

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08349

研究課題名(和文) 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態進展におけるRIG-I様受容体の関与

研究課題名(英文) Involvement of RIG-I-like receptors in the pathogenesis of NAFLD

研究代表者

川口 章吾 (Kawaguchi, Shogo)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：90455741

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)：RIG-I様受容体(RLRs)は主にRIG-IとMDA5から構成される細胞内核酸受容体であり、自然免疫応答に関与する分子である。本研究ではNAFLD患者の肝生検組織とNASHモデルマウスを用いて、RLRsの発現を解析した。MDA5は非NAFLDでは発現が認められなかったが、NAFLDでは主に肝内に浸潤するCD11b陽性マクロファージに発現していた。NASHマウスではMDA5発現の増加は炎症性サイトカイン発現に先行して認められ、炎症病態に関与している可能性が示唆された。また、マクロファージにおけるMDA5発現はLPSによって誘導されるため、腸内細菌抗原の流入が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NASHは世界的に患者数が増加している疾患であり、肝硬変、肝細胞癌の原因となるばかりでなく、脳心血管疾患の発症にも関連するため重要な疾患である。本邦においては減量と糖尿病などの併存疾患に対する治療が中心であり、根本的治療法の開発のためには病態解明による新規治療標的の同定が不可欠である。本研究では、NASH病態進展機序の一つに自然免疫応答のメカニズムが関与することに着目し、これまで報告がなかったRLRs分子の病態への関与を明らかにした。とくにMDA5はサイトカインを高産生する活性化マクロファージに発現しており、NASHの新規治療標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like receptors (RLRs) are pattern recognition receptors for intracellular nucleic acids. The RLRs, consist of RIG-I and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), are involved in innate immune responses. In the present study, we investigated the expression of RLRs in the liver of NAFLD patients and diet-induced NASH model mice. The results demonstrated that MDA5-positive cells was increased in the NAFLD patient. The cells expressed CD68 and CD11b, suggesting they were infiltrating macrophages. The mRNA level of MDA5 was increased prior to the enhanced expression of pro-inflammatory cytokines. Stimulation with lipopolysaccharide led to the increased expression of MDA5 in macrophages, suggesting that gut microbiota-derived antigen plays a critical role in the hepatic induction of MDA5.

研究分野：消化器病学

キーワード：MDA5 RIG-I NASH NAFLD マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

世界的な肥満人口の増加により非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者数が増加している。NAFLD は比較的予後良好な単純性脂肪肝 (NAFL) と、肝硬変、肝細胞癌へと進展する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) とに分類される。本邦における NASH 治療は減量と糖尿病などの併存疾患に対する治療が中心であり、炎症や線維化に対する確立された治療法は存在しない。根本的な治療法開発のためには病態解明による新規治療標的の同定が不可欠である。

NASH の病態の全容は解明されていないが、肝細胞障害の機序の一つとして自然免疫系の活性化が重要視されている。NASH においては、腸管透過性が亢進し腸内細菌由来の lipopolysaccharide (LPS) が経門脈的に肝内へ流入しやすい状態となっており、これが肝に局在するマクロファージからの TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン、活性酸素などの炎症メディエータを誘導する。さらに脂肪組織からのアディポカイン産生も増加しており、これらの機序により肝細胞は過剰な炎症性サイトカインにさらされ、細胞障害が惹起される。NASH の炎症病態の形成には Th1 型免疫応答の分子機序が関与するとされており、肥満に伴う肝内環境の変化が STAT1 シグナルを増強させている。

Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) は RIG-I と Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) から構成される RNA helicase であり、主に抗ウイルス応答に関連した機能が報告されている。我々は、RIG-I、MDA5 がいずれも Interferon (IFN)-stimulated genes (ISGs) であることに着目し、*in vitro* の系でこれらの分子が STAT1 を介したシグナルを増幅させる機能を有していることを報告してきた。過去の結果から、NASH のような metabolic inflammation にも RLRs が関与している可能性が示唆されたが、その関連性については全く解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究は RLRs 分子の NAFLD の肝における発現とその意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### NAFLD 症例と NASH モデルマウスにおける RLRs 発現の検討

