

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16539

研究課題名(和文) マクロファージによる死細胞認識がNASHの病態形成に及ぼす意義 貪食に注目して

研究課題名(英文) Role of the interaction between dead cells and macrophages in the pathogenesis of NASH: focusing on phagocytosis

研究代表者

金森 耀平 (Kanamori, Yohei)

名古屋大学・環境医学研究所・学振特別研究員(PD)

研究者番号：70838903

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、マクロファージによる死細胞認識がNASHの病態形成に及ぼす実態を探索した。細胞死した肝細胞をマクロファージに添加すると、炎症・線維化促進因子の発現が亢進した。死細胞刺激に伴いMiT/TFE転写因子の活性化すること、MiT/TFE転写因子は炎症・線維化促進因子の発現を促進することを明らかにした。免疫染色の結果、NASHにおけるマクロファージではMiT/TFE転写因子が活性化することが示された。MiT/TFE転写因子はリソソームストレスに伴い活性化することから、死細胞貪食の過程でマクロファージにおいてMiT/TFE転写因子が活性化することで、肝線維化の発症に至ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、NASHにおいて死細胞認識によるマクロファージの機能変容を惹起する新たな細胞内シグナルが明らかになった。死細胞を貪食する過程でマクロファージには多様な細胞成分の流入が起こる可能性が想定されるため、今後、死細胞に由来するどの細胞成分がマクロファージの形質転換の引き金となるかについてさらなる解析が必要である。死細胞とマクロファージとの相互作用の分子機構を明らかにした本研究は、NASHの新たな病態メカニズムの解明に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study explored the role of dead cell-sensing in macrophages in the pathogenesis of NASH. Stimulation of macrophages with dead hepatocytes induced expression of proinflammatory and profibrotic factors in vitro. MiT/TFE transcription factors were activated in macrophages stimulated with dead cells. siRNA-mediated silencing of MiT/TFE transcription factors suppressed expression of these genes in macrophages. Furthermore, immunostaining revealed that MiT/TFE transcription factors are activated in macrophages in NASH liver. Considering lysosomal stress activates MiT/TFE transcription factors, these results suggest that lysosomal stress triggered by phagocytosis of dead cells induces activation of MiT/TFE transcription factors in macrophages, leading to the development of hepatic fibrosis in NASH.

研究分野：病態医化学

キーワード：NASH マクロファージ 死細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) NASHにおける死細胞とマクロファージとのクロストークの場：王冠様構造

肥満に伴う脂肪肝が進行すると、炎症と線維化を特徴とする非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を発症し、肝硬変や肝臓がんのリスクとなる。脂肪肝から NASH への移行に肝細胞死が関わりと想定されるが、分子機構の詳細は不明である。

NASH に伴う炎症と線維化には、マクロファージの機能変容が密接に関わる。申請者の所属研究室では、NASH の発症過程において細胞死に至った肝細胞を、CD11c 陽性マクロファージが王冠状に取り囲む組織構造 (王冠様構造) を同定し、これを足場として NASH を発症すること (PLoS One, 8: e82163. 2013) 組織常在性クッパー細胞が死細胞と相互作用することにより CD11c 陽性に形質転換すること (JCI Insight, 2: 92902. 2017) を見出した。即ち、王冠様構造に局在する CD11c 陽性マクロファージが NASH の発症を決定づけている可能性があるが、死細胞認識における責任分子や駆動されるシグナルは不明である。

(2) NASHにおける死細胞認識・貪食の制御分子

申請者の所属研究室では、遺伝性肥満を呈するメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R) の欠損 (KO) マウスに高脂肪食を負荷することで、脂肪肝、王冠様構造の形成、線維化、を経時的に発症する新たな NASH モデルを作製した (Am J Pathol, 179: 2454. 2011)。申請者は、NASH の病態形成において死細胞応答に関わる候補因子を探索する過程で、Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (Gpnmb) と Dectin-1 (Clec7a) が、病態の進行とともに肝臓において発現が顕著に亢進し、特にマクロファージに高発現することを見出した。両者はいずれも細胞表面に局在し、死細胞の貪食に伴い発現誘導され、死細胞の貪食を促進することが報告されている (Blood, 111: 4264. 2008; Immunity, 47: 566. 2017; J Immunol, 200: 1169. 2018)。さらに、Dectin-1 シグナルはマクロファージを炎症促進性に誘導すること、Gpnmb は炎症に伴う線維化の進行に関わる可能性が報告されている。しかしながら、Gpnmb ならびに Dectin-1 が、NASH の発症・進展に及ぼす病態生理的意義は全く不明である。

過剰な脂肪蓄積に伴って生じる肝細胞死が慢性炎症を惹起し、脂肪肝から NASH を発症すると想定されているが、その分子実態は全く不明である。本研究課題の核心をなす学術的問いは、NASH の病態形成における死細胞の認識・貪食機構の解明である。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージに発現する Gpnmb ならびに Dectin-1 が、死細胞貪食能の制御を介して、NASH の病態形成に関与する可能性を想定し、NASH の進行と肝臓マクロファージにおける Gpnmb ならびに Dectin-1 に関して、以下の点を解明することを本研究の目的とした。

- ・マクロファージの死細胞貪食能に、Gpnmb ならびに Dectin-1 が果たす役割と、炎症及び線維化調節機能との関係

- ・Gpnmb ならびに Dectin-1 が NASH の進行に及ぼす影響

3. 研究の方法

MC4R-KO マウスに高脂肪食を 20 週間負荷し NASH モデルとして利用した。マクロファージに発現する Gpnmb ならびに Dectin-1 の意義を検討するために、Gpnmb-KO マウスあるいは Dectin-1-KO マウスの骨髓細胞を、MC4R-KO マウスに移植し、マクロファージにおける Gpnmb あるいは Dectin-1 を欠損させ、NASH を誘導した。

