

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02801

研究課題名(和文)肝線維化の素過程におけるマクロファージの意義および活性化調節機構の解明

研究課題名(英文) Study on the regulatory mechanisms of macrophage in the fundamental process of liver fibrosis

研究代表者

田中 稔 (Tanaka, Minoru)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・細胞療法開発研究室長

研究者番号：80321909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：オンコスタチンM(OSM)が強力な肝線維化誘導作用を有するという発見に基づき、線維化進行過程における肝星細胞と肝マクロファージによる細胞間相互作用の一端を明らかにした。慢性肝障害モデルを施した野生型とOSM KOマウスから肝常在マクロファージであるクッパー細胞と骨髄由来マクロファージをそれぞれ回収し、RNA-seq解析に供した結果、骨髄由来マクロファージでOSM依存的に誘導される線維化関連分子を複数同定することができた。それらの分子の中には、肝線維化時に肝臓で発現上昇するとともに、アデノ随伴ウイルスを用いてマウス正常肝内で発現させると線維化を誘導する新規分子が含まれていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肝障害が長い経過を迎えると肝線維化が進行し、やがては肝硬変・肝がんに至る。そのため、肝線維化の治療法の開発は喫緊の課題となっているが、未だ有効な治療法は確立されていない。肝線維化は多くの細胞が関わる複雑なプロセスにより進行することが想定されているが、その全容については不明な点が多く残る。本研究では肝星細胞と肝マクロファージ間の細胞間相互作用が肝線維化において重要であることを明らかにするとともに、マクロファージが産生する新規線維化促進因子の同定にも成功しており、今後、新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, based on the discovery that Oncostatin M (OSM) exhibits a powerful fibrotic activity in liver fibrosis, we shed light on a crucial role of cell-cell interaction between hepatic stellate cells and the other non-parenchymal cells during liver fibrogenesis. Especially, we focused on two hepatic macrophages, Kupffer cells (KC), a resident hepatic macrophage and bone marrow-derived macrophages (BMDM). To find OSM-dependent factors relevant to liver fibrosis, we compared the gene expression profiles of KC and BMDM from wild-type and OSM KO mice, which were subjected to chronic hepatitis by RNA-seq analysis. As a result, we could identify several factors of which expression is upregulated in fibrotic liver. Among them, we found that a few factors could induce liver fibrosis in normal liver by their enforced expression via adeno-associated viral vector. Thus, we succeeded to identifying novel secretory factors from macrophages related to liver fibrogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：線維化 マクロファージ 星細胞 サイトカイン 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

従来の肝線維化研究では TGFβ の作用を中心に研究が進められてきた。しかし、TGFβ を標的とした治療戦略では十分な効果が得られていないことから、他の分子にも目を向けなければならない段階に来ている。我々は IL-6 ファミリーサイトカインである Oncostatin M (OSM) をマウス肝臓で発現させるだけで、著しい肝線維化が誘導されることを見出した。さらに、その作用機序として、OSM は肝星細胞に対しては Timp1 を誘導することで MMPs による線維の溶解を阻害する一方で、肝マクロファージに対しては線維促進性活性化を促し、肝星細胞のコラーゲン産生を増強することで、相乗的に線維化を誘導していることを明らかにした (図 1)。しかし、OSM が肝マクロファージにどのような変化をもたらし、どのような分子を産生させることで線維化を促進させるのかは不明であった。また、肝マクロファージには常在性のクッパー細胞 (KC) と骨髄から動員されてくる単球・マクロファージ (BMDM) の 2 種類が存在するが、どちらのマクロファージがより線維化に寄与しているのかも不明であった。これらの不明な点を明らかにすることにより、肝線維化における OSM の作用機序が明らかになれば、これまでになかった治療法の開発や新規治療標的の同定につながることを期待された。

