

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09023

研究課題名(和文)代謝性脂肪肝炎の基盤病態としての自然免疫・代謝連関と治療ストラテジー

研究課題名(英文) Innate immune regulation in metabolic steatohepatitis and experimental therapeutics

研究代表者

池嶋 健一 (Ikejima, Kenichi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：20317382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では代謝性脂肪肝炎(MetSH)における免疫代謝連関を解析し、アミノ酸グリシンによる免疫代謝病態への実験治療的アプローチを試みた。MetSHモデルであるKK-Ayマウスの耐糖能異常がグリシンで改善し、腸内マイクロバイオームの変化を伴うことが判明した。また、脂肪肝炎から肝腫瘍形成がみられる肝細胞特異的Pten-KOマウスでも、肝病変の進行に伴い肝内NK細胞やNKT細胞の枯渇やmyeloid suppressor細胞の増加が観察された。Pten-KOマウスの脂肪肝炎および肝腫瘍形成もグリシンにより抑制されることが示され、免疫栄養アプローチの有用性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of innate immune responses in metabolic steatohepatitis (MetSH), and evaluate the protective effect of amino acid on MetSH. In MetSH model KK-Ay mice, glycine ameliorated glucose intolerance, accompanied with changes in gut microbiota. Progressive depletion of hepatic NK and NKT cells, in combination with increases in myeloid suppressor cells, were observed in hepatocyte-specific Pten-KO mice, which spontaneously develop steatohepatitis and hepatocellular adenoma/carcinoma upon aging. Glycine also prevented steatohepatitis and tumorigenesis in Pten-KO mice. These findings clearly indicated that pharmaco-nutritional approach utilizing glycine is promising for prevention and treatment of MetSH including MetSH-related carcinogenesis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎(NASH) 自然免疫 NKT細胞 腸内マイクロバイオーム アミノ酸 免疫栄養  
耐糖能異常

## 1. 研究開始当初の背景

欧米や日本を中心とした先進諸国では、肥満人口の急増に伴うメタボリック・シンドローム (MetS) 関連病態への対策が急務とされている。肝臓は代謝の要を担う臓器であり、MetS の肝病態としての非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)、特に進行性の肝臓病である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) が注目されてきた。特に、MetS 関連の脂肪肝炎 (Metabolic steatohepatitis; MetSH) の名称が提唱されている。しかし、NAFLD・NASH の治療に関しては未だ有効な薬物療法は確立しておらず、NASH からの肝発癌についても対策が不十分である。

私たちはこれまで、代謝機能の病的変化における免疫系の果たす役割に着目し、脂肪肝炎の肝病態での自然免疫系細胞の機能的発現について検討を進めてきた。肝臓には在住マクロファージである Kupffer 細胞に加え、NK 細胞 (Pit 細胞) や NKT 細胞などの自然リンパ球が多く局在しているが、MetSH モデルである KK-A<sup>y</sup> マウスでは肝 NKT 細胞分画が減少し、サイトカイン産生能も低下していることを明らかにした。また、NKT 細胞が全身性に欠損している CD1d-KO マウスや NK1.1 抗体を用いた NKT 細胞枯渇条件下では高脂肪食による脂肪肝形成が促進されることを見いだした。しかし、肝自然免疫系による MetSH の病態形成および肝代謝調節メカニズムに関しては、まだその一端が明らかにされているに過ぎず、その多くは未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、メタボリック・シンドローム関連肝病態である MetSH の発症・進展における肝内自然免疫系の機能的役割を詳細に解析するとともに、腸管-肝臓機能連関や肝内自然免疫系をターゲットとした実験治療的アプローチの検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) MetSH の発症・進展のアミノ酸グリシンによる制御と腸内マイクロバイオームの変化に関する検討

私たちはこれまで MetS モデル KK-A<sup>y</sup> マウスにおける脂肪肝炎進行がアミノ酸グリシンの経口摂取で抑制されることを見出し報告してきた。本研究では、そのメカニズム解析の一環として、KK-A<sup>y</sup> マウスの耐糖能異常に対するグリシンの作用を明らかにするべく、KK-A<sup>y</sup> マウスにコントロール食ないし 5% グリシン含有飼料を 1 週間摂餌した後に腹腔内糖負荷試験 (IPGTT) を行った。また、グリシンによる腸内マイクロバイオームの質的・量的変化について 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシークエンシングによる菌叢解析を行い、肝代謝機能との関連を検討した。

