

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17404

研究課題名(和文) 肝硬変、NASH発症・進展に果たす造血細胞の関与の解明と新たな治療標的の確立

研究課題名(英文) Elucidation of the role of hematopoietic cells in the development and progression of liver cirrhosis due to NASH and establishment of new therapeutic targets.

研究代表者

大園 芳範(Ozono, Yoshinori)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20839394

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)：四塩化炭素(CCl₄: carbon tetrachloride)誘導肝線維化モデルマウスに、クロドロン酸内包リポソーム(CL: clodronate liposome)を併用投与して単球を選択的に除去したところ、CL非投与群と比較して肝臓中のfibrocyteは減少したが、肝線維化の進展は抑制されなかった。このため、CCl₄誘導肝線維化モデルにおいては肝線維化進展におけるfibrocyteの寄与は小さいと考えられた。今後はNASHモデルマウスにおいても同様に単球除去をすることにより、肝臓中のfibrocyteが減少するか、また肝線維化の進展が抑制できるかを検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CCl₄誘導肝線維化モデルにおいては、その線維化進展における単球由来fibrocyteの寄与は小さいものと考えられ、その線維化改善のためにはfibrocyte以外の細胞を治療標的とするのが妥当であると考えられた。ただし、NASHモデルに関しては、その線維化進展におけるfibrocyteの寄与の程度は解明されていないため、今後の追加研究が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carbon tetrachloride (CCl₄: carbon tetrachloride)-induced liver fibrosis model mice were treated with clodronate liposomes (CL: clodronate liposome) to selectively eliminate monocytes. Although fibrocytes in the liver were reduced compared to the non-CL-treated group, the progression of liver fibrosis was not suppressed. Therefore, the contribution of fibrocyte to liver fibrosis in the CCl₄-induced liver fibrosis model is considered to be small. In the future, we plan to examine whether the elimination of monocytes in the liver of NASH model mice also reduces fibrocyte in the liver and suppresses the progression of liver fibrosis.

研究分野：肝臓内科学

キーワード：NASH 肝硬変 fibrocyte CDAHFD CD11b-DTR

1. 研究開始当初の背景

線維化は組織傷害に対する病態生理学的な反応で、コラーゲンを中心とした細胞外基質が間質に過剰沈着した状態を指す。高度進行例では臓器不全に陥り、生命予後改善のためには臓器移植が必要とされる。

近年、肺線維症、腎線維症、心線維症において、fibrocyte が各臓器内で増加し、線維化進展に重要な役割を果たすことが報告されている。ところが、肝線維化に関しては、その進展に fibrocyte がどの程度寄与しているかは明らかになっていない。

また、近年、血液細胞に TET2 変異を有する患者では、変異がない患者と比較して動脈硬化性疾患が多いことが示された。さらに、TET2 KO マウス由来の造血細胞を移植されたマウスは、高脂肪食負荷を行うと野生型マウスの造血細胞を移植したマウスに比べて動脈硬化が進行することが報告され、その機序として TET2 変異血液細胞が動脈硬化を促進させるケモカイン、サイトカインの発現を増大させることが考えられている。この中で IL-6 などのサイトカインはインスリン抵抗性の増大を介して脂肪肝を誘導することが示されているが、TET2 変異血液細胞が脂肪肝および NASH の発症とその進展などに及ぼす影響は明らかにされていない。

2. 研究の目的

造血細胞が肝線維化進展や脂肪肝および NASH の発症に与える影響を明らかにし、造血細胞が肝線維化や NASH の新たな治療標的になり得るかを明らかにする。1 つ目のテーマとして単球由来の細胞である fibrocyte の肝線維化モデルにおける寄与を明らかにし、fibrocyte を標的とした肝線維化治療モデルを作成する。2 つ目のテーマとして造血細胞に TET2 が欠損したマウスに高脂肪食を給餌し、誘導される脂肪肝の程度が増悪するかどうかを評価し、増悪した場合、その機序を明らかにする。

3. 研究の方法

テーマ 肝線維化における fibrocyte の寄与の検討

肝線維化モデルマウスを 1) 四塩化炭素 (CCl₄: carbon tetrachloride) 投与、2) コリン欠乏高脂肪食飼料 (CDAHFD: choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet) の給餌により作成する。それぞれのモデルマウスに単球除去を行うことで、肝臓中の fibrocyte が減少するか、また肝線維化の進展が抑制できるかを検討する。

テーマ TET2 KO マウスによる血液細胞の機能解析

TET2KO マウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植する。移植後に CDAHFD を給餌することで誘導される脂肪肝の程度をコントロールと比較する。脂肪肝の重症度に差異が認められた場合、TET2 KO マウス由来の血液細胞と、野生型マウス由来の血液細胞について遺伝子発現プロファイリングを行い、脂肪肝の発生機序について検討する。また、TET2 変異血液細胞由来のケモカインやサイトカインの抑制によって、脂肪肝が抑制できるかどうかを検討する。

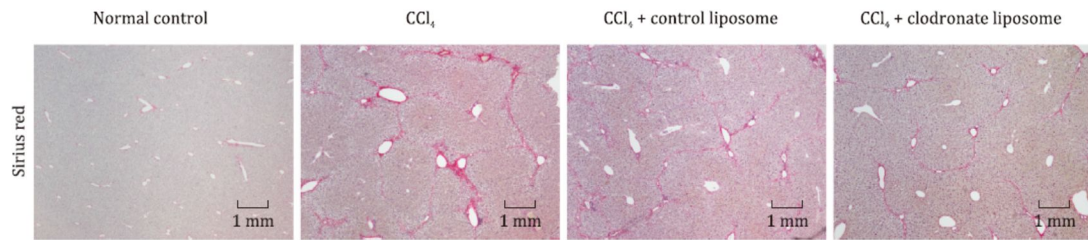
4. 研究成果

テーマ 肝線維化における fibrocyte の寄与の検討

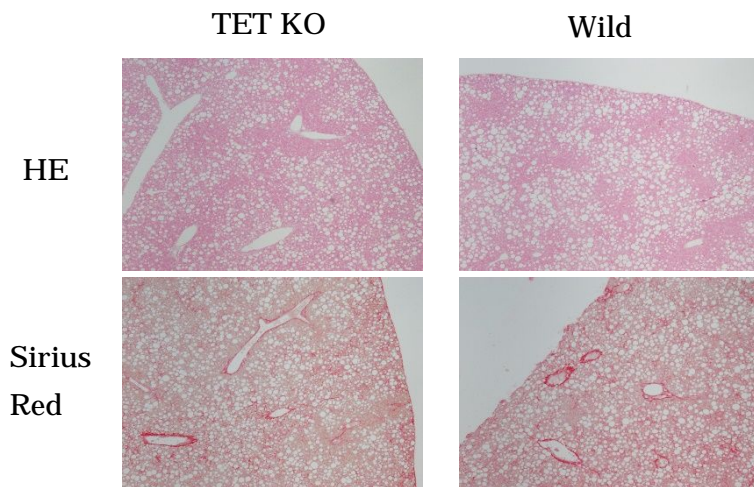
野生型マウスに CCl₄ 投与、あるいは CDAHFD を給餌することで肝線維化モデルを作成した。CCl₄ 投与マウスにクロドロン酸内包リポソーム (CL: clodronate liposome) を併用投与して単球を除去したところ、CL 非投与群と比較して肝臓中の fibrocyte は減少したが、肝線維化の進展は抑制されなかった (図 1)。このため、CCl₄ 誘導肝線維化モデルにおいては肝線維化における fibrocyte の寄与は小さいと考えられた。今後は、CDAHFD を給餌させて作成する NASH モデルマウスにおいても同様に単球除去をすることにより、肝臓中の fibrocyte が減少するか、また脂肪肝や肝線維化の進展が抑制できるかを比較検討する予定である。

テーマ TET2 KO マウスによる血液細胞の機能解析

TET2 KO マウスの骨髄を野生型マウスに移植し、移植後から CDAHFD を給餌し、12 週後に解剖して肝臓の病理標本を作製した。HE 染色で脂肪肝および炎症細胞浸潤、Sirius-Red 染色で肝線維化が確認されたが、野生型マウスの骨髄を移植したコントロール群と比較して、脂肪肝および肝線維化の程度には差はみられなかった (図 2) ため、本テーマを終了とした。



(図1) CCl₄ 投与により肝臓に線維化が見られたが、clodronate liposome 投与群でも線維化の程度は変わらなかった。



(図2) TET2 KO マウスの骨髄を移植したマウスでは、肝臓の脂肪化および肝線維化の程度は野生型マウスの骨髄を移植したマウスと同程度であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshinori Ozono, Kotaro Shide, Fumiyo Toyoshima, Yuuka Takaishi, Mai Tsuchimochi, Ayako Kamiunten, Takuro Kameda, Kenichi Nakamura, Tadashi Miike, Kazunori Kusumoto, Hisayoshi Iwakiri, Satoru Hasuike, Kenji Nagata, Akira Sawaguchi, Kazuya Shimoda	4. 巻 18
2. 論文標題 Monocyte-derived Fibrocytes Elimination Had Little Contribution on Liver Fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International	6. 最初と最後の頁 348-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.hbpd.2019.02.002.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuya Shimoda
2. 発表標題 Depletion of Neoplastic CD11b Positive Cells in Jak2V617F Mutant Mice Reduced Fibrocytes in Bone Marrow and Improved Myelofibrosis
3. 学会等名 2019 ASH Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------	---------