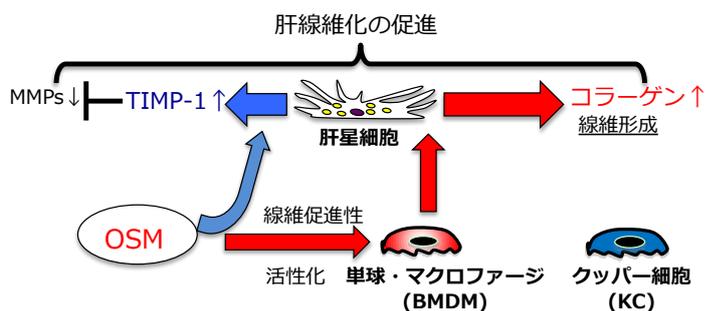


図1 線維の溶解阻害と産生亢進による線維蓄積

2. 研究の目的

本研究では、OSM が線維化を促進する過程で、KC と BMDM のいずれのマクロファージの貢献度が高いのかを明らかにする。さらに、OSM が肝マクロファージにどのような変化をもたらすのかを調べるとともに、OSM 刺激により産生されることが想定される線維化促進因子を探索することを目的とした。そのため、マクロファージを対象として OSM 依存的に誘導される因子を網羅的に解析し、各種アッセイ法により肝線維化への関与を評価することで、新規の線維化関連因子の同定を目指した。

3. 研究の方法

マウス肝線維化モデルとしては、未処置のマウス肝臓に OSM cDNA を Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi) 法により遺伝子導入し、肝内発現させることで肝線維化を誘導する系 (OSM-HTVi モデル) とチオアセタミド (TAA) の飲水投与モデル、四塩化炭素頻回投与モデル、CDAHFD 食餌投与モデル等を用い、以下の実験を行なった。

(1) 肝線維化における KC と BMDM の役割を明らかにするため、野生型または CD169-DTR トランスジェニックマウスを用いて OSM-HTVi モデルにより線維化を誘導した。その際、BMDM の影響については、CCR2 阻害剤を投与して BMDM の肝への集簇を阻害し、KC の影響については CD169-DTR マウスにジフテリアトキシン (DT) を投与して KC を除去し評価した。

(2) OSM 刺激による肝マクロファージのフェノタイプの変化を調べるため、Control-HTVi または OSM-HTVi の肝臓より F4/80 陽性マクロファージを回収し、M1 または M2 マクロファージに特徴的な遺伝子発現を qPCR により解析した。

(3) 肝マクロファージにおいて OSM 依存的に誘導される因子を探索するため、野生型マウスと OSM KO マウスに対して、チオアセタミド (TAA) の飲水投与による慢性肝障害モデルを施した。肝線維化の誘導を行なったのち、肝臓からコラーゲン灌流により細胞を調製し、FACS により CD45+Gr1-細胞を CD11b と F4/80 で展開することで KC と BMDM をそれぞれ回収した。得られた細胞画分を RNA-seq 解析に供することで、野生型および OSM KO マウス由来の KC と BMDM における遺伝子発現の網羅的解析を行ない、OSM KO 由来細胞で発現低下の見られる候補遺伝子を複数ピックアップした。得られた候補分子については、様々な慢性肝障害モデルによる線維肝臓での発現解析や、野生型と OSM KO マウス間での比較による OSM 依存性の確認、HTVi 法およびアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる正常肝臓内での強制発現等により肝線維化との関連性を調べた。線維化の評価はコラーゲン遺伝子や炎症性サイトカイン等の関連遺伝子の発現解析や、シリウスレッド染色および免疫組織化学的手法による線維の可視化により行なった。

4. 研究成果

(1) まず、CD169-DTR トランスジェニックマウスに DT を投与したのち、FACS 解析にて BMDM と KC の画分を見たところ、KC が消失していることが確認できた (図 2 上)。そこで、CD169-DTR マウスに OSM を HTVi して線維化を誘導し、Control または DT を投与して線維化に及ぼす KC の影響を評価した。蛍光免疫染色によりコラーゲン Type1 (緑) および F4/80 (赤) の二重染色を行なった結果、DT 投与群では KC がいないにも関わらず、線維化が進行していることが明らかとなった (図 2 下)。一方、BMDM を CCR2 阻害剤で阻害した場合には、線維化が有意に改善したことから、OSM HTVi モデルにおいては BMDM の肝線維化への寄与度が高く、KC はあまり関与していないことが明らかとなった。