(2) 肝細胞特異的 Pten-KO マウスの肝発癌過程における肝内自然免疫系の関与と免疫栄養アプローチ

肝細胞特異的 Pten-KO マウスは 10 週齢前後の幼若マウスですでに脂肪肝炎の病理像を呈し、30~50 週齢で明らかな肝腫瘍形成を認める。そこで、Pten-KO マウスでの腸内マイクロバイオーム変化について検証するとともに、肝臓から単核球分画を分離し、自然リンパ球の発現について FACS 解析すると共に、リアルタイム PCR 法で肝内の各種サイトカイン発現レベルの測定を行った。また、Pten-KO の肝腫瘍形成に対するグリシンの影響について検証した。

(3) 肝病態形成における PAMPs/DAMPs 認識機構の検討

自然免疫系の賦活メカニズムにはマイクロバイオーム成分などの病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular pattern; PAMPs) および、傷害を受けた自己由来物質を危険シグナル分子 (danger/damage-associated molecular pattern; DAMPs) の認識機構が関与している。本研究では肝内 PAMPs/DAMPs 認識機構解析の一環として、二重鎖 (ds) RNA 認識機構に着目し、dsRNA である poly I:C による肝内サイトカイン誘導とその分子機構の性差および、poly I:C 長期投与による胆管病変形成について検討した。

さらに、poly I:C 誘発胆管病変に対するグリシンの保護作用についても検証した。

## 4. 研究成果

(1) KK-A<sup>y</sup> マウスの耐糖能異常に対するグリシンの作用と腸内マイクロバイオームの変化

私たちはこれまで MetSH モデル KK-A<sup>y</sup> マウスでは脂肪肝形成および肝内の炎症性変化がグリシン経口摂取により抑制されることを示してきた。本研究では、耐糖能異常に対するグリシンの作用を明らかにするため、KK-A<sup>y</sup> マウスにグリシン含有飼料を 1 週間摂餌した後に IPGTT を行った。KK-A<sup>y</sup> マウスでは糖負荷後に著明な高血糖を呈したが、グリシン摂餌群では糖負荷後の血糖上昇が有意に抑制されることが判明した。そこで、インスリン負荷試験を試みたが、インスリン負荷後の血糖値低下はグリシン投与の有無で差異を認めなかった。従って、グリシンは KK-A<sup>y</sup> マウスの耐糖能を改善させる作用を有するも、インスリン抵抗性改善作用は明らかではなく、異なる糖代謝調節メカニズムの存在が示唆された。

グリシン投与時の腸内細菌叢の変化については、グリシン摂餌群ではプロテオバクテリアの増加など菌叢バランスの変化がみられることが明らかになった。その詳細は引き続き検討中である。

## (2) 肝細胞特異的 Pten-KO マウスにおける肝内自然免疫系の解析とアミノ酸による脂肪肝炎および肝腫瘍形成抑制効果の検証

Pten-KO では肝組織中の NK 細胞および NKT 細胞分画が経時的に減少し、50 週齢では NKT 細胞がほぼ枯渇して Th2 系サイトカインである IL-4 および IL-13 の発現が著明に低下することが明らかになった。また、NKT 細胞減少の一因として、Gr1+CD11b+ myeloid suppressor 細胞の増加が関与している可能性が示唆された。

また、PTEN-KO マウスにおけるグリシンのケモプリベンション効果について検討した。すでに脂肪肝炎が発症している 25~30 週齢の PTEN-KO マウスに 20 週間にわたり 5% グリシン含有飼料を投与することにより、脂肪肝炎進展および腫瘍形成の抑制傾向が観察された。