NAFLD 症例 11 例とコントロール 8 例の肝生検組織を用いて、MDA5 の発現を確認した。コントロールには次に、7 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いて検討を行った。コリン欠乏高脂肪食 (CDAHFD) で飼育することで NASH を誘導し、1、3、6 週時点で解剖し肝臓を採取した。肝内の RIG-I と MDA5 の発現を蛍光免疫染色 (IF) にて解析した。また、肝組織から RNA を抽出し、定量 PCR を行い、RLRs の発現とともに TNF- $\alpha$ 、IL-6、CCL2 などのサイトカイン、ケモカイン発現を解析した。

### マクロファージにおける MDA5 発現の検討

マクロファージにおける MDA5 の発現誘導機序を確認するため、THP-1 細胞とマウスから採取した骨髄マクロファージ (BMDM) を準備した。THP-1 細胞は 10ng/mL の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) を添加し 48 時間後に、PMA フリーの培地に交換しさらに 24 時間培養しマクロファージ様細胞に分化させて使用した。BMDM は C57BL/6J 雌マウス的大腿骨から回収した細胞を GM-CSF 添加培地で 7 日間培養し、マクロファージに分化させた。これらの細胞を培養し、LPS、TNF- $\alpha$ 、パルミチン酸で刺激した。4 時間後に細胞から RNA を抽出、また 24 時間後にタンパク質を回収し、それぞれ定量 PCR と western blotting にて MDA5 の発現を解析した。

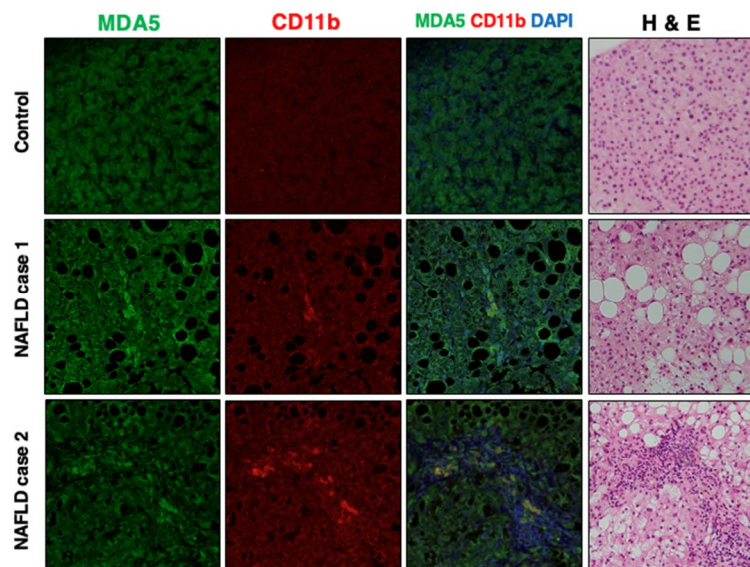
### MDA5 knockout (KO) マウスにおける NASH 表現型解析

MDA5KO マウスと野生型マウスを CDAHFD で飼育し、その表現型を比較検討した。採取した肝組織から RNA を抽出して定量 PCR によるサイトカイン、ケモカイン発現を比較検討した。

## 4. 研究成果

肝における MDA5 発現は NAFLD 症例 11 例中 8 例に認められた。一方、非 NAFLD 症例では 8 例中 2 例に認められるのみであり、NAFLD で有意に高率であった ( $p < 0.05$ )。MDA5 発現細胞は非実質細胞であり、CD68、CD11b が共発現していたため、肝に遊走した単球由来マクロファージではないかと考えられた (下図)。

