

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16103

研究課題名(和文) Kupffer細胞の細胞内脂質代謝による活性化制御と肝線維化病態への関与の検討

研究課題名(英文) A study of regulation of Kupffer-cell activation by intracellular lipid metabolism and its involvement in the pathogenesis of liver fibrosis.

研究代表者

宮崎 啓史 (MIYAZAKI, Hirofumi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90803867

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)：肝マクロファージ(Kupffer細胞、KC)は、肝環境変化により機能を活性化させ、非アルコール性脂肪性肝炎や肝線維化などの病態に重要な役割を果たすが、KC活性化の分子基盤は不明な点が多い。本研究では、KC特異的に発現する分子FABP7に着目し、肝疾患モデルでのKCの活性化制御機構について検討した。その結果、KCのFABP7は肝線維化を促進させることが示された。一方、肝の脂質蓄積や肝組織炎症への関与は低い可能性も示された。さらに、FABP7はKCの抗炎症性機能活性化を制御し、線維芽細胞の線維化反応を促進させる可能性が示された。今後、より詳細なFABP7によるKCの活性化制御機構を解明したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、KC特異的に発現する分子FABP7がKCの抗炎症性機能制御機構を介して、肝線維化促進に作用することを示した。肝線維化は肝臓の炎症治癒の役割を果たす一方、肝硬変や肝細胞癌への誘引リスクでもある。FABP7はリガンドである長鎖脂肪酸の細胞内生理機能を制御すると考えられ、今後、長鎖脂肪酸やFABP7によるKCの活性化制御機構をより詳細に明らかにすることにより、KC機能が関与する肝疾患の予防や治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Liver macrophages (Kupffer cells, KCs) activate their functions upon changes in the liver environment and play important roles in pathological conditions such as nonalcoholic steatohepatitis and liver fibrosis, but the molecular basis of KC activation is still unclear. In this study, we focused on FABP7, a molecule specifically expressed in KC, and investigated the regulatory mechanism of KC activation in liver disease models. The results showed that FABP7 in KC promotes liver fibrosis. On the other hand, it was also shown that FABP7 may be less involved in hepatic lipid accumulation and hepatic tissue inflammation. Furthermore, FABP7 may regulate the activation of anti-inflammatory functions of KC and promote fibrotic responses of fibroblasts. In the future, we would like to elucidate the regulatory molecular mechanism of KC activation by FABP7 in more detail.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マクロファージ 肝線維化 脂肪酸結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

肝の常在性マクロファージ Kupffer 細胞 (KC) は組織マクロファージの約 80~90%を占め、肝の免疫反応の中心的役割を担うが、脂肪の食事摂取や血液環境によって大きくその活性を変え、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や肝線維化などの様々な肝疾患の病態メカニズムに重要な役割を果たす。すなわち、KC の活性化制御機構の解明は高い注目を集めているが、他のマクロファージと異なり門脈血に直接接する KC 独自の特性や単離の難しさから、未だその分子基盤については不明な点が多い。最近、マクロファージは環境因子により細胞内脂質代謝バランスが変化することで形質を変化させることが明らかになっており、細胞内代謝の調節が活性化制御の鍵を握ると考えられる。

脂肪酸結合蛋白質 (Fatty acid-binding protein, FABP) は水に不溶な長鎖脂肪酸と結合することにより可溶化し、細胞内外における長鎖脂肪酸の生理機能調節に関与する。FABP は 12 種類のサブタイプを持つファミリー分子で長鎖脂肪酸との結合親和性が異なる。とりわけ KC は、他のマクロファージとは異なり FABP7 型を特異的に高発現しており、肝特異的環境における KC の細胞内代謝を調節する重要な分子である可能性が示唆される。

本研究では、マクロファージのなかでも KC 特異的に発現する FABP7 の機能制御メカニズムに着目し、肝の環境変化によって KC はどのように活性化し機能を変化させるのか？具体的には、ミトコンドリア機能や細胞内脂質代謝にどのような影響を及ぼし形質が変化するのか？さらに肝細胞や類洞内皮細胞、線維芽細胞など肝組織を構成する細胞とどのような機能的連関を持つのか？という学術的問いに対する実験的アプローチを行う。