## (3) 肝内 PAMPs/DAMPs 認識系における性差の解析

二重鎖 (ds) RNA である poly I:C に対する肝内自然免疫反応および自己免疫誘導について検討を行った。poly I:C による炎症性サイトカインや 1 型インターフェロン (IFN) の誘導には明らかな雌雄差が存在し、poly I:C 反復投与による胆管病変形成や自己抗体誘導も雄性マウスでは殆ど生じず雌性マウスでのみ顕著に認められることを見出した。さらに、これらの分子基盤として、dsRNA 認識機構である RIG-I の肝組織中での発現が雌性マウスで亢進しており、卵巣摘除マウスでは肝内 RIG-I 発現が低下することが判明した。さらに、卵巣摘除マウスに対してエストロゲン補充を行った際には、RIG-I 発現上昇に伴い炎症性サイトカインの誘導も増強することが明らかになった。

これらの事象は、LPS 認識機構である CD14/TLR4 経路に雌雄差があることとも類似しており、肝病態形成における性差のメカニズムの一端を表していると考えられる。

加えて、グリシンが dsRNA によるサイトカイン・IFN 誘導や肝病変発症も抑制することが明らかになった。従って、グリシンは免疫栄養作用を有しており、肝内自然免疫反応を多面的に制御し、脂肪肝炎を含む多彩な肝病態に保護的に作用することが示唆された。

### 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 9 件)

1. Watanabe S, Hashimoto E, Ikejima K, et al. (員数 20 人中 3 番目) Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 50;2015,364-77. doi:10.1007/s00535-015-1050-7

2. Morinaga M, Kon K, Saito H, Arai K, Kusama H, Uchiyama A, Yamashina S, Ikejima K, Watanabe S. Sodium 4-phenylbutyrate prevents murine dietary steatohepatitis caused by trans-fatty acid plus fructose. *J Clin Biochem Nutr* 57;2015,183-91. doi:10.3164/jcfn.15-75
3. Nakadera E, Yamashina S, Izumi K, Inami Y, Sato T, Fukushima H, Kon K, Ikejima K, Ueno T, Watanabe S. Inhibition of mTOR improves the impairment of acidification in autophagic vesicles caused by hepatic steatosis. *Biochem Biophys Res Commun* 469;2016, 1104-10. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.010
4. Takashima S, Ikejima K, Arai K, Yokokawa J, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Glycine prevents metabolic steatohepatitis in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice through modulation of hepatic innate immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311;2016,G1105-G1113. doi:10.1152/ajpgi.00465.2015.
5. Kon K, Ikejima K, Morinaga M, Kusama H, Arai K, Aoyama T, Uchiyama A, Yamashina S, Watanabe S. L-carnitine prevents metabolic steatohepatitis in obese diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *Hepatol Res* 47;2017,E44-E54. doi:10.1111/hepr.12720.
6. Kusama H, Kon K, Ikejima K, Arai K, Aoyama T, Uchiyama A, Yamashina S, Watanabe S. Sodium 4-phenylbutyric acid prevents murine acetaminophen hepatotoxicity by minimizing endoplasmic reticulum stress. *J Gastroenterol* 52;2017,611-622. doi:10.1007/s00535-016-1256-3.
7. Aoyama T, Kuwahara-Arai K, Uchiyama A, Kon K, Okubo H, Yamashina S, Ikejima K, Kokubu S, Miyazaki A, Watanabe S. Spleen-derived lipocalin-2 in the portal vein regulates Kupffer cells activation and attenuates the development of liver fibrosis in mice. *Lab Invest* 97;2017, 890-902. doi:10.1038/labinvest.2017.44.
8. Aoyama T, Takada H, Uchiyama A, Kon K, Yamashina S, Ikejima K, Ban H, Watanabe S. *Intern Med* 2017;56,1651-1656. doi:10.2169/internalmedicine.56.8187
9. 渡辺純夫, 今一義, 池嶋健一. NASH を考える. *日本消化器病学会雑誌* 115;2018,1-9. doi:10.11405/nisshoshi.115.1.

