

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07475

研究課題名(和文)細胞死に対する生体応答の変容に基づくNASH・肝細胞癌発症機構の解明

研究課題名(英文)Cell death-induced inflammation and the development of NASH and hepatocellular carcinoma

研究代表者

伊藤 美智子 (ITO, Michiko)

名古屋大学・環境医学研究所・特任准教授

研究者番号：00581860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症を基盤とする病態では実質細胞の細胞死と間質細胞の相互作用が遷延化することで組織線維化に至ると考えられるが、その間に介在する分子や細胞の活性化機構は病因に応じて異なることが想定される。本研究では代謝性ストレスによる肝細胞死を起点として発症する非アルコール性脂肪性肝炎(NASH: nonalcoholic steatohepatitis)に着目し、独自に確立したモデルマウスを用いて、マクロファージおよび線維芽細胞の疾患特異的活性化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

NASHは肝硬変・肝細胞癌に進展する重症型であるが、その発症機構には不明な点が多く、確立した治療法も存在しない。NASHの予後の悪さと罹患率の高さを考慮すると、患者のQOL改善および医療経済の観点から病態早期の診断・介入が必要である。本研究では病態形成早期に認められる病理学的構造に焦点を当て、NASH・肝細胞癌への発症進展につながる間質細胞の機能変化を明らかにしており、早期診断法の確立や治療法の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is a common molecular basis of a variety of chronic diseases, including NASH. During the course of tissue remodeling caused by chronic inflammation, sustained interaction between parenchymal cells and stromal cells leads to tissue fibrosis. It is important to understand the heterogeneity and phenotypic changes of interstitial cells on each organ and pathogenic etiology. We have reported a histological structure termed crown-like structure (CLS), in which macrophages and fibroblasts surround dead hepatocytes with large lipid droplets, using our unique mouse model of NASH. In this study, we investigated the disease-specific activation mechanisms of CLS-forming macrophages and fibroblast, driving the progression from simple steatosis to NASH and hepatocellular carcinoma.

研究分野：代謝学

キーワード：慢性炎症 マクロファージ 線維芽細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリックシンドロームをはじめとする様々な疾患の基盤病態に慢性炎症が関わっていることが注目されている。実質細胞に慢性的なストレスが加わると、障害を受けた実質細胞と間質細胞の相互作用が遷延化し、細胞外基質が過剰に蓄積することで組織線維化に至ると考えられる。また、慢性炎症や組織線維化は発癌の原因になることも指摘されている。細胞死には多彩な様式があることや、死細胞が様々な分子を放出して間質細胞の活性や機能に大きな影響を与えること、マクロファージや線維芽細胞などの間質細胞が非常に多様性が高いことなどから、臓器や病因に応じて間質細胞の動態や活性化機構を理解する必要があると考えられる。

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: nonalcoholic steatohepatitis) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と言われ、肝異所性脂肪蓄積および炎症・線維化を特徴とし、高率に肝硬変・肝細胞癌に進展する重症型である。肝線維化の程度が肝細胞癌の発症リスクと最も相関することが指摘されており、その病態解明が強く望まれているが、未だ特異的なバイオマーカーが存在せず、治療法も確立していない。予後良好な単純性脂肪肝と NASH を分ける特徴の一つは肝細胞死の増加であり、慢性炎症の起点になると考えられる。肝細胞は脂肪合成が盛んな細胞であるとともに、血液由来の脂質を取り込んで細胞質の脂肪滴内に蓄積するため、蓄積脂質の量的・質的变化は肝細胞死を誘導するだけでなく、間質細胞による貪食処理過程においても障害となり得ることが想定される。脂肪肝から NASH・肝細胞癌の発症に至る分子機構を解明するためには、代謝性ストレスによる肝細胞死と間質細胞活性化の特徴を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

