

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19676

研究課題名（和文）NASHの線維化進展におけるマクロファージの役割の解明と栄養因子による機能制御

研究課題名（英文）The role of macrophages in the progression of fibrosis of NASH and its regulation by nutritional factors

研究代表者

清水 真祐子（SHIMIZU, Mayuko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師

研究者番号：20759021

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではマクロファージの制御が非アルコール性脂肪肝炎における線維化への進展を抑制すると仮説をたてた。新規NASH線維化モデル動物（iHFC-A/Jマウス）では病態進行に伴い肝臓へのマクロファージ動員が増加し、脂質の貪食と活性化後、周囲に集まった線維芽細胞と相互作用して線維が進展することを組織学的に可視化した。本モデルを用いるとベルベリンがマクロファージ集簇を抑制し、線維化病態の発症を抑制することが分かった。ベルベリンに肝臓内脂質の排出を促進する作用がないことを実証したため、ベルベリンが直接的にマクロファージを制御している可能性が示唆され、線維化におけるマクロファージ制御の有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステージ2以上の高度な線維化には肝線維化特効薬による処置がまず必要ではあるものの、生活習慣に端を発するNASHのような疾患は原因を取り除かない限り同様の病態が再発する可能性は高い。本研究はマクロファージ不活化を介した治療法の開発でなく、マクロファージを活性化する特定の脂質を明らかにし、NASH線維化の予防あるいは再発防止につなげ、最終的に肝線維化の根治を目指すためのエビデンスになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study hypothesized that macrophage control inhibits the progression to fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. In a novel animal model of NASH fibrosis (iHFC-A/J mice), macrophage recruitment to the liver was increased with disease progression. After phagocytosed lipids, aggregated and activated, macrophages interacted with the surrounding fibroblasts, resulting in fibrosis progression, which was visualized histologically in the mouse model. Using this model, it was possible to evaluate that berberine suppresses macrophage aggregation and fibrogenesis. Because I demonstrated that berberine did not promote hepatic lipid efflux, it was suggested that berberine may directly regulate macrophages. This study indicated the usefulness of macrophage regulation in suppressing the onset of fibrosis in NASH.

研究分野：栄養学、病理学

キーワード：NASH 線維化 可視化 リン脂質 病態特異的マクロファージ ベルベリン コレステロール コール酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は肝臓における慢性的な炎症により肝線維化を発症し、肝硬変や肝癌など致死の病態に至る予後不良な疾患である。高度な線維化に進行するほど不可逆性が増すことから肝線維化治療が不可欠であり、線維化促進因子を分泌するマクロファージは治療標的となると考えられる。その一方で、生活習慣病である NASH の根本的な原因、すなわち栄養因子などを是正しない限り、治療薬で線維化進行を抑えられたとしても再発するリスクはあり、根治とはいえない。これらを踏まえると、マクロファージが活性化して肝炎から線維化に至る機構を栄養因子の観点から解明し、栄養因子によってマクロファージを制御する方法の確立は、生活習慣病 NASH の悪化予防 (肝線維化の発症抑制) を目指すには理に適った方法と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では肝炎から線維化に至るまでのマクロファージ活性化に關与する“病的脂質”を明らかにする。また、マクロファージの制御が肝線維化の進展を抑制することが可能か検証する。

3. 研究の方法

(1) NASH 線維化モデルマウスの作成と肝組織学的解析

これまでに NASH モデル動物は多く報告されているが、高度な線維化を誘導するには肝毒性薬物の投与や 6 か月ほどの長期飼育など方法が限られていた。よって、ヒトの病因と同じく食事によって可能な限り短期間で NASH 線維化を誘導できるモデルを独自に作成することとした。

高脂肪・コレステロール・コール酸含有飼料の作成

ヒトが日常で摂取あるいは体内で生成される成分で飼料組成を考案し、パーム油を含む高脂肪食にコレステロールとコール酸を添加した iHFC diet を作成した。特定の栄養素欠乏や薬剤の投与等の介入を行わないことを重要視した。

Tsumura-Suzuki non-obese (TSNO) 系統を用いたモデル動物の作成

Tsumura-Suzuki obese diabetes (TSOD) 系統はメタボリックシンドロームモデルマウスとして利用されているのに対し、TSNO 系統はそのコントロールモデルとして作出されたいわば健全な個体である。6 週齢雄性 TSNO マウスに対して iHFC diet を投与し、20 および 32 週齢で sacrifice し、病理組織学的解析を実施した。