[学会発表](計 15 件)

1. Ikejima K, Arai K, Kon K, Uchiyama A,

- Yamashina S, Watanabe S. Dietary glycine improves impaired glucose tolerance by modulating polarization of Kupffer cells in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. Digestive Disease Week, Washington DC, USA (2015.5.17)
2. 池嶋健一, 今一義, 渡辺純夫. Steatohepatitis syndrome の共通病態基盤としての Kupffer 細胞極性変化と免疫栄養的制御. 第 51 回日本肝臓学会総会, 熊本 (2015.5.22)
  3. Ikejima K, Kon K, Watanabe S. Immuno-nutritional approach for impaired glucose tolerance in metabolic steatohepatitis through modulation of Kupffer cell function. 第 23 回日本消化器関連学会週間(JDDW), 東京 (2015.10.9)
  4. Ikejima K, Yokokawa J, Arai K, Uchiyama A, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Contribution of regulatory T cells in pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in mice. 18th International Symposium on the Cells of Hepatic Sinusoid, Asilomar, CA, USA (2015.11.11-13)
  5. Ikejima K, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Metabolic disease and NASH. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (招待講演), 東京 (2016.2.23)
  6. 池嶋健一. NAFLD・NASH の病態形成と自然免疫. 第 53 回日本消化器免疫学会総会 (招待講演), 大阪 (2016.7.15)
  7. Ikejima K, Fukuhara K, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Real-world efficacy of antiviral treatment using a combination of daclatasvir and asunaprevir in Japanese patients of chronic hepatitis C. HCV2016, 京都 (2016.10.11-15)
  8. 染谷秀忍, 池嶋健一, 内山明, 鈴木麻衣子, 青山友則, 今一義, 山科俊平, 渡辺純夫. 自己免疫性胆管病変マウスモデルにおける性差の解析. JDDW2016, 神戸 (2016.11.3-6)
  9. Someya S, Ikejima K, Uchiyama A, Arai K, Kon K, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S. Gender-specific development of experimental autoimmune cholangitis induced by double-stranded RNA. The Liver Meeting 2016 (AASLD), Boston, MA, USA (2016.11.11-14)
  10. Ikejima K, Yaginuma R, Kon K, Aoyama T, Uchiyama A, Yamashina S, Watanabe S. Efficacy of denosumab on progression of osteoporosis in autoimmune liver diseases. The Liver Meeting 2016 (AASLD), Boston, MA, USA (2016.11.11-14)
  11. Fukushima H, Yamashina S, Arakawa A, Taniguchi G, Aoyama T, Uchiyama A, Kon K, Ikejima K, Watanabe S. The formation of P62-positive inclusion body is associated with macrophage polarization in non-alcoholic fatty liver disease. Digestive Disease Week, Chicago, IL, USA (2017.5.6-9)
  12. Uchiyama A, Ikejima K, Kon K, Arai K, Fukuhara K, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S. Glycine minimizes murine autoimmune cholangitis and pancreatitis caused by double-stranded RNA through modulation of innate immune responses. Digestive Disease Week, Chicago, IL, USA (2017.5.6-9)
  13. Kon K, Ikejima K, Uchiyama A, Arai K, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S. L-carnitine changes hepatic lipid composition and prevents lipotoxicity in high-fat diet-fed KK-A<sup>y</sup> mice. Digestive Disease Week, Chicago, IL, USA (2017.5.6-9)
  14. Ishizuka K, Kon K, Ikejima K, Suzuki M, Arai K, Uchiyama A, Aoyama T, Yamashina S, Watanabe S. Aging exacerbates high-fat diet-induced steatohepatitis through blunting of lipid metabolic response in mice. the Liver Meeting 2017 (AASLD), Washington DC, USA (2017.10.20-24)
  15. Uchiyama A, Ikejima K, Someya S, Arai K, Aoyama T, Kon K, Yamashina S, Watanabe S. Female hormone enhances hepatic innate and autoimmune responses against double-stranded RNA. the Liver Meeting 2017 (AASLD), Washington DC, USA (2017.10.20-24)
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
池嶋 健一 (IKEJIMA, Kenichi)  
順天堂大学・医学部・教授  
研究者番号: 20317382
  - (2)研究分担者  
山科 俊平 (YAMASHINA, Shunhei)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30338412
  - 今 一義 (KON, Kazuyoshi)  
順天堂大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30398672
  - (3)連携研究者  
竹田 和由 (TAKEDA, Kazuyoshi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准  
教授  
研究者番号：80272821