従来、ヒト NASH の病態を反映する適切な動物モデルが存在しないことが NASH 研究の障壁となってきたが、申請者らは主に中枢神経系に発現し、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R: melanocortin 4 receptor) を欠損するマウスが高脂肪食負荷によって脂肪肝から NASH・肝細胞癌を発症することを独自に明らかにした。MC4R は肝臓には発現がなく、過栄養に伴う全身の代謝障害の結果として発症する NASH・肝細胞癌の解析が可能である。さらに申請者らは、MC4R 欠損マウスの肝臓およびヒト NASH において、肝細胞死を核としてマクロファージや線維芽細胞が集積する病理学的構造 (CLS: crown-like structure) を同定し、NASH 発症の核となることを報告した。CLS を構成するマクロファージは死細胞との相互作用の結果、CD11c 陽性へと形質変化し、特徴的な遺伝子発現プロファイルを有する疾患特異的マクロファージであると考えられる。本研究では独自のマウスモデルを用いて、NASH に特異的なマクロファージおよび線維芽細胞の活性化機構とその病態生理的意義を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝線維化モデルからの線維芽細胞単離と網羅的遺伝子発現解析

MC4R 欠損マウスとコラーゲンプロモーター下で GFP (green fluorescence protein) を発現するマウス (Col1a2-GFP Tg マウス) を交配し、20 週間の高脂肪食負荷 (リサーチダイエツト社、D12079B) によって NASH を誘導した。肥満・発癌を伴わない肝線維化モデルとして、Col1a2-GFP Tg マウスに対する四塩化炭素投与 (1ml/kg、週 2 回腹腔内、8 週間) によって肝線維化を誘導した。NASH あるいは四塩化炭素モデルの肝臓をコラーゲナーゼにて分散し、セルソーターを用いて GFP 陽性細胞を分取した (それぞれ NASH-fib、CCl<sub>4</sub>-fib)。正常肝から密度勾配法にて採取した肝星細胞 (HSC: hepatic stellate cell) を正常コントロールとして、3 群を対象に RNA シークエンス解析を行った (図 1)。

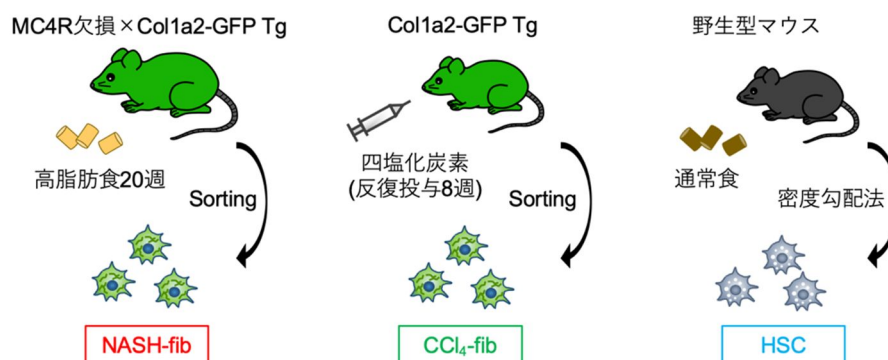


図1. 実験プロトコール

#### (2) 線維芽細胞・肝細胞における FGF9 の作用

密度勾配法によって単離した HSC を用いて、TGFβ (transforming growth factor β) や LPS (lipopolysaccharide)、過栄養に伴って血中で増加するパルミチン酸 (~500μM) など添加し、

FGF9 の発現を誘導する因子を探索した。ヒト HSC 細胞株である LX-2 およびヒト肝癌細胞株である HepG2 を用いてリコンビナント FGF9 (~10ng/ml) の作用を検討した。トランスウェルの下層に 2% FBS (fetal bovine serum) 上層に一定数の LX-2 あるいは HepG2 と FGF9 を加え、24 時間後にメンブレンの下層に遊走した細胞数をカウントした。LX-2 に対しては血清飢餓、HepG2 に対しては抗 Fas 抗体によってアポトーシスを誘導し、カスパーゼ-3/7 活性化アッセイを用いて評価した。レンチウイルスを用いて FGF9 安定発現 LX-2 を作成し、LX2 (1x10<sup>6</sup> 個) と HepG2 (2x10<sup>5</sup> 個) を免疫不全マウスの背部に共移植した。4 週間後に腫瘍径を測定し、組織学的解析を行った。