(2) Control-HTVi または OSM-HTVi の肝臓より F4/80 陽性マクロファージを回収し、M1 または M2 マクロファージに特徴的な遺伝子発現を qPCR により解析した。その結果、OSM-HTVi で線維化が進行している肝臓のマクロファージは主に M2 マーカーの発現が高く、M2 のサブセットになっている可能性が示された (図 3)。これは脂肪組織のマクロファージに対する OSM の作用とも一致するものであり、いずれの組織においても OSM はマクロファージの M2 活性化を誘導するが、肝臓においては同時に線維化も誘導していること示された。

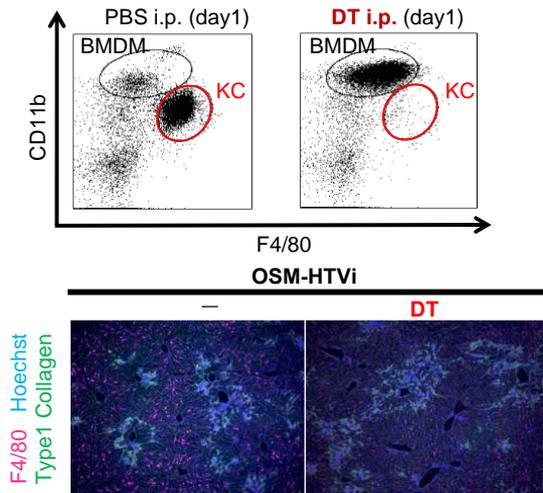


図2 CD169-DTRマウスのDT投与後のKCの除去 (上) と線維化への影響 (下)

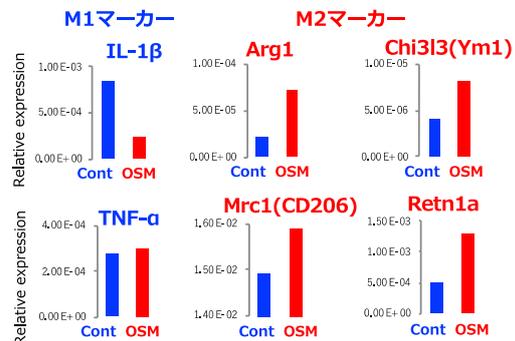


図3 Control-HTViまたはOSM-HTViの肝臓より回収したF4/80陽性マクロファージの遺伝子プロファイル

(3) 野生型マウスと OSM KO マウスに対して、チオアセタミド (TAA) の飲水投与による慢性肝障害モデルを施したのち、コラーゲン灌流により KC と BMDM をそれぞれ回収し RNA-seq 解析に供した。OSM KO 由来細胞で発現低下の見られた遺伝子のうち、分泌または膜タンパク質に候補を絞り 10 個の遺伝子をピックアップした。さらに、様々な慢性肝障害モデルによる線維肝での発現解析により 3 種類に絞り込んだ (図 4)。そのうちの 1 つは TNF スーパーファミリーに属する TNFSF9 であり、残りの 2 つは Serine protease inhibitor (以下、SPI-X, Y と呼ぶ) であった。まず、HTVi 法によりマウス正常肝臓でこれら 3 因子をそれぞれ発現させた結果、いずれの場合もコラーゲン Type 1 および Type 3 の肝臓での発現が上昇し (図 5)、シリウスレッド染色により肝線維化の亢進が認められた。

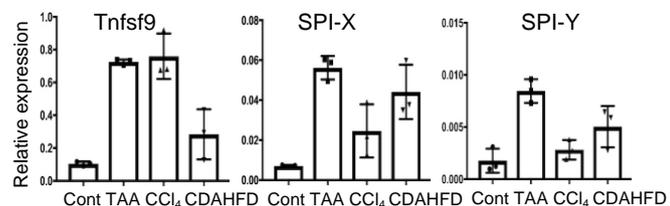


図4 qPCRによる正常肝および線維肝における候補遺伝子の発現解析
Cont: 正常肝、TAA: チオアセタミド8週間、CCl₄: 四塩化炭素4週間、CDHF: コリン欠乏アミノ酸調整高脂肪食8週間

