

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0110

研究課題名(和文) 脳・全身連関による組織線維化の制御機構の解明と医学応用

研究課題名(英文) Role of the crosstalk between liver and brain in the pathophysiology of liver fibrosis

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) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：組織線維化は、生活習慣病を含む多くの慢性炎症性疾患の終末像であり、アンメット・メディカル・ニーズが極めて高い。本研究では、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)における肝線維化が臓器局所と中枢との臓器連関で制御される分子メカニズムを検討した。動物モデルとして、研究代表者が独自に確立した遺伝性肥満MC4R欠損マウスを用いた。これは、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。本研究では、線維化の駆動エンジンとして働く微小環境(CLS)を構成するマクロファージの由来や特徴を明らかにするとともに、中枢MC4Rシグナルによる肝臓マクロファージの制御機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝線維化のメカニズムとして、肝細胞死に引き続くマクロファージや線維芽細胞の活性化が指摘されているが、本研究において、慢性炎症や線維化の起点となる微小環境が初めて明らかになった。また、同様の微小環境が脂肪組織や腎臓などにおいても観察され、その共通性や臓器特異性を明らかにすることで、慢性炎症性疾患に対する理解が深まると期待される。最近、MC4R作動薬など中枢神経系を標的とする抗肥満薬の開発が進んでいる。中枢性の炎症制御機構の解明は、新たな抗肥満薬の臨床応用に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various chronic inflammatory diseases including lifestyle-related diseases eventually result in tissue fibrosis, which has major unmet medical needs. 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 found that tissue-resident macrophages in the liver or Kupffer cells aggregate around dead or dying hepatocytes to form a unique histological structure termed crown-like structure, thereby accelerating liver fibrosis. Interestingly, these Kupffer cells showed a phenotypic change to obtain the profibrotic property. We also found that MC4R in the hypothalamus is capable of regulating chemotactic activity of macrophages in the liver, particularly in the resolution phase.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：NASH マクロファージ 慢性炎症 線維化 MC4R

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

組織線維化は細胞外マトリックスが過剰に蓄積した状態と定義され、本来、組織傷害に対する生理的な修復機転であるが、進行性の場合には臓器の機能不全を招来する。組織線維化は、生活習慣病を含む多くの慢性炎症性疾患の終末像であり、未だ有効な治療法がないため、アンメット・メディカル・ニーズが極めて高く、発症機構に立脚した革新的な抗線維化療法の開発が喫緊の課題である。しかしながら、組織線維化の経時変化は複雑であり、臓器あるいは病態により大きく異なるため、詳細な分子機構には不明の点が多い。

非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられ、肝硬変から肝細胞癌に進行するため治療介入が必要である。現在、NASHの特異的バイオマーカーが存在せず、確定診断に侵襲的な肝生検が必須であること、どの症例が将来NASHに進行するかを全く予測できないことが臨床的な課題となっている。この理由の1つに、ヒトNASHの特徴を有する動物モデルが存在しないことが挙げられる。研究代表者は既に、中枢性の摂食調節に重要なメラノコルチン4型受容体（MC4R）を欠損するマウスに高脂肪食を負荷することにより、肥満やインスリン抵抗性を背景として、脂肪肝、肝線維化、肝細胞癌を経時的に、ほぼ100%の確率で発症するユニークな疾患モデルを確立した（*Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011）。さらに、本NASHモデルマウスやNASH患者の肝臓において、細胞死に陥った肝実質細胞をマクロファージが取り囲んで貪食・処理する特徴的な組織像（肝臓 CLS: hepatic crown-like structure）を見出し、これを起点として慢性炎症から組織線維化が誘導されることを明らかにした（*PLoS ONE* 8: e82163, 2013）。実際、肝臓 CLS は NASH の発症に先行して形成されるが、慢性ウイルス性肝炎患者では全く認めない。このように、肝臓 CLS は実質細胞と間質細胞の相互作用の場であり、組織線維化の駆動エンジンとして働くとともに、NASH の早期発見・発症前診断に有用な病理組織マーカーと言える。

代表的なアディポサイトカインであるレプチンは、体脂肪量に比例して脂肪組織より産生され、主に視床下部のレプチン受容体-MC4R 経路を介して摂食抑制やエネルギー消費の亢進に働く。即ち、レプチンは、全身の栄養状態を脳に伝達し、エネルギー代謝の恒常性を維持する「栄養センサー」と捉えることができる。MC4R の発現は視床下部を中心に脳にほぼ限局するため、研究代表者が開発した NASH モデルマウスでは、脳を起点とするシグナルにより肝病変を発症する可能性が高く（*Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011）、複雑な臓器間ネットワークを解析する格好の疾患モデルと言える。実際、研究代表者は、脳のレプチン-MC4R シグナルが、全身のエネルギー代謝調節に加えて、単球やリンパ球の分化や活性化を制御することを明らかにした（*J. Neurosci.* 31: 8373-8380, 2011, *Endocr. J.* 57: 61-72, 2010）。例えば、過栄養は脳内に慢性炎症を惹起し、レプチン-MC4R シグナルを障害（レプチン抵抗性）する可能性が報告されているが（*Cell* 135: 61-73, 2008）、全身の炎症免疫系に及ぼす影響は全く分かっていない。さらに、高脂肪食負荷時においてのみ MC4R 欠損マウスは単純性脂肪肝から NASH を発症するため、脳・肝臓・脂肪組織から構成される複雑系により肝線維化が制御されると想定され、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、「脳と全身のクロストーク」に着目し、全身の栄養代謝状態が脳を、逆に、脳機能の変容が全身を制御するという新たな視点より、臓器局所の細胞間相互作用の恒常性維持と病的破綻のメカニズムの解明に取り組む。具体的には、肝臓 CLS を起点とする微小環境の実態や細胞間相互作用の解明、中枢 MC4R シグナルによる末梢の炎症制御機構の解明に取り組み、新たな NASH 発症機構に立脚した先制医療の実現と画期的な抗線維化療法の開発に貢献することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 4. 研究成果