2. 研究の目的

本研究では、KC 特異的に発現する FABP7 の欠失がマウスの NASH や肝線維化の病態メカニズムにどのような影響を及ぼすのか、さらに、FABP7 が KC の細胞内脂質代謝および機能の活性化に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とした。NASH や肝線維化などの病態メカニズムの解明と新規治療法の開発への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) FABP7 遺伝子欠損 (FABP7-KO) マウスおよび野生型 (WT) マウスを用いて、高脂肪高コレステロール (HFHC) 食を与えることにより NASH モデルを作成した。また、四塩化炭素 CCl₄ 長期投与することにより肝線維化モデルを作成した。それぞれのモデルマウスにおける肝組織の組織学的評価を行った。さらに肝組織から KC を単離し、マクロファージの活性化マーカーの遺伝子発現を比較検討した。

(2) FABP7-KO マウスおよび WT マウスから採取した骨髄細胞をマクロファージに分化させ (bone marrow derived macrophages, BMDM)、遺伝子発現解析、蛋白質発現解析およびミトコンドリア機能の解析を行った。さらに、BMDM と線維芽細胞との共培養により、線維芽細胞との線維化反応を検討した。

4. 研究成果

(1) FABP7-KO マウスは肝線維化レベルが低下した

FABP7-KO マウスおよび WT マウスに四塩化炭素 CCl₄ を腹腔内投与し (週 2 回、12 週間)、肝線維化を誘導した。肝組織切片による α -SMA 免疫染色およびマッソントリクローム染色により線維化レベルを評価したところ WT マウスに比べて FABP7-KO マウスで低下していた

(図 1)。肝マクロファージは肝線維化領域周囲へ集積することが認められ、さらに WT マウスにおける肝マクロファージにおける FABP7 の発現は肝線維化モデルで増加していた。肝マクロファージの FABP7 は肝線維化を促進させる機能に働く可能性が示された。

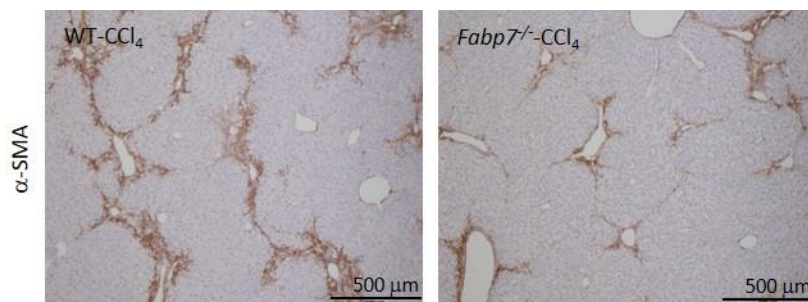


図 1 FABP7-KO マウスは肝線維化レベルが低下した

CCl₄ 長期投与モデルでは WT マウス (左図) に比べて FABP7-KO マウス (右図) で肝線維化が低下していた。

HFHC 食給餌によ

る NASH モデルにおいて、肝組織切片を用いて、肝の脂質蓄積や炎症レベルを示す NAS (NAFLD activity score) を比較検討したが、FABP7-KO マウスと WT マウスとの両群間には差がなかった。HFHC 摂取による NASH モデルにおいて、肝組織内における高度の脂質蓄積と炎症反応は認められたが、肝線維化程度は低く、FABP7-KO マウスと WT マウスとの比較検討

は出来なかった。HFHC 摂取による肝の脂質蓄積や炎症反応における KC の FABP7 の関与は低いと考えられる。

(2) FABP7-KO マクロファージは抗炎症性機能活性化が低下した

CCl₄ 肝線維化モデルにおいて、肝組織よりマクロファージを単離し、マクロファージの代表的な炎症性・抗炎症性機能のマーカー分子の遺伝子発現解析を行った。炎症性機能のマーカー分子の遺伝子発現には有意な差が認められなかったものの、一方で、抗炎症性機能のマーカーに関する遺伝子が、WT マウスに比べ FABP7-KO マウスで低下していた (図 2)。マクロファージの抗炎症性機能は組織の線維化反応を促進させる作用を示すことが多くの研究で報告されている。したがって、FABP7 の欠失によるマクロファージの抗炎症性機能の低下が、肝線維化を抑制させた可能性が示唆された。

(3) FABP7 はマクロファージの抗炎症性機能制御に関与する

FABP7-KO マウスおよび WT マウスの骨髄から BMDM 分化させ、インターロイキン (IL) -4 刺激により抗炎症性機能に活性化し、遺伝子および蛋白質の発現を検討したところ、Arg-1、Pparg1、Tgfb-1 などの発現が低下した。また、マクロファージ細胞株 J774 に対し遺伝子導入により FABP7 を強制発現させると、Arg-1、Pparg1、Tgfb-1 発現増強が確認された。FABP7 はマクロファージの抗炎症性機能の制御機構に関与することが示された。