A/J 系統を用いたモデル動物の作成

最も高頻度に使用される C57BL6/J 系統は高脂肪食負荷で肥満を呈するが、A/J 系統は肥満に抵抗性を持つマウスとして知られる。9 週齢雄性 A/J マウスに対して iHFC diet (コレステロール量を Low 群と High 群に設定) を投与し、18 週齢で sacrifice し、病理組織学的解析を実施した。

(2) 肝臓脂質の網羅的イメージング質量分析

採取した肝臓を 4% CMC に包埋し厚さ 5 μm の凍結切片を作成後、CHCA - アセトニトリル/トリフルオロ酢酸を含むイオン化支援剤をスプレーヤーで塗布し、MALDI-TOF-MS を用いてイオン化とイメージングを実施し、脂質の網羅的解析を実施した。

(3) 肝線維化に対するオウバクおよびその成分の投与の効果の検討

iHFC-A/J モデルに対し、オウバク 5% およびベルベリン 0.06% を同時投与し、9 週間飼育した後、sacrifice して病理組織学的および生化学的解析を実施した。

4. 研究成果

(1) NASH 線維化モデル動物の評価

TSNO マウスに iHFC diet を投与すると、肝臓において脂肪変性、小葉内炎症およびバルーニング変性などの NASH の特徴的な所見がみられた (図 1)。また、20 週齢時にはステージ 2 - 3 の線維化がみられた。iHFC-TSNO モデルの肝組織ではヒトの NASH でみられる繊細な細胞周囲性線維の進展があり、ヒトの線維化パターンと近似していた。その後、ステージ 3 (bridging fibrosis) への移行がみられることから、iHFC-TSNO モデルは比較的短期間で高度な線維化を伴う NASH モデル動物として有用であると考えられた。また、遺伝子組換え動物や肝毒性物質を用いない点でヒトへの外挿性が高いと考えられる (文献 1)。

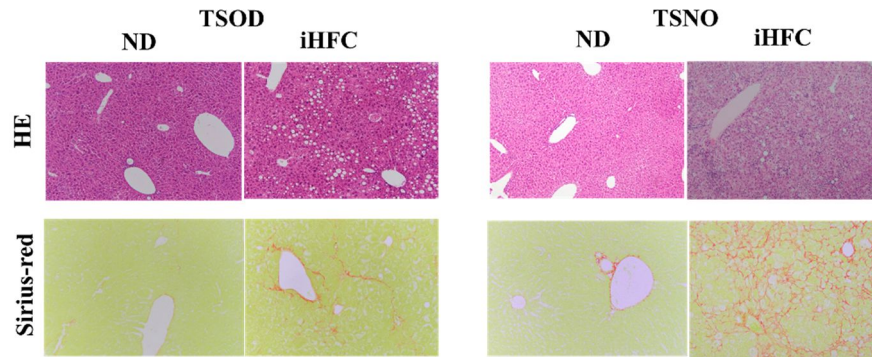


図1 iHFC diet を20週間負荷したTSODおよびTSNOマウスの肝組織学的所見
ND, normal diet; iHFC, 新たに開発した高脂肪・コレステロール・コール酸飼料

iHFC diet を種々のマウス系統に投与すると、系統ごとに肝臓における病理組織学的所見あるいは生化学的パラメータが少しずつ異なるNASHを発症することを明らかにした。特にA/Jマウスでは体重増加を伴わずに肝臓でNASH様病変を発症するという興味深い所見が示された(図2)。NASHはメタボリックシンドロームの肝病変と捉えられているが、アジア系民族では3分の1が肥満を伴わないと報告されており、iHFC-A/Jモデルは非肥満NASHの解析に有用なモデルとして位置付けられるだろう。また、iHFC-A/Jモデルでは肝組織学的にマクロファージの集簇が顕著で、かつ、集簇したマクロファージの辺縁部に活性化星細胞(線維芽細胞)を認め、集簇マクロファージの周囲を囲うように線維の進展がみられた(図3)。これはマクロファージと線維芽細胞がinteractionし、線維化に関与することを示唆するとともに、肝線維化の“始発点”を捉えた組織像であると考えられる。このような肝組織学的所見はヒトではほとんどみられず、iHFC-A/Jモデル特有のものと考えられる。線維化の発症過程には肝星細胞、マクロファージなど様々な細胞の関与が考えられてきたが、細胞同士のinteractionを組織学的に可視化できるモデル動物は新規性が高く、NASH線維化の発症機序の解明に役立つと期待される(文献2)。

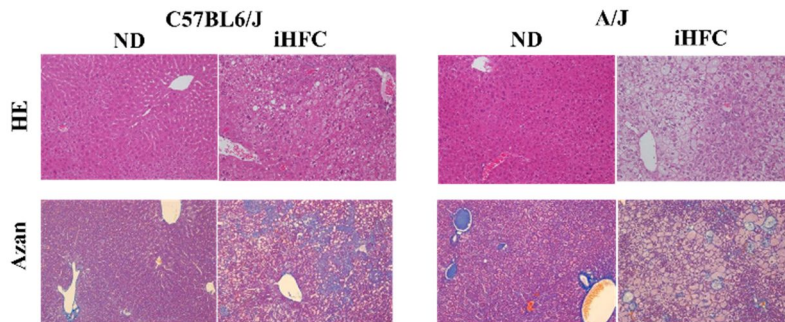


図2. iHFC diet を9週間負荷したC57BL6/JおよびA/Jマウスの肝組織学的所見
ND, normal diet; iHFC, 新たに開発した高脂肪・コレステロール・コール酸飼料

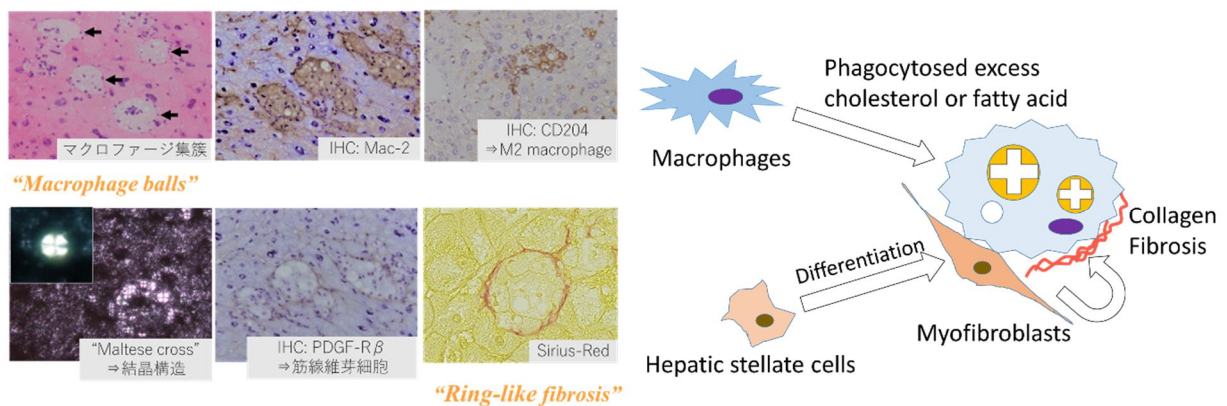


図3. iHFC-A/Jモデルの肝臓におけるマクロファージ集簇と線維化像(左)および組織像から考えられるマクロファージと線維芽細胞のinteractionによるNASH線維化発症機序仮説(右)

(2) 線維化関連マクロファージの活性化に關与する病的脂質の特定

線維化を發症した iHFC-A/J モデルでは、コレステロール摂取量依存的に線維化が増悪していたことから(図 4)、先行研究と一致してコレステロールは線維化促進因子であると考えられる。また、集簇したマクロファージの内部には “Maltese cross” として觀察される巨大な結晶構造がみられた(図 3)。つまり、マクロファージが余剰のコレステロールを貪食・活性化し、線維芽細胞と interaction を始めるという病態形成機序が推測された。

組織学的に線維化の始発点が可視化できる iHFC-A/J モデルを用いると、線維化関連マクロファージ内に蓄積する脂質を特定することが可能である。イメージング質量分析によって、肝臓の脂質を網羅的に解析したところ、島状に m/z 772.5 の物質の蓄積がみられ、その局在は連続切片の HE 染色標本でみられた炎症巣、特に集簇したマクロファージと一致していた。その一方で正常肝ではその分布は肝臓全体に広がっていた(図 5)。MSMS 解析により m/z 772.5 分子は head group はコリンもしくはエタノールアミンで、PC (P-18:1(11Z)/18:0) あるいは PE(18:0/20:2(11Z, 14Z)) であると推定された。因果関係は明らかではないものの、特定のリン脂質がマクロファージ蓄積することは線維化發症に關与する可能性が考えられた。特定のリン脂質と線維化の關連の糸口を掴んだ本結果は線維化の “ 始発点 ” を可視化できるモデル動物ならではの成果と言える。