(1) 肝臓 CLS を起点とする微小環境の実態に関する検討；

本研究では、肝臓 CLS を構成するマクロファージの由来を検討した。即ち、2 型 CC ケモカイン受容体 (CCR2) 欠損マウスの骨髄を MC4R 欠損マウスに移植して NASH を発症させたところ、脂肪組織の CLS 形成は顕著に抑制され、アディポサイトカインの発現プロフィールや全身の糖代謝は有意に改善し、脂肪肝も軽減した。これに対して、肝臓の浸潤マクロファージ数は顕著に抑制されたが、CLS 形成には全く変化を認めず、線維化にも影響を及ぼさなかった。これに対して、肝組織マクロファージ (クッパー細胞) を蛍光標識して NASH を発症させたところ、肝臓 CLS は主にクッパー細胞で構成されることが示唆された。実際、肝臓 CLS はクッパー細胞マーカーの CD169 で染色された。さらに、CD169-DTR (diphtheria toxin receptor) マウスを用いて、クッパー細胞を消去したところ、肝臓 CLS の形成と肝線維化の発症が顕著に抑制された。以上より、脂肪組織 CLS と異なり、肝臓 CLS は肝組織マクロファージで構成されることが明らかになった (JCI Insight 2: e92902, 2017)。

一方、肝臓 CLS を構成するマクロファージは CD11c 陽性であり、肝臓内に散在する通常のクッパー細胞 (CD11c 陰性) とは異なる。そこで、新たに確立した誘導性 NASH モデルを用いて検討したところ、CLS 形成後に徐々に CD11c 陽性に変化することを見出した。即ち、死細胞との相互作用により、クッパー細胞の形質転換が生じることが示唆される。そこで、CD11c を手がかりに MC4R 欠損マウスから当該クッパー細胞を単離し、遺伝子発現プロフィールを検討した。NASH 肝において CD11c 陽性クッパー細胞は、CD11c 陰性クッパー細胞とは活性化状態が異なる細胞群であることを確認した。CD11c-DTR マウスを用いることにより、肝臓 CLS を構成する CD11c 陽性クッパー細胞が CLS 形成や肝線維化に必須であることを証明した。さらに臨床研究を実施して、ヒト NASH においても CD11c 陽性クッパー細胞が CLS を構成すること、NASH の病勢や線維化と相関することを見出した。このように、従来より知られている浸潤マクロファージに加えて、クッパー細胞も NASH の病態形成に深く関与することを明らかにした (JCI Insight 2: e92902, 2017)。

#### (2) 中枢 MC4R シグナルによる末梢の炎症制御機構に関する検討 ;

MC4R は視床下部を中心とする中枢神経系に局在し、肝臓には発現が認められないため、MC4R 欠損マウスにおける NASH の発症に中枢性のシグナルが関与することが示唆される。そこで本年度は、野生型マウスに MC4R 阻害剤 (SHU9119) を脳室内投与することにより、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) で肝臓に一過性に誘導される炎症反応に及ぼす影響を検討した。すると、浸潤マクロファージの総数に変化は認められなかったが、SHU 投与により Ly6C(lo)/Ly6C(hi)比が顕著に上昇することを見出した。この時、肝臓における障害組織のクリアランスが低下し、炎症が遷延化した。同様の結果は、MC4R 欠損マウスでも観察された。さらに、慢性炎症の回復過程を検証した。即ち、高脂肪食を負荷した野生型マウスに対して食餌制限により減量治療を施したところ、14 週間後までにはほぼ炎症反応は正常化した。MC4R 欠損マウスでは改善が認められなかった。また、CCl<sub>4</sub> を 8 週間投与による肝線維化からの回復過程を同様に検討したところ、MC4R 欠損マウスでは、回復期に出現する Ly6C(lo)マクロファージが野生型マウスより遅れて出現し、より増加した。以上の結果より、中枢 MC4R シグナルは、末梢の炎症回復過程に影響を及ぼし、特にマクロファージの質の変化に関与することが明らかになった (論文投稿準備中)。

#### 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. R.T. 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）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔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：山中 宏二  
ローマ字氏名：Yamanaka, Koji  
所属研究機関名：名古屋大学  
部局名：環境医学研究所  
職名：教授  
研究者番号（8 桁）：80446533

### (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