死細胞認識がマクロファージの炎症 / 線維化調節機能に及ぼす影響を明らかにするために、培養マクロファージを死細胞と共培養し炎症及び線維化調節因子の発現量を測定した。マウス肝臓よりコラゲナーゼ灌流法により分離した初代肝細胞を、凍結融解処理することで死細胞を調製した。

4. 研究成果

(1) マクロファージに発現する死細胞認識分子 Gpnmb ならびに Dectin-1 が NASH の病態形成に果たす役割

Gpnmb-KO マウスあるいは野生型マウスの骨髓細胞を、MC4R-KO マウスに移植し NASH を誘導する実験を 2 クール実施したが、1 クール目では体重および肝重量に関して群間に差を認めなかったが、2 クール目では KO-BMT 群において体重および肝重量が有意に低下した。肝臓における炎症や線維化に関連する因子の遺伝子発現を評価した群間で大きな違いを認めなかった。さらに、肝損傷を血清 ALT 値、NASH における肝線維化をシリウスレッド染色により組織学的に評価したが、群間で有意差は認められなかった。Dectin-1-KO マウスについても骨髓移植マウスを利用して NASH の誘導を行ったが、肝臓における炎症・線維化関連因子の遺伝子発現や肝線維化、肝損傷、王冠様構造形成などの NASH の病態に有意な影響を及ぼさなかった。したがって、マクロフ

ァージに発現し死細胞認識を仲介する分子 Gpnmb ならびに Dectin-1 が、単独で NASH の病態形成に及ぼす寄与は小さいと考えられ、NASH の病態形成には複数の死細胞認識分子が代償的に作用している可能性が考えられた。

(2) 死細胞認識がマクロファージの炎症/線維化調節機能に及ぼす影響と分子機構の探索

細胞死した肝細胞により培養マクロファージを刺激すると、CD11c, TNF- α , CCL3, TIMP-1 等の炎症・線維化促進因子の発現が亢進したことから、NASH における王冠様構造では死細胞の存在がマクロファージを炎症・線維化促進性に形質転換させる引き金になると考えられた。この分子メカニズムを探索した結果、Gpnmb の発現を正に調節することが報告されている MiT/TFE 転写因子が、死細胞刺激に伴いマクロファージにおいて活性化することを見出した。

MiT/TFE 転写因子はリソソームストレスに伴い活性化し、細胞質から核に移行し転写因子としてリソソーム生合成に関わる遺伝子の発現を誘導することが知られている。そこで、リソソーム阻害剤であるクロロキンや Bafilomycin A1 によりマクロファージを刺激すると、MiT/TFE 転写因子が活性化するとともに、炎症・線維化促進因子の発現が誘導された。一方、siRNA により MiT/TFE 転写因子に属する TFE3 ならびに TFEB をロックダウンすると、CD11c, TNF- α , CCL3 などの遺伝子発現が低下したことから、MiT/TFE 転写因子はマクロファージにおいて炎症・線維化促進因子の発現を促進することが明らかになった。

TFE3 ならびに TFEB の免疫染色を行うと、正常肝におけるマクロファージと比較して、NASH を誘導した MC4R-KO マウスの肝臓における王冠様構造を構成する CD11c 陽性マクロファージにおいて、MiT/TFE 転写因子が明らかに活性化することを見出した(図1)。同様の結果は、メチオニン・コリン欠乏食により NASH を誘導したマウスの王冠様構造を構成するマクロファージについても認められた。王冠様構造ではマクロファージにより死細胞処理が実行されており、死細胞貪食の過程でリソソーム機能変容が誘導されると想定される。死細胞処理に伴うリソソームストレスが MiT/TFE 転写因子を活性化することで、マクロファージが炎症・線維化促進形質を獲得すると考えられた。

本研究を通して、NASH において死細胞認識によるマクロファージの機能変容を惹起する新たな細胞内シグナルが明らかになった。死細胞を貪食する過程でマクロファージには多様な細胞成分の流入が起こる可能性が想定されるため、今後、死細胞に由来するどの細胞成分がマクロファージの形質転換の引き金となるかについてさらなる解析が必要である。死細胞とマクロファージとの相互作用の分子機構を明らかにした本研究は、NASH の新たな病態メカニズムの解明に資すると期待される。

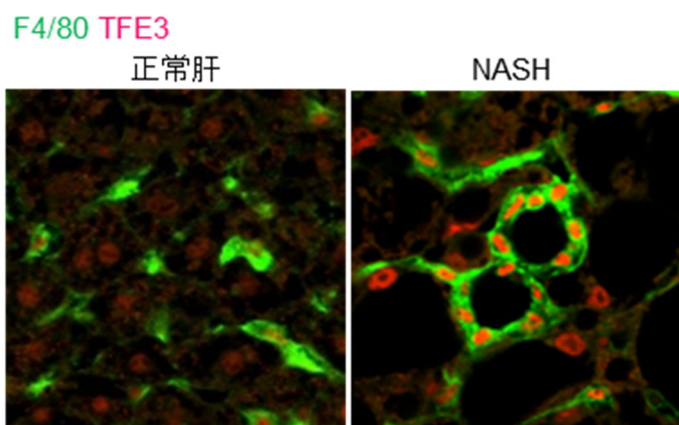


図1 王冠様構造における MiT/TFE 転写因子の活性化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawakubo M, Tanaka M, Ochi K, Watanabe A, Marie Saka-Tanaka, 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 -

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 102032
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------