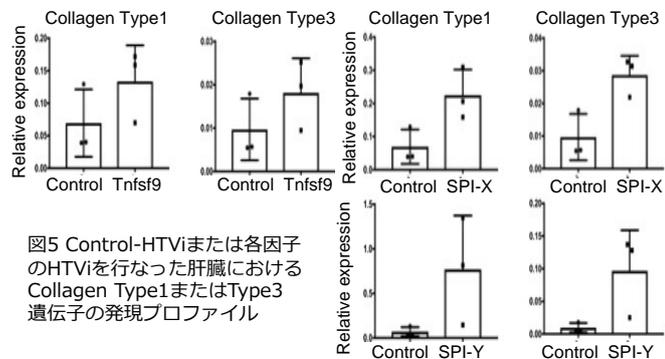


図5 Control-HTViまたは各因子のHTViを行なった肝臓におけるCollagen Type1またはType3 遺伝子の発現プロファイル

そこで、さらに SPI-X に対象を絞り解析を進めた。SPI-X は OSM-HTVi 肝で発現誘導されることや (図 6 左)、TAA 投与による慢性肝障害を施した野生型と OSM KO マウスから回収した KC と BMDM の発現比較から OSM 依存的な発現様式が確認された (図 6 右)。また、HTVi 法では導入遺伝子の発現が中心静脈域に限られるため、AAV8 ベクターによる肝臓全体での発現を行なった結果、肝線維化の誘導 (図 7 左) とともに、TGFβ や CTGF といった線維化関連遺伝子の発

現誘導が認められた (図7右)。以上の結果から、SPI-XはOSM依存的に誘導される新規線維化促進因子であることが明らかとなった。

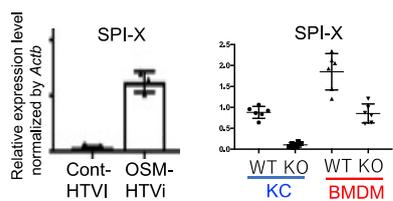


図6 線維肝におけるSPI-Xの発現解析
Control-HTVi またはOSM-HTVi 線維肝でのSPI-X発現 (左) TAA慢性肝障害を施した野生型またはOSM KOマウスのKCとBMDMにおけるSPI-X発現 (右)