### (3) NASH 肝の偏光顕微鏡・電子顕微鏡観察

20 週間の高脂肪食負荷を行った MC4R 欠損マウスの肝臓を用いて凍結切片を作成し、偏光顕微鏡によってコレステロール結晶を観察した。電子顕微鏡観察を行うため、MC4R 欠損マウスの心臓からグルタルアルデヒド含有パラホルムアルデヒド固定液を灌流して肝臓を固定し、オスミウム固定後に超薄切片を作成して電子顕微鏡観察を行った。

### (4) CLS 構成マクロファージにおけるコレステロール含有量の測定

MC4R 欠損マウス、野生型マウスの門脈より PBS を灌流して脱血処理を行い、gentleMACS (Miltenyi) を用いて肝臓を分散した。30% Percoll にて debris を除去し、溶血処理を行った後に得られた非実質細胞分画を用いて抗体処理を行った。CD45 陽性、Ly6G 陰性分画において F4/80 と CD11b 発現レベルに応じて常在性、浸潤性マクロファージを識別した。常在性マクロファージはさらに CD11c 発現レベルに応じて細胞を分取した。細胞からクロロホルム/メタノールを用いて脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィーによってコレステロール含量を測定した。

### (5) 培養マクロファージにおけるコレステロール結晶添加とリソソーム機能評価

コレステロールをエタノールで溶解した後に -20℃ で結晶化させ、遠心後に上清のエタノールを除去し、コレステロール結晶を PBS に懸濁した。超音波破砕機でコレステロールを均質化し、RAW264 マクロファージに添加した (500 μg/ml)。4% パラホルムアルデヒドで固定後に細胞透過処理を行い、転写因子である TFE3 の免疫染色を行った。遊離コレステロールはフィリピンを用いて検出した。リソソーム内 pH の変化を観察するため、コレステロール結晶添加後にアクリジンオレンジで 30 分間染色し、FACS 解析で蛍光強度の変化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 活性化線維芽細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

NASH では肝細胞周囲性線維化が特徴であるが、四塩化炭素モデルでは小葉性の線維化パターンを取り、GFP 陽性細胞の分布に差が認められた。RNA シークエンスの主成分解析、クラスタリング解析などから NASH-fib は CCl<sub>4</sub>-fib とは異なる遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなった。HSC と比較して NASH-fib において 2 倍以上発現が上昇する遺伝子が 396 抽出され、GO 解析では細胞接着・細胞外基質・創傷治癒などが上位に位置しており、NASH の線維化病態が反映されていると CCl<sub>4</sub>-fib と比較して 700 遺伝子が 2 倍以上発現増加し、脂質代謝に係わる因子が多く抽出された。パスウェイ解析では HSC, CCl<sub>4</sub>-fib 両者と比較して NASH-fib では悪性腫瘍関連パスウェイが活性化しており (図 2A, B) FGF9 の発現が最も強く誘導された。FGF9 および他 2 つの液性因子について血中レベルを測定したが、NASH において上昇は認められなかった。