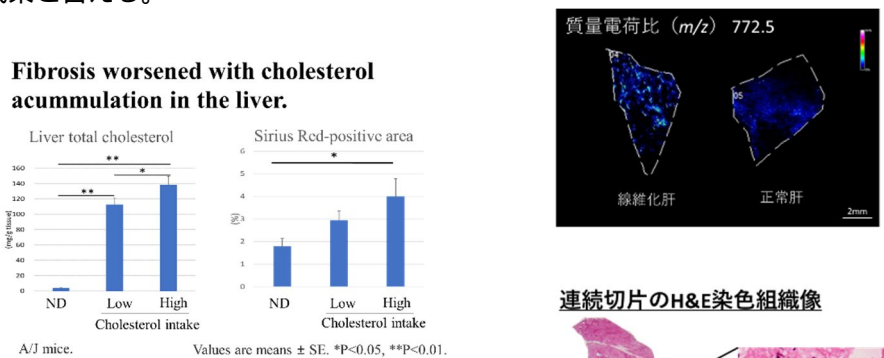


図 4. iHFC-A/J モデルにおける肝臓中コレステロール量と線維化の程度

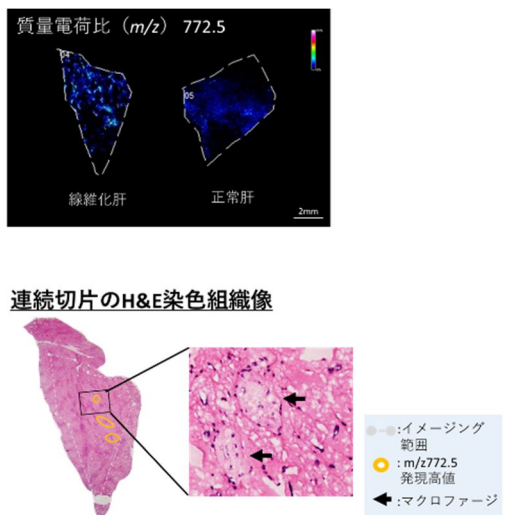


図 5. iHFC-A/J モデルの肝臓における m/z 772.5 の局在と連続切片のマクロラージ集簇像

(3) ベルベリンによるマクロファージ制御と肝線維化發症抑制

iHFC-A/J モデルは 9 週間でステージ 2 の肝線維化を發症するが、オウバクおよびベルベリンを予防的に投与したところ、いずれの投与群でも線維化の有意な發症抑制がみられた。オウバクに含まれるリモニンにはそのような作用は認められなかったため(データ未発表)、ベルベリンが主要な線維化抑制成分であると考え、詳細な解析を実施した。

NASH 線維化を誘導した群(線維化ステージ 2)と比べて、ベルベリン投与群では線維化ステージ 1 未満であった(図 6)。この病態抑制作用は NASH における脂肪変性や炎症所見を低減することなく、線維化病態のみに現れ、また、マクロファージの集簇の抑制を伴っていたことから、ベルベリンはマクロファージ制御によって線維化進展を抑制していると考えられた。その詳細な機序をとして、Wnt/ カテニン経路の阻害を考慮したが、組織学的に カテニンの蓄積や核内移行に顕著な差はみられなかった。また、線維芽細胞のアポトーシスもみられなかった。その一方で、マクロファージが分泌するサイトカインである TGF- β は mRNA レベルで低下しているものの線維化病態群とベルベリン処置群間で有意な差はみられなかった(図 7)。マクロファージの貪食対象となるコレステロールをベルベリンが肝外に排出させた可能性を考えたが、肝臓コレステロール量は線維化群とベルベリン群間で有意な差はなかった。以上より、ベルベリンはマクロファージを制御する魅力的な物質であるが肝線維化發症阻害については今後さらなる機序解析が必要である。