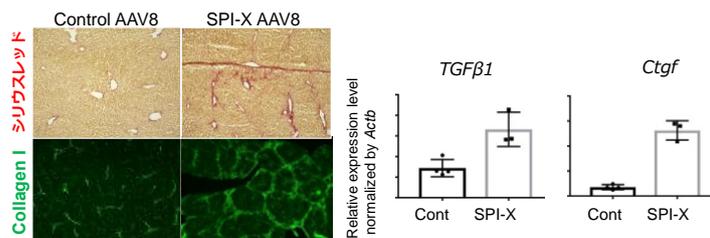


図7 AAV8ベクターによるSPI-Xの肝内発現による肝線維化の誘導。シリウスレッド染色及び蛍光免疫染色による線維の可視化 (左) と線維化関連遺伝子の発現解析 (右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, Nakasone M, Sakamoto T, Matsuoka M, Imai H, Kok YC, Okochi H, Nakano H, Miyajima A, Tanaka M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Hepatic ferroptosis play an important role sa the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-019-1678-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rizki-Safitri A, Shinohara M, Tanaka M, Sakai Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Tubular bile duct structure mimicking bile duct morphogenesis for prospective in vitro liver metabolite recovery.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Eng.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/213036-020-0230-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miura Y, Matsui S, Miyata N, Harada K, Kikkawa Y, Ohmuraya M, Araki K, Tsurusaki S, Okochi H, Goda N, Miyajima A, Tanaka M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Differential expression of Lutheran/BCAM regulates biliary tissue remodeling in ductular reaction during liver regeneration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Elife	6. 最初と最後の頁 36572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.36572.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsui S, Harada K, Miyata N, Okochi H, Miyajima A, Tanaka M.	4. 巻 188
2. 論文標題 Characterization of Peribiliary Gland-Constituting Cells Based on Differential Expression of Trophoblast Cell Surface Protein 2 in Biliary Tract.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol.	6. 最初と最後の頁 2059-2073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2018.05.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rizki-Safitri A, Shinohara M, Miura Y, Danoy M, Tanaka M, Miyajima A, Sakai Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Efficient functional cyst formation of biliary epithelial cells using microwells for potential bile duct organisation in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29464-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 田中稔
2. 発表標題 Hepatic Ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis.
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中稔
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎における計画的細胞死フェロトーシスの関与
3. 学会等名 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minoru Tanaka
2. 発表標題 Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Liver Biology, Disease & Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Tsurusaki, Hiroyasu Nakano, Hitotaka Imai, Atsushi Miyajima, Minoru Tanaka
2. 発表標題 Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Liver Biology, Disease & Cancer (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴崎慎也, 土屋勇一, 今井浩孝, 大河内仁志, 中野裕康, 田中稔
2. 発表標題 フェロトーシスによる肝細胞死が非アルコール性脂肪性肝炎の初期炎症の起点として重要である
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴崎慎也, 土屋勇一, Cindy Yuet-Yin Kok, 大河内仁志, 中野裕康, 宮島篤, 田中稔
2. 発表標題 フェロトーシスによる肝細胞死が非アルコール性脂肪性肝炎の初期炎症の起点として重要である
3. 学会等名 第28回 日本Cell Death学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中稔
2. 発表標題 慢性肝疾患における肝リモデリングの制御機構の解明
3. 学会等名 日本Cell Death学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中稔
2. 発表標題 Cell Death and Regeneration in Liver Diseases
3. 学会等名 Australia-Japan meeting on cell death (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴崎慎也、松田道隆、清水重臣、中野裕廉、宮島敦、田中稔
2. 発表標題 Elucidation of the type of cell death at the onset of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)
3. 学会等名 ComBio2018, Australia (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴崎慎也、松田道隆、清水重臣、中野裕康、宮島篤、田中稔
2. 発表標題 Elucidation of the type of cell death at the onset of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)
3. 学会等名 Australia-Japan meeting on cell death (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴崎慎也、松田道隆、清水重臣、中野裕康、宮島篤、田中稔
2. 発表標題 Elucidation of the type of cell death at the onset of non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 AASLD 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田道隆、田中稔
2. 発表標題 Oncostatin M regulates the role of macrophage during progression and resolution of hepatic fibrosis
3. 学会等名 EASL The International Liver Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田道隆、田中稔
2. 発表標題 慢性肝炎原因除去後の線維肝における、オンコスタチンMによる向/抗線維性マクロファージ切り替え機構の解析
3. 学会等名 JDDW 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田道隆、田中稔
2. 発表標題 Kupffer cell with different origin underlies pathogen clearance dysfunction of chronically injured liver
3. 学会等名 AASLD 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田道隆、鶴崎慎也、宮島篤、田中 稔
2. 発表標題 OncostatinM causes liver fibrosis by regulating cooperation between Hepatic stellate cells and macrophages
3. 学会等名 Australia-Japan Meeting on Cell Death (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村拓也、真家進吾、太田訓正、宮島篤、田中稔
2. 発表標題 肝幹/前駆細胞の新規制御因子Tsukushiの機能解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村拓也、真家進吾、太田訓正、宮島篤、田中稔
2. 発表標題 慢性肝疾患における肝リモデリングを制御する因子Tsukushiの機能解析
3. 学会等名 第29回日本肝臓医生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴崎慎也、松田道隆、清水重臣、中野裕康、宮島篤、田中稔
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成における多様な細胞死とその意義
3. 学会等名 第30回 日本肝臓医生物研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井 理司, 原田 憲一, 宮田 奈保子, 大河内 仁志, 宮島 篤, 田中 稔
2. 発表標題 胆管周囲付属線の単離法の確立とその生理的役割の解明
3. 学会等名 第25回 肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中稔
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanisms underlying the tissue repair and remodeling in liver diseases
3. 学会等名 IARI Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui S, Harada K, Miyata N, Okochi H, Miyajima A and Tanaka M
2. 発表標題 Characterization of peribiliary gland-constituting cells based on localization of Trop2 in biliary tract.
3. 学会等名 FASEB SRC, Fundamental Biology and Pathophysiology of the Liver (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞組織再生医学研究部 肝臓の研究 https://ncgm-regenerative-medicine.org/research/r4.html https://ncgm-regenerative-medicine.org/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------