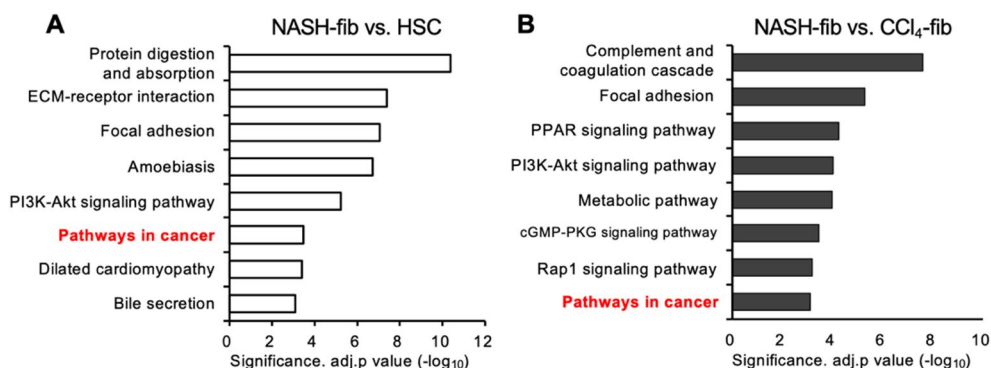


図2. 線維芽細胞を用いたRNAシークエンス解析

### (2) 線維芽細胞・肝癌細胞における FGF9 の作用



マウス初代培養 HSC に対して飽和脂肪酸であるパルミチン酸を添加すると濃度依存的 (~500 $\mu$ M) に FGF9 の発現誘導が認められたが、線維化への関与が既に知られている TGF $\beta$  (10ng/ml) やリポポリサッカライド (10ng/ml) などでは発現誘導は認められなかった。FGF9 添加によって LX-2 における炎症性サイトカインやケモカインの発現が増加し、トランスウェルを用いた遊走能評価では FGF9 によって遊走が亢進した。FGF9 は LX-2 の増殖能に変化を与えなかったが、血清飢餓によって誘導されるアポトーシスを FGF9 は著明に抑制した。HepG2 においても FGF9 による遊走能亢進と抗 Fas 抗体誘導性のアポトーシス抑制が認められた。免疫不全マウスに対する FGF9 過剰発現 LX-2 と HepG2 の共移植では、コントロール LX-2 と比較して FGF9 過剰発現 FGF9 の共移植では腫瘍径が約 3 倍に増大した (図 3)。

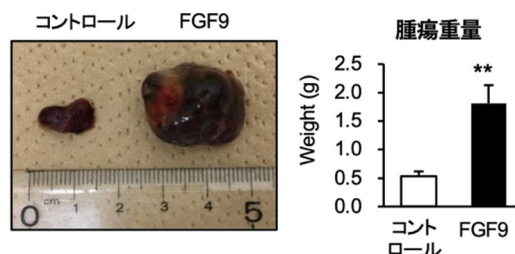


図3. 免疫不全マウスに対するLX-2/HepG2共移植実験

### (3) NASH 肝における蓄積脂質の変化とマクロファージの機能変容

高脂肪食を負荷した MC4R 欠損マウスの肝臓では中性脂肪、コレステロール含量の増加が認められるが、偏光顕微鏡および電子顕微鏡観察によって CLS 内部にコレステロール結晶が認められ、蓄積脂質の質的变化が示唆された。NASH 肝および正常肝から単離した浸潤性マクロファージ (CD11b 高発現) のコレステロール含量に変化は認められなかったが、常在性マクロファージ (F4/80 高発現) に関しては NASH 肝の CD11c 陽性マクロファージでのみコレステロール含量の増加が認められた。RAW264 マクロファージに対してコレステロール結晶を添加したところ、リソソーム生成を制御する MiT/TFE 転写因子ファミリーの一つである TFE3 の核内移行が認められた遺伝子発現解析ではリソソーム関連因子の他、CLS 構成マクロファージのマーカである CD11c と線維化促進因子の発現増加が認められた。アクリジンオレンジを用いた FACS 解析ではコレステロール結晶添加に伴って経時的に蛍光強度の減弱が認められ、リソソーム内 pH 上昇が示唆された。遺伝子発現解析ではリソソーム関連因子の他、CLS 構成マクロファージのマーカである CD11c と線維化促進因子の発現増加が認められた。

本研究ではコラーゲン産生能を指標に線維芽細胞の採取を可能にすることで、NASH の線維芽細胞と肥満・発癌を伴わない薬剤性肝線維症の線維芽細胞では、異なる遺伝子発現プロファイルを有することが明らかとなった。興味深いことに、四塩化炭素モデルの線維芽細胞特異的に発現増加した遺伝子は、既に線維化発症との関連が報告されている遺伝子が多数含まれていたが、NASH 線維芽細胞特異的に発現増加した因子は線維化との関連が未知の因子が多く含まれていた。本研究において取得した線維芽細胞のトランスクリプトームデータは代謝性ストレスによる線維芽細胞の活性化状態を反映する有用なデータであり、NASH を基盤とする肝細胞癌の発症機構解明と新規創薬ターゲットの探索が可能になると考えられる。