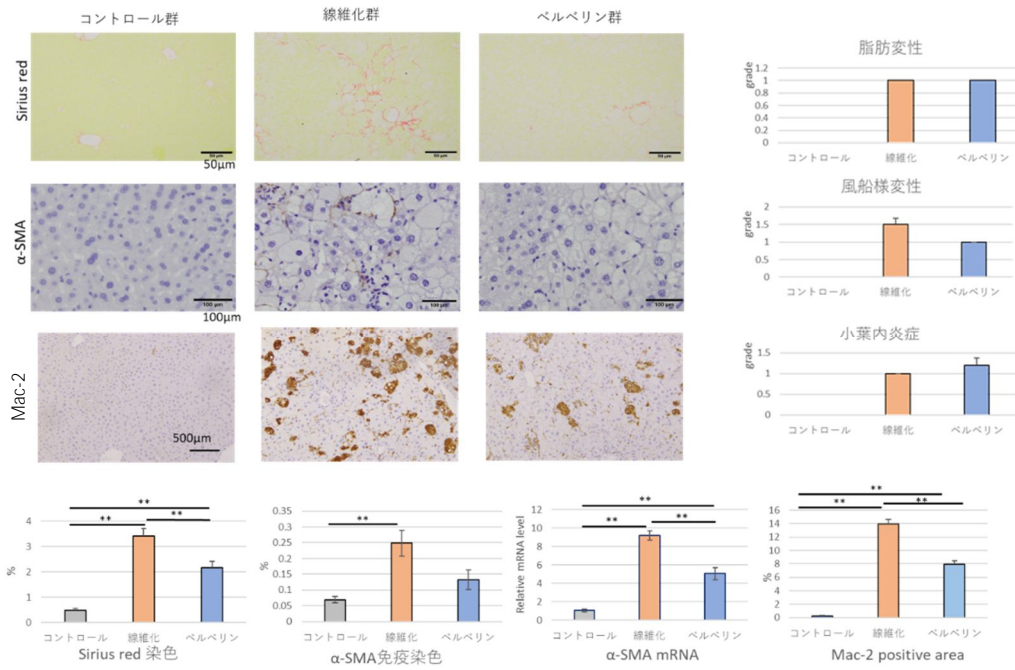


図6 ベルベリンを予防的に投与した iHFC-A/J モデルマウスの肝組織学的評価

Mean ± SE. *P<0.05, **P<0.01

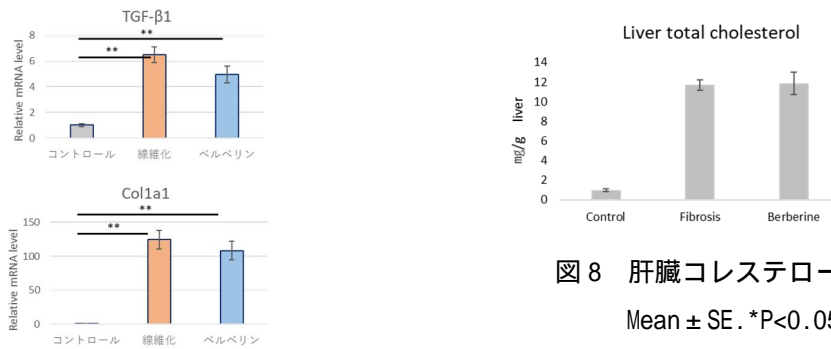


図7 肝臓 mRNA 量

Mean ± SE. *P<0.05, **P<0.01

参考文献

1. Ichimura-Shimizu M, Omagari M, Yamashita M, Tsuneyama K. Development of a novel mouse model of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis-related progressive bridging fibrosis. *Biosci Biotechnol Biochem* 85: 941-947, 2021
2. Ichimura-Shimizu M, Tsuchiyama Y, Morimoto Y, Matsumoto M, Kobayashi T, Sumida S, Kakimoto T, Oya T, Ogawa H, Yamashita M, Matsuda S, Omagari K, Taira S, Tsuneyama K. A novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis suggests that liver fibrosis initiates around lipid-laden macrophages. *Am J Pathol* 192:31-42, 2022.

