4.
- ⑳小笠原光成, 越智経浩, 廣瀬享, 岩崎信二, 西原利治: non-fibred IDC ball を使用した B-RT0 による肝性脳症の治療. 第 22 回日本門脈圧亢進症学会総会. パネルディスカッション「門脈圧亢進症に対する IVR 治療の現状と今後の展望」, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2015. 9. 10-11.
- ㉑廣瀬享, 岩崎信二, 西原利治, 宗景玄祐, 越智経浩, 小笠原光成, 藤村靖子, 小野正文: 当科における門脈血栓症に対する治療成績. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2015. 4. 23-25
- ㉒小笠原光成, 岩崎信二, 西原利治: non-fibred IDC ball を使用した BRT0 による肝性脳症の治療. シンポジウム「門脈圧亢進症の診断と治療: 残された課題と対策」. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2015. 4. 23-25.
- ㉓越智経浩, 小野正文, 西原利治: C 型慢性肝炎患者と NAFLD 患者の血糖日中変動に影響を及ぼす要因についての比較検討. パネルディスカッション「生活習慣病・メタボリックシンドロームと消化器疾患: 病態と治療」. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2015. 4. 23-25.
- ㉔越智経浩, 宗景玄祐, 小野正文: PNPLA3 遺伝子は ER stress を介した apoptosis に関与する. シンポジウム 「NAFLD/NASH の病態解明と治療の新展開」. 第 101 回日本消化器病学会総会. 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2015. 4. 23-25.
- ㉕越智経浩, 小野正文, 西原利治: PNPLA3 遺伝子は小胞体ストレスによる肝脂肪酸代謝による. 第 56 回日本消化器病学会大会. シンポジウム 「NAFLD/NASH の病態解析と新規治療」, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市), 2014. 10. 23-26.

②⑥小野正文, 越智経浩, 西原利治: 75gOGTT  
およびCGMS から見たNAFLDの耐糖能異常  
の特徴について. 第50回日本肝臓学会総  
会. パネルディスカッション, ホテルニュー  
オータニ(東京都・千代田区),  
2014. 5. 29-30.

②⑦小野正文, 川口巧, 西原利治: CGMS からみ  
たNAFLDとC型慢性肝炎の耐糖能異常の特  
徴と比較検討. 第100回日本消化器病学会  
総会. ワークショップ9「NAFLD/NASHにお  
ける新知見と治療法の進歩」, 東京国際フ  
ォーラム(東京都・千代田区),  
2014. 4. 23-26.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kochinai.jp/home/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野 正文 (ONO, Masafumi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学  
部門・准教授

研究者番号: 70304681

### (2) 研究分担者

中島 弘幸 (NAKASHIMA, Hiroyuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課  
程及び専門課程、動物実験施設、共同利用  
研究・免疫・微生物学)

部門・助教授

研究者番号: 10574064

西原 利治 (SAIBARA, Toshiji)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学  
部門・教授

研究者番号: 60145125