

令和元年9月2日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05171

研究課題名(和文)代謝性組織リモデリングとその変容によるメタボリックシンドロームの分子機構の解明

研究課題名(英文) Role of "metabolic" tissue remodeling in the pathophysiology of obesity-induced chronic inflammation

研究代表者

菅波 孝祥 (Suganami, Takayoshi)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：50343752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、遺伝性肥満MC4R欠損マウスを用いて、肥満やインスリン抵抗性を背景として、脂肪肝、NASH、肝細胞癌を経時的に発症する動物モデルを作製し、その病態メカニズムの解明に取り組んでいる。本研究では、誘導性に短期間でNASHや肝細胞癌を発症する新たな動物モデルを開発し、さらに肝細胞死を核として組織リモデリングを促進する微小環境(CLS)を見出した。これにより、種々の薬剤によるNASH治療効果を効率よく検討するとともに、その作用機序の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、数多くの抗糖尿病薬が上市され、糖尿病治療は、単に血糖値を低下させるのみならず、合併症を予防することに重点が置かれるようになってきた。即ち、脂肪肝やNASHに対する抗糖尿病薬の効果が注目されている。そこで本研究では、種々の薬剤のNASHに対する薬効評価を実施した。CLSに着目することにより、治療効果の定量的評価が可能となり、作用機序の一端も明らかになるなど、今後の治療法の開発に資すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to understand the molecular mechanism underlying NASH, we employed genetically obese melanocortin-4 receptor-deficient mice, which sequentially developed simple steatosis, NASH, and hepatocellular carcinoma (HCC) when they were fed a Western diet. We also develop novel accelerated animal models which exhibited NASH and HCC in the short-term. Using these animal models, we identified a unique histological structure termed "crown-like structure", in which macrophages aggregated around dead hepatocytes, thereby accelerating tissue remodeling during the disease progression from simple steatosis to NASH. Our data suggest that CLS is useful to examine the molecular mechanisms how certain drugs ameliorated NASH.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：慢性炎症 肥満 非アルコール性脂肪肝炎 マクロファージ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

①研究の学術的背景

メタボリックシンドロームの概念は、内臓脂肪型肥満を背景として比較的軽度な代謝異常が重積し、種々の生活習慣病が顕在化する過程を指摘したものである。従って、脂肪組織機能の障害はメタボリックシンドロームの病態基盤となる。一方、メタボリックシンドロームにおける慢性炎症の意義が注目されている。慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な細胞間コミュニケーションが持続し、最終的には間質の線維化を来して臓器機能不全に至る。実際、肥満の脂肪組織では、実質細胞である脂肪細胞の肥大化に加え、炎症細胞浸潤、血管新生、細胞外マトリックスの過剰産生などのダイナミックな形態的变化が認められる(脂肪組織リモデリング)。しかしながら、過栄養により誘導される代謝性組織リモデリングは未だ概念的なものであり、その実態や臓器特異性、組織機能に及ぼす影響についてはほとんど未解明である。

研究代表者は、肥満の脂肪組織において脂肪細胞とマクロファージの相互作用により炎症が慢性化することを世界に先駆けて提唱し (*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005)、脂肪組織炎症の新たな制御分子を同定してきた (*Diabetes* 2011, 2014; *Circ. Res.* 2009; *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007)。従来、肥満の脂肪組織において、代謝ストレスにより細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲んで食食・処理する組織像として CLS (crown-like structure) が知られていたが、局所における意義は不明であった。研究代表者は、結核菌を認識する病原体センサーの macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) が CLS を構成する炎症促進性 M1 マクロファージ (CD11c 陽性) に特異的に誘導されること、Mincle 欠損マウスでは、肥満の脂肪組織における CLS 形成と間質線維化が抑制されて脂肪蓄積量が増加するために肝異所性脂肪蓄積 (脂肪肝) が軽減することを見出した (*Nat. Commun.* 2014)。即ち、脂肪組織リモデリングは脂肪蓄積能 (脂肪組織の代謝機能) の主要な制御機構であり、遊離脂肪酸を介する臓器間ネットワークにより異所性脂肪蓄積にも関与することが示唆される。さらに、同様の分子メカニズムが非アルコール性脂肪肝 (NASH) においても認められることを見出した。研究代表者は、独自に開発した新しい NASH モデルマウスあるいは NASH 患者の肝臓において、CLS 様の組織像を同定し、これを起点として NASH を発症することを明らかにした (*PLoS ONE* 2013; *Am. J. Pathol.* 2011)。実際、肝臓 CLS 周囲において TGF- β の活性化や活性化線維芽細胞の集積、コラーゲンの沈着を認める。脂肪組織 CLS と同様に、肝臓 CLS も CD11c 陽性マクロファージにより構成され、周囲の組織マクロファージ (クッパー細胞) とは明確に区別された。興味深いことに、同程度の肝障害を呈する慢性ウイルス性肝炎患者では肝臓 CLS を全く認めない。このように、脂肪組織や肝臓の CLS は実質細胞と間質細胞の相互作用の場であり、過栄養により誘導される代謝性組織リモデリングに共通の駆動エンジンと考えられる。