(4) マクロファージの FABP7 は線維芽細胞の線維化反応を促進させる

さらに、IL-4 刺激により抗炎症性機能に極性化させた BMDM と線維芽細胞株 NIH3T3 との共培養により、線維芽細胞の線維化反応を検討した。WT BMDM との共培養と比べて FABP7-KO BMDM と共培養した NIH-3T3 の fibronectin の産生が低下しており (図 3)、線維化反応の低下が示唆された。FABP7 の欠失により線維芽細胞の線維化反応が低下した可能性が示された。

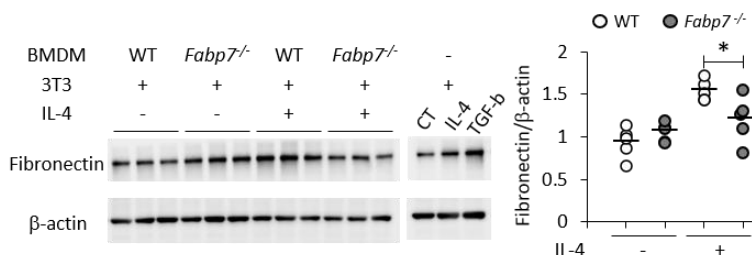


図 3 マクロファージの FABP7 は線維芽細胞の線維化反応を促進させる
IL-4 で刺激した WT BMDM と FABP7-KO BMDM をそれぞれ線維芽細胞 NIH3T3 と共培養し、3T3 細胞の fibronectin 発現を検討した。WT-BMDM との共培養と比べて FABP7-KO BMDM との共培養により fibronectin 発現が低下した。

(5) FABP7 はマクロファージの脂肪酸代謝機能に関与する

マクロファージの抗炎症性機能活性化機構において脂肪酸酸化機能が重要である。WT BMDM と FABP7-KO BMDM の脂肪酸酸化機能を比較すると、FABP7-KO BMDM で低下していることが分かった。また、J774 マクロファージ細胞株の FABP7 強制発現系においても、コントロール株と比較して、脂肪酸酸化機能が増進することが分かった。FABP7 はマクロファージの脂肪酸酸化機能促進に作用することが分かった。現在、FABP7 による脂肪酸酸化機能の制御機構について検討を進めている。

以上のことから、KC 特異的に発現する FABP7 は、マクロファージの抗炎症性機能活性化制御機構に関与し、肝線維化反応促進に作用することが示された。今後、FABP7 の分子機構をさらに明らかにし、FABP7 による KC の活性化制御機構を解明したいと考える。

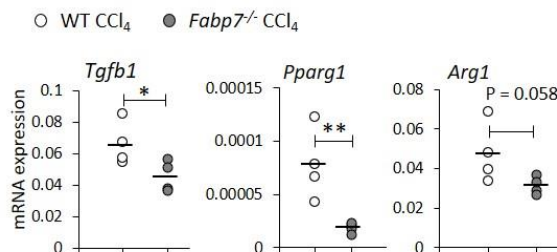


図 2 FABP7-KO マクロファージは抗炎症機能マーカーの遺伝子発現が低下した

CCl₄ 投与肝線維化モデルの肝組織から単離したマクロファージの抗炎症機能マーカーの遺伝子発現が WT マクロファージに比べて FABP7-KO マクロファージで低下していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎啓史、Yang Shuhan、Tunyanat Wannakul、大和田祐二
2. 発表標題 肝線維化過程における肝マクロファージの脂肪酸結合蛋白質FABP7の機能的役割
3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirofumi Miyazaki, Shuhan Yang, Yuji Owada
2. 発表標題 Fatty acid-binding protein 7 modulates liver fibrosis by regulating the anti-inflammatory activation of liver macrophages
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirofumi Miyazaki, Shuhan Yang, Yuji Owada
2. 発表標題 The role of an intracellular chaperones of long-chain fatty acids FABP7 in liver macrophages during liver diseases
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会（12月8日，熊本城ホール，ハイブリッド開催）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 啓史，Yang Shuhan，Tunyanat Wannakul， 大和田 祐二
2. 発表標題 脂肪酸結合蛋白質FABP7は肝マクロファージの抗炎症性機能を制御し肝線維化過程に関与する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会（3月18日，東北大学，仙台市）
4. 発表年 2023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
---------	---------