図8 肝臓コレステロール量

Mean ± SE. *P<0.05, **P<0.01

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ichimura-Shimizu M, Watanabe S, Kashirajima Y, Nagatomo A, Wada H, Tsuneyama K, Omagari K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Dietary cholic acid exacerbates liver fibrosis in NASH model of Sprague-Dawley rats fed a high-fat and high-cholesterol diet.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23169268	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 Shao W, Jargalsaikhan O, Ichimura-Shimizu M, Cai Q, Ogawa H, Miyakami Y, Atsumi K, Tomita M, Sutoh M, Toyohara S, Hokao R, Kudo Y, Oya T, Tsuneyama K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Spontaneous occurrence of various types of hepatocellular adenoma in the livers of metabolic syndrome-associated steatohepatitis model TSOD mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231911923	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 Yamada S, Morine Y, Ikemoto T, Saito Y, Miyazaki K, Shimizu M, Tsuneyama K, Shimada M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Inhibitory effect of non-alcoholic steatohepatitis on colon cancer liver metastasis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 410-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejso.2022.11.002.	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 Omagari K, Uchida M, Tagawa Y, Yogo M, Inagaki K, Hongo R, Takeuchi S, Suruga K, Koba K, Ichimura-Shimizu M, Tsuneyama K.	4. 巻 68
2. 論文標題 Influence of fasting time on serum and hepatic lipid profiles in a Sprague-Dawley rat model of nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 409-419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3177/jnsv.68.409	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 Kasai K, Igarashi N, Tada Y, Kani K, Takano S, Yanagibashi T, Usui-Kawanishi F, Fujisaka S, Watanabe S, Ichimura-Shimizu M, Takatsu K, Tobe K, Tsuneyama K, Furusawa Y, Nagai Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Impact of Vancomycin Treatment and Gut Microbiota on Bile Acid Metabolism and the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24044050	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 Mayuko Ichimura-Shimizu, Yosuke Tsuchiyama, Yuki Morimoto, Minoru Matsumoto, Tomoko Kobayashi, Satoshi Sumida, Takumi Kakimoto, Takeshi Oya, Hirohisa Ogawa, Michiko Yamashita, Satoru Matsuda, Katsuhisa Omagari, Shu Taira, Koichi Tsuneyama	4. 巻 192
2. 論文標題 A novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis suggests that liver fibrosis initiates around lipid-laden macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 31-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2021.10.002	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 Mayuko Ichimura-Shimizu, Takeshi Kageyama, Takeshi Oya, Hirohisa Ogawa, Minoru Matsumoto, Satoshi Sumida, Takumi Kakimoto, Yuko Miyakami, Ryosuke Nagatomo, Koichi Inoue, Chunmei Cheng and Koichi Tsuneyama	4. 巻 22
2. 論文標題 Verification of the Impact of Blood Glucose Level on Liver Carcinogenesis and the Efficacy of a Dietary Intervention in a Spontaneous Metabolic Syndrome Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222312844,	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 清水 真祐子	4. 巻 5
2. 論文標題 非アルコール性脂肪肝炎および脳機能障害における脂質の挙動	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 521-525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ichimura-Shimizu Mayuko, Omagari Katsuhisa, Yamashita Michiko, Tsuneyama Koichi	4. 巻 85
2. 論文標題 Development of a novel mouse model of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis-related progressive bridging fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 941 ~ 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa107	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中原穂乃佳, 渡部あすか, 清水真祐子, 小川博久, 常山幸一
2. 発表標題 NASHモデルマウスにおけるベルベリンによる肝線維化抑制効果の検討
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水真祐子, 常山幸一
2. 発表標題 リソソーム酸性リパーゼ欠損症および高脂肪・コレステロール・コール酸食誘導NASHモデルマウスの病理所見の近似性
3. 学会等名 第58回肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takumi Kakimoto, Mayuko Shimizu, Hirohisa Ogawa, Minoru Matsumoto, Takeshi Oya, Masato Hosokawa, Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 Accumulation of α -synuclein in hepatocytes in NASH liver and usefulness in pathological diagnosis
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安丸 和樹, 長谷 栄治, 清水 真祐子, 安井 武史, 常山 幸一, 南川 丈夫
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの肝臓に蓄積した脂肪滴の相転移
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安丸 和樹, 南川 丈夫, 長谷 栄治, 清水 真祐子, 安井 武史, 常山 幸一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患モデルマウスの肝臓に蓄積した脂肪滴のラマン・SHGイメージング
3. 学会等名 Optics and Photonics Japan 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 真祐子, 平 修, 小川 博久, 常山 幸一
2. 発表標題 非アルコール性脂肪肝炎病態のリン脂質イメージング: 病態形成における脳肝相関の可能性探索
3. 学会等名 第69回質量分析総合討論会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 真祐子, 富永 俊弼, 筒井 朱美
2. 発表標題 NASH線維化の連続的数値による定量的評価のための新規画像解析法の開発
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水真祐子、平修、松本穰、尾矢剛志、小川博久、常山幸一
2. 発表標題 イメージング質量分析によるNASH線維化肝で増加する脂質の同定
3. 学会等名 日本病理学会第109回総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水真祐子、大曲勝久、常山幸一
2. 発表標題 実験的モデル動物作成に用いられる高脂肪・コレステロール食に含まれるコール酸のNASH病態形成への影響
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mayuko Shimizu, Shunsuke Tominaga, Koichi Tsuneyama
2. 発表標題 A novel image analysis technology that can verify quantification and progress pattern of NASH fibrosis
3. 学会等名 Liver meeting (AASLD) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------