2. 研究の目的

このような背景を踏まえて本研究では、肥満の脂肪組織と NASH において共通に認められる組織学的構造 CLS に焦点を当てて、代謝性組織リモデリングとそれによりもたらされる組織機能障害の分子機構を解明する。近年、数多くの抗糖尿病薬が上市され、単に血糖値を低下させるのみならず、合併症の予防に糖尿病治療の重点が置かれている。CLS に着目した薬効評価が、種々の治療法の効果判定や作用機序解明に資する可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 動物モデル;

遺伝性肥満を呈する MC4R 欠損マウスは、テキサス大学 Joel Elmquist 博士から分与を受け、C57BL/6J バックグラウンドに戻し交配した。MC4R 欠損マウスに Western diet (D12079B; 468 kcal/100 g, 41% energy as fat, 34.0% sucrose, 0.21% cholesterol; Research Diets 社) を負荷し、NASH の検討には 20 週、肝細胞癌の検討には 1 年まで観察した。

(2) 試薬等;

FXR (farnesoid X receptor) アゴニストの Obeticholic acid (6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid) は大日本住友製薬、SGLT2 (sodium glucose cotransporter 2) 阻害剤の Canagliflozin は田辺三菱製薬、

DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) 阻害剤の Anagliptin は三和化学より、それぞれ供与を受けた。

(3) Real-time PCR ;

種々の培養マクロファージをリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、6 時間および 24 時間後にサンプリングした。total RNA を抽出、real-time PCR 法 (StepOnePlus, Thermo Fisher Scientific 社) により mRNA レベルを測定した。

(4) 組織学的解析 ;

ホルマリン固定、パラフィン切片を用いて、定法に従って免疫染色を行った。マクロファージマーカーの F4/80 染色により肝臓 CLS を同定した。

4. 研究成果

(1) NASH の発症・進展における核内受容体 FXR の意義に関する検討 ;

最近、臨床試験にて FXR アゴニストの NASH に対する有効性が示唆されているが、その作用機序はよく分かっていない。基礎研究では、肝星細胞やマクロファージに FXR が発現し、FXR 活性化により抗炎症、抗線維化作用がもたらされると報告されているが、FXR は肝細胞に最も豊富に発現している。そこで FXR アゴニストを MC4R 欠損マウスに投与したところ、糖代謝には明らかな影響を及ぼさない一方、強力な抗 NASH 作用を認めた。組織学的には、脂肪肝改善作用に比して、肝細胞障害 (風船様変性) や炎症、線維化が顕著に抑制された。FXR アゴニストの効果は、我々が確立した誘導性 NASH モデルにおいても同様に認められた。この誘導性 NASH モデルを用いた検討により、FXR アゴニストの効果は脂質代謝作用とは独立している可能性が考えられた。実際、FXR アゴニストを投与した肝臓において、肝細胞死の抑制が観察され、単離肝細胞において細胞死シグナルの抑制が認められた。本研究により、肝細胞を標的とする FXR アゴニストの新たな抗 NASH 作用が示唆された。(Sci. Rep. 8: 8157, 2018)

(2) NASH の発症・進展における SGLT2 阻害剤の意義に関する検討 ;

新しい糖尿病治療薬の SGLT2 阻害剤は、血糖低下作用に加えて、肝臓における抗脂肪肝効果など多面的な作用を有している。そこで、SGLT2 阻害剤を MC4R 欠損マウスに投与したところ、血糖値の低下、体重増加の抑制、脂肪肝の改善など既知の効果に加えて、CLS 形成や間質線維化が強力に抑制されることを見出した。この機序として、SGLT2 阻害剤が GSH 産生を介して抗酸化作用を発揮することが明らかになった。さらに、約 1 年間投与を継続すると、MC4R 欠損マウスにおける肝細胞癌の発生が顕著に抑制されることを見出した。この機序は未だ明らかでないが、非腫瘍部における線維化抑制され、Myc や AFP 発現が低下することを観察している。

(Sci. Rep. 8: 2362, 2018)

(3) NASH の発症・進展における DPP-4 阻害剤の意義に関する検討 ;

DPP-4 阻害剤は現在最も広く使用されている抗糖尿病薬で、血糖低下作用に加えて、肝臓における抗脂肪肝効果など多面的な作用が報告されている。そこで、DPP-4 阻害剤を MC4R 欠損マウスに投与したところ、予想に反して血糖値や脂肪肝の改善効果が認められなかった。この時、血中 GLP-1 活性やインスリン値は上昇したが、MC4R 欠損マウスの強いインスリン抵抗性のためと考えられる。一方、肝臓 CLS は同程度に形成されたものの、炎症や線維化は顕著に抑制された。この機序として、死細胞に応答するマクロファージの活性を GLP-1 が抑制した可能性を考えている。さらに 1 年間の長期投与により、肝細胞癌の発症が有意に抑制されることを見出した。(論文投稿準備中)

(4) 短期間で NASH 肝癌を発症する新たな動物モデルの開発 ;

MC4R 欠損マウスは、肥満やインスリン抵抗性を背景として、脂肪肝、NASH、肝細胞癌を経時的に発症するユニークな動物モデルであるが、肝細胞癌の発症に約 1 年を要するのが技術的な障壁であった。実際、種々の治療法が NASH 肝癌抑制効果を示したが、その作用機序を検証することは困難である。そこで、より短期間で肝腫瘍を発症する新たな動物モデルの開発を試みた。様々な検討の結果、MC4R 欠損マウスに肝癌誘発化学物質であるジエチルニトロソアミン (DEN) を投与することにより、肝腫瘍形成を従来の 1 年から 2-3 ヶ月程度に短縮する新し

い NASH 肝癌モデルを開発に成功した (特願 2018-198437)。既に開発した誘導性 NASH モデル (特願 2015-122913) など、複数の動物モデルを組み合わせることにより、代謝性組織リモデリングの病態解明や新規治療標的の同定、薬効評価系としての利用などが促進すると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

1. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto. Microneedle-array patch fabricated with enzyme-free polymeric components capable of a weekly on-demand insulin delivery. **Adv. Funct. Mater.** 1807369, 2018. (cover article of the issue) (査読有)
2. T. Yamada, Y. Kashiwagi, T. Rokugawa, H. Kato, H. Konishi, T. Hamada, R. Nagai, Y. Masago, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa, H. Watabe, K. Abe. Evaluation of hepatic function using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in melanocortin 4 receptor-deficient mice as a model of nonalcoholic steatohepatitis. **Magn. Reson. Imaging** 57: 210-217, 2018. (査読有)
3. T. Goto, M. Itoh, *T. Suganami, S. Kanai, I. Shirakawa, T. Sakai, M. Asakawa, T. Yoneyama, T. Kai, Y. Ogawa. Obeticholic acid protects against hepatocyte death and liver fibrosis in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** 8: 8157, 2018. (査読有)
4. N. Chiyonobu, S. Shimada, Y. Akiyama, K. Mogushi, M. Itoh, K. Akahoshi, S. Matsumura, K. Ogawa, H. Ono, Y. Mitsunori, D. Ban, A. Kudo, S. Arii, T. Suganami, S. Yamaoka, Y. Ogawa, M. Tanabe, S. Tanaka. FABP4 overexpressed in intratumoral hepatic stellate cells within hepatocellular carcinoma with metabolic risk factors. **Am. J. Pathol.** 188: 1213-1224, 2018. (査読有)
5. M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa, *T. Suganami. Molecular mechanism of obesity-induced “metabolic” tissue remodeling. **J. Diabetes Investig.** 9: 256-261, 2018. (review) (査読有)
6. K. Shiba, K. Tsuchiya, C. Komiya, Y. Miyachi, K. Mori, N. Shimazu, S. Yamaguchi, N. Ogasawara, M. Katoh, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Canagliflozin, an SGLT2 inhibitor, attenuates the development of hepatocellular carcinoma in a mouse model of human NASH. **Sci. Rep.** 8: 2362, 2018. (査読有)
7. M. Itoh, *T. Suganami, H. Kato, S. Kanai, I. Shirakawa, T. Sakai, T. Goto, M. Asakawa, I. Hidaka, H. Sakugawa, K. Ohnishi, Y. Komohara, K. Asano, I. Sakaida, M. Tanaka, Y. Ogawa. CD11c-positive resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. **JCI Insight** 2: e92902, 2017. (査読有)
8. A. Matsumoto, M. Tanaka, H. Matsumoto, K. Ochi, Y. Moro-oka, H. Kuwata, H. Yamada, I. Shirakawa, T. Miyazawa, H. Ishii, K. Kataoka, Y. Ogawa, Y. Miyahara, *T. Suganami. Synthetic “smart-gel” provides glucose-responsive insulin delivery in diabetic mice. **Sci. Adv.** 3: eaaq0723, 2017. (cover picture of the issue) (査読有)
9. D. Takahashi, T. Mori, E. Sohara, M. Tanaka, M. Chiga, Y. Inoue, N. Nomura, M. Zeniya, H. Ochi, S. Takeda, T. Suganami, T. Rai, S. Uchida. WNK4 is an adipogenic factor and its deletion reduces diet-induced obesity in mice. **EBioMedicine** 18: 118-127, 2017. (査読有)
10. C. Komiya, M. Tanaka, K. Tsuchiya, N. Shimazu, K. Mori, S. Furuue, Y. Miyachi, K. Shiba, S. Yamaguchi, K. Ikeda, K. Ochi, K. Nakabayashi, K. Hata, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. **Sci. Rep.** 7: 44754, 2017. (査読有)
11. M. Tanaka, *T. Suganami. Molecular mechanism underlying nutritional control of inflammatory responses. **J. Phys. Fitness Sports Med.** 6: 227-231, 2017. (review) (査読有)
12. A. Nakajima, A. Nakatani, S. Hasegawa, J. Irie, T. Suganami, H. Itoh, I. Kimura. The short chain fatty acid receptor GPR43 regulates inflammatory signals in adipose tissue M2-type macrophages. **PLoS ONE** 12: e0179696, 2017. (査読有)
13. R. Hachiya, T. Shiihashi, I. Shirakawa, Y. Iwasaki, Y. Matsumura, Y. Oishi, Y. Nakayama, Y. Miyamoto, I. Manabe, K. Ochi, M. Tanaka, N. Goda, J. Sakai, *T. Suganami, Y. Ogawa. The H3K9

- methyltransferase Setdb1 regulates TLR4-mediated inflammatory responses in macrophages. **Sci. Rep.** 6: 28845, 2016. (査読有)
14. RT. Jennings, E. Odkhuu, A. Nakashima, N. Morita, T. Kobayashi, I. Yamai, M. Tanaka, T. Suganami, S. Haga, M. Ozaki, Y. Watanabe, Y. Nagai, K. Takatsu, T. Kikuchi-Ueda, I. Ichimonji, Y. Ogawa, H. Takagi, T. Yamazaki, K. Miyake, S. Akashi-Takamura. Inflammatory responses increase secretion of MD-1 protein. **Int. Immunol.** 28: 503-512, 2016. (査読有)
 15. Y. Watanabe, Y. Nagai, H. Honda, N. Okamoto, S. Yamamoto, T. Hamashima, Y. Ishii, M. Tanaka, T. Suganami, M. Sasahara, K. Miyake, K. Takatsu. Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation in vitro and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. **Sci. Rep.** 6: 23097, 2016. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