CLS は死細胞とマクロファージの相互作用の場であるが、その間に介在する分子はこれまで不明であった。コレステロールは細胞障害性のある脂質であり肝細胞死を誘導することが知られているが、本研究により CLS 内部のコレステロール結晶とマクロファージへのコレステロール負荷が明らかとなった。培養マクロファージの検討ではコレステロール結晶がマクロファージのリソソーム機能障害と線維化促進因子の発現を誘導することから、死細胞に由来するコレステロールがマクロファージの疾患特異性獲得に関与することが示唆された。

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 5件）

1. 著者名 Kanamori Y, Tanaka M, Itoh M, Ochi K, Ito A, Hidaka I, Sakaida I, Ogawa Y, Suganami T	4. 巻 24
2. 論文標題 Iron-rich Kupffer cells exhibit phenotypic changes during the development of liver fibrosis in NASH.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 2102032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.102032	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 Itoh M, Ogawa Y, Suganami T	4. 巻 82
2. 論文標題 Chronic inflammation as a molecular basis of nonalcoholic steatohepatitis: role of macrophages and fibroblasts in the liver.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nagoya J. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.82.3.391	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 T, Kashiwagi Y, Rokugawa T, Kato H, Konishi H, Hamada T, Nagai R, Masago Y, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y, Abe K.	4. 巻 57
2. 論文標題 Evaluation of hepatic function using dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging in melanocortin 4 receptor-deficient mice as a model of nonalcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Magn Reson Imaging	6. 最初と最後の頁 210-217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mri.2018.11.013	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 Asakawa M, Itoh M, Suganami T, Sakai T, Kanai S, Shirakawa I, Yuan X, Hatayama T, Shimada S, Akiyama Y, Fujiu K, Inagaki Y, Manabe I, Yamaoka S, Yamada T, Tanaka S, Ogawa Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Upregulation of cancer-associated gene expression in activated fibroblasts in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 19601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56039-0	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 Kawakubo M, Tanaka M, Ochi K, Watanabe A, Saka-Tanaka M, Kanamori Y, Yoshioka N, Yamashita S, Goto M, Itoh M, Shirakawa I, Kanai S, Suzuki H, Sawada M, Ito A, Ishigami M, Fujishiro M, Arima H, Ogawa Y, Suganami T	4. 巻 10
2. 論文標題 Dipeptidyl peptidase-4 inhibition prevents nonalcoholic steatohepatitis-associated liver fibrosis and tumor development in mice independently of its anti-diabetic effects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57935-6	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9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Michiko Itoh, Takayoshi Suganami
2. 発表標題 Role of cholesterol metabolism in macrophages in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏
2. 発表標題 新規NASHマウスモデルの開発と病態形成機構の解明
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤美智子、金井紗綾香、金森耀平、田中都、松元亮、宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥
2. 発表標題 NASH発症過程における死細胞貪食障害の病態生理的意義
3. 学会等名 第41回日本肥満学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤美智子
2. 発表標題 新規マウスモデルの確立による非アルコール性脂肪性肝炎の病態生理の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、白川伊吹、酒井建、後藤俊宏、浅川雅博、小川佳宏
2. 発表標題 死細胞に対する細胞応答に基づくNASH発症機構の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏
2. 発表標題 代謝ストレスに対する細胞応答とNASH・肝癌発症機構
3. 学会等名 第6回肝臓と糖尿病・代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏
2. 発表標題 マクロファージによるメタボリックシンドロームの制御機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅波孝祥、田中 都、伊藤美智子、小川佳宏
2. 発表標題 細胞死を核とする炎症慢性化機構と生活習慣病
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅川雅博、伊藤美智子、菅波孝祥、酒井建、金井紗綾香、白川伊吹、畑山朋美、田中真二、山田哲也、小川佳宏
2. 発表標題 NASH肝線維芽細胞はFGF9産生を介して腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非アルコール性脂肪肝炎治療用医薬組成物	発明者 田村篤志、由井伸彦、 菅波孝祥、伊藤美智子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-139225	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋大学環境医学研究所分子代謝学分野 <a href="http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mmm/index.html">http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mmm/index.html</a>
--

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