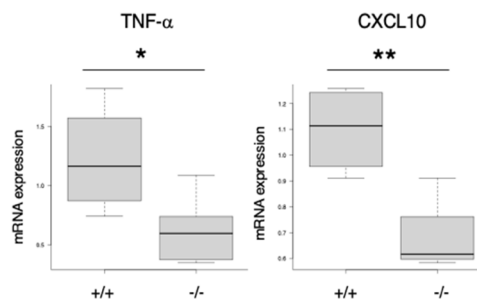
NASH モデルマウスを用いた検討では、CDAHFD 開始 1 週間後より MDA5 陽性細胞が肝内に浸潤しており、MDA5 mRNA 発現が増加していた。これは TNF- $\alpha$  や IL-6、IL-12p40 といった炎症性サイトカインの発現増加に先行していた。また、IF では F4/80、CD11b との共発現が認められたため、MDA5 発現細胞は単球由来マクロファージと考えられた。一方、RIG-I は通常飼料で飼育したコントロールのマウスにおいても、肝実質細胞内に発現が認められた。NASH マウスにおいては、肝実質細胞の発現に加え、F4/80 陽性マクロファージに発現が認められた。



THP-1、BMDM いずれも LPS 刺激により RLRs の発現が誘導された。TNF- $\alpha$  刺激は THP-1 では RLRs を誘導したが BMDM では誘導されなかった。また、パルミチン酸刺激はいずれの細胞でも RLRs を誘導しなかった。上記結果から肝内のマクロファージにおける RLRs 発現には、炎症性サイトカインや飽和脂肪酸ではなく、グラム陰性桿菌の菌体抗原による刺激が必要であることが示唆された。

MDA5KO マウスの NASH 表現型は、組織学的には脂肪化、炎症細胞浸潤の程度ともに野生型マウスと同程度であった。しかし、肝臓における TNF- $\alpha$  と CXCL10 の mRNA 発現は有意に低下していた（右図）。このことから NASH の病態において、MDA5 はこれらのサイトカイン、ケモカイン発現を増加させていることが示唆された。いずれの分子も NASH の炎症促進因子であることが報告されていることから、MDA5 も NASH 病態を増悪させる可能性がある。

以上の結果から、NASH では肝内に遊走するマクロファージに RLRs、とくに MDA5 が高発現しており、これは肝内に流入する LPS 抗原刺激が関与している可能性が示唆された。さらに MDA5 は一部の炎症性サイトカイン、ケモカイン発現に関連しており、NASH の病態への関与が示唆された。



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 1件）

1. 著者名 Kawaguchi Shogo, Sakuraba Hirotake, Horiuchi Momone, Ding Jiangli, Matsumiya Tomoh, Seya Kazuhiko, Iino Chikara, Endo Tetsu, Kikuchi Hidezumi, Yoshida Shukuko, Hiraga Hiroto, Fukuda Shinsaku, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 45
2. 論文標題 Hepatic Macrophages Express Melanoma Differentiation-Associated Gene 5 in Nonalcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation	6. 最初と最後の頁 343 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10753-021-01550-8	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 Kawaguchi Shogo, Sakuraba Hirotake, Kikuchi Hidezumi, Matsuki Kota, Hayashi Yudai, Ding Jiangli, Tanaka Yusuke, Seya Kazuhiko, Matsumiya Tomoh, Hiraga Hiroto, Fukuda Shinsaku, Sasaki Kenroh, Imaizumi Tadaatsu	4. 巻 25
2. 論文標題 Polygonum tinctorium leaf extract ameliorates high-fat diet-induced intestinal epithelial damage in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2023.11811	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口章吾、櫻庭裕丈、菊池英純、平賀寛人、今泉忠淳、福田眞作
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝炎の病態におけるMDA5の関与
3. 学会等名 第58回日本消化器免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口章吾、丁江麗、唐沢貴生、瀬谷和彦、櫻庭裕丈、福田眞作、今泉忠淳
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態におけるmelanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)の関与
3. 学会等名 第159回弘前医学会例会
4. 発表年 2022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
---------	---------