1. Takayoshi Suganami, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa. CD11c⁺ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. 2019 Keystone Symposia 2019.2.11-14 Banff, Canada. (ポスター)
2. 菅波孝祥. 脂肪肝・NASH の現状とイメージング技術の重要性. 理研シンポジウム「画像ビッグデータが切り拓く健康・医学の新時代」 2019.1.18 東京. (招待講演)
3. Takayoshi Suganami. Emerging concept of immunometabolism response and cellular metabolism. 第 47 回日本免疫学会学術集会 2018.12.10-12 福岡. (招待講演)
4. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. 脂肪組織の炎症と脂肪毒性. 第 40 回日本臨床栄養学会総会・第 39 回日本臨床栄養協会総会 第 16 回大連合大会 2018.10.5-7 京都. (招待講演)
5. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. 過栄養により誘導される慢性炎症の分子機構. 第 55 回日本臨床分子医学会 2018.4.13-14 京都. (招待講演)
6. Takayoshi Suganami, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa. CD11c⁺ resident macrophages drive hepatocyte death-triggered liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. 2018 Keystone Symposia 2018.3.24-28 Dublin, Ireland. (招待講演)
7. Takayoshi Suganami, Miyako Tanaka, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa. Obesity-induced “metabolic” tissue remodeling in adipose tissue and liver. 16th Surugadai International Symposium 2017.10.11 Tokyo, Japan. (招待講演)
8. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. 脂肪組織-肝臓連関の破綻と非アルコール性脂肪肝炎の新たな病態メカニズム. 第 38 回日本肥満学会 2017.10.7-8 大阪. (招待講演)
9. 菅波孝祥. メラノコルチン 4 型受容体欠損マウスを用いた NASH・肝細胞癌モデル. 第 13 回酸化ストレスと肝研究会 2017.2.25 福岡. (招待講演)
10. Takayoshi Suganami, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa. Tissue-resident macrophages constituting hepatic crown-like structure induce liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. 2017 Keystone Symposia 2017.1.23-26 Keystone, USA. (ポスター)
11. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. 脂肪組織-肝臓連関の破綻による異所性脂肪蓄積の新たな分子機構. 第 20 回日本心血管内分泌学会学術総会 2016.12.16-17 東京. (招待講演)
12. Takayoshi Suganami, Miyako Tanaka, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa. Obesity-induced adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. The 10th Congress of the Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases 2016.7.14-16 Tokyo, Japan. (招待講演)
13. Takayoshi Suganami, Miyako Tanaka, Michiko Itoh, Yoshihiro Ogawa. Role of obesity-induced tissue remodeling in the metabolic syndrome. 第 38 回日本血栓止血学会学術集会 2016.6.16-18 奈良. (招待講演)
14. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. 脂肪組織の慢性炎症. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016.5.19-21 京都. (招待講演)

[図書] (計 4 件)

1. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. メタボリックシンドロームとリポクオリティ. 実験医学増刊号「脂質が支えるバイオロジー」羊土社, 第 36 号 10 巻 Page 174-179, 2018 年.
2. 菅波孝祥. ～個体から細胞、および全ライフコースの視点で統合的に理解してメタボ克服に挑む～. 実験医学 10 月号「脂肪の量と質を「制御」する」羊土社, 第 36 号 16 巻 Page 2698-2704, 2018 年.
3. 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏. メタボリックシンドロームと細胞死. 実験医学 (増刊号)「細胞死」羊土社, 第 34 号 7 巻 Page 135-141, 2016 年.
4. *T. Suganami, M. Tanaka, Y. Ogawa. Molecular mechanisms underlying obesity-induced chronic inflammation. Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation. Springer Japan, 291-298, 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：非アルコール性脂肪肝炎及び/又は肝臓がんのモデル動物の製造方法

発明者：菅波孝祥、田中 都、越智 梢

権利者：国立大学法人 名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2018-198437

出願年：2018 年

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

URL: <http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mmm/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 美智子

ローマ字氏名：Itoh, Michiko