

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590825

研究課題名（和文） TLRs は、どのような機序で NASH 発症・進展を修飾するのか？

研究課題名（英文）

What is the mechanism for TLRs to modify the onset and progression of NASH?

研究代表者

富樫 整 (TOGASHI HITOSHI)

山形大学・保健管理センター・教授

研究者番号：60192209

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝炎発症・進展における TLR-2 と TLR-4 の役割を解明した。wild type、TLR-2(-/-)、TLR-4(-/-) のマウスを用い、脂肪性肝炎を惹起させた。TLR-2(-/-) 群は脂肪性肝炎の増悪、TLR-4(-/-) 群は脂肪性肝炎発症の抑制を示した。TLR-2(-/-) マウスでは、肝における IGFBP-2 の発現が低下し、pro-inflammatory cytokines の発現が増加した。TLR-4(-/-) マウスでは、逆の結果であった。肝におけるサイトカイン産生の差異により、TLR-2 は脂肪性肝炎発症・進展を抑制し、TLR-4 は促進した。

研究成果の概要（英文）： We investigated the role of TLR-2 and TLR-4 in the onset and progression of nonalcoholic steatohepatitis. Wild type, TLR-2(-/-), and TLR-4(-/-) mice were used and experimental steatohepatitis was induced. TLR-2(-/-) group exacerbated the steatohepatitis and TLR-4(-/-) group completely attenuated it. TLR-2(-/-) group decreased the expression of IGFBP-2 and increased the expression of pro-inflammatory cytokines in the liver. Opposite results were observed in TLR-4(-/-) group. Here we showed that TLR-2 attenuated steatohepatitis and TLR-4 exacerbated it by differential expression of various kinds of cytokines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：TLR-2、TLR-4、脂肪性肝炎、IGFBP-2、サイトカイン、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病患者の増加に伴い、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、最も普通にみられる肝疾患である。NAFLD は、単純性

脂肪肝（NAFL）から脂肪性肝炎、さらには肝硬変に急速に進展する非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）まで様々な段階を包括している。NAFLD の発症と進展に関して、“two hit

theory” が提唱されている。肝への脂肪沈着は、NAFLD 診断の目安であるとともに、first hit とされている。また、脂肪沈着後 NAFLD の進展に関わる諸因子が想定され、これを second hit としている。Reactive oxygen species (ROS)やサイトカイン産生が起こり、これらがインスリン抵抗性、脂肪酸代謝異常を惹起し、肝脂肪沈着を促進していると考えられる。この際、ROS やサイトカイン過剰産生は、腸内細菌由来の内毒素が肝に存在するマクロファージの Kupffer 細胞を活性化することによりもたらされる。また、臨床的にも NASH 患者において、腸管内の細菌異常増殖が認められる。従って、腸管の菌体成分と肝に発現する病原体関連分子パターン受容体との相互作用は、NASH 発症・進展に重要な役割を果たしていると考えられている。

Toll-like receptors (TLRs)は、病原体関連分子パターン受容体であり、急な病原体の進入に素早く対応できる自然免疫の調節に関わっている。中でも、TLR-2 や TLR-4 は、細胞表面に発現され、細菌の成分と特異的に反応することにより細菌感染防御において中心的役割を果たしている。TLR-2 は、細菌由来のリポ蛋白、TLR-4 は、グラム陰性菌由来の LPS と特異的に反応する。TLR-2 と TLR-4 の細胞内シグナル伝達は、両レセプター細胞内ドメインに付着するアダプター分子の MyD88 を介する経路と、MyD88 を介さない経路があり、TLR-2 と TLR-4 の働きの多様性を形成している。病的条件下では TLR-2 や TLR-4 を介してのサイトカイン産生異常が起こり、脂肪酸代謝異常や肝内炎症を惹起すると推測される。しかしながら、TLR-2 や TLR-4 がどの様に NASH 発症・進展と関わっているか不明である。

2. 研究の目的

TLR-2 や TLR-4 の NASH 発症・進展への関わりを解明するため、TLR-2 と TLR-4 の遺伝子ノックアウトマウスを用い、メチオニン・コリン欠乏食 (MCDD) にて飼育し、実験的脂肪性肝炎を誘導し病態解析を行った。今回の研究の目的は、TLR-2 と TLR-4 が脂肪性肝炎発症・進展においてどのような役割を果たしているか明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) **【動物】** TLR-2 ノックアウトマウス (TLR-2(-/-))、TLR-4 ノックアウトマウス (TLR-4(-/-))、ノックアウトマウスと同系 (C57BL/6) の wild type マウスを実験に用いた。マウスは、全例雄である。飼育室を Specific pathogen free に保ち、飼料や水を自由に摂取できる状態にした。

(2) **【実験的非アルコール性脂肪性肝炎の誘導】** 脂肪性肝炎は、Methionine Choline 欠乏食 (MCD) により誘導した。マウスを以下の群に分けた。(i) MCD 食を与えた Wild type 群 (n=15)、(ii) MCD 食を与えた TLR-2(-/-) マウス群 (n=18)、(iii) MCD 食を与えた TLR-4(-/-) マウス群 (n=18)、(iv) コントロールとして MCD 食を与えていない Wild type 群 (n=15) の 4 群である。バックグラウンドとして、wild type マウス (n=5)、TLR-2(-/-) マウス (n=5)、TLR-4 マウス (n=5) を用意した。

マウスの飼料摂食状態を毎週記録した。実験開始後 1 週、2 週、4 週目にマウスをネンブタールにて十分麻酔し、開腹の後血液や組織の採取を行った。マウスの取り扱いは、山形大学医学部実験動物センターにて定める規約を遵守した。また、山形大学動物実験委員会が、実験のプロトコールを了承した。

(3) **【血液検査】** 一晩絶食の後、開腹下で下大静脈より採血した血液を血清分離し、AST、ALT、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、総コレステロール (T-Cho)、中性脂肪 (TG) を測定した。

(4) **【肝組織検査】** 開腹し肝組織を取り出し、直ちに 10%ホルマリン (PBS) にて固定し、パラフィンに包埋した。4 μ m の剥切肝組織をヘマトキシリン&エオジン染色とシリウスレッド染色を行った。肝組織学的検査を行い、肝脂肪化、炎症の程度を判定的に評価した。

肝脂肪蓄積の程度は、0 = 5%以下、1 = 5-33%、2 = 33-66%、3 = 66%以上とした。肝実質の炎症の程度については、細胞浸潤による炎症巣を 100 倍の視野で観察し 0 = なし、1 = 1 か所、2 = 2-3 か所、3 = 4 か所以上とした。

(5) **【免疫組織学的検討】** パラフィン切片を脱パラフィンし、クエン酸バッファー中でオートクレーブ処理 (120°C、10 分) し抗原賦活化を行った。内在性ペルオキシダーゼ活性を阻害し、PBS にて洗浄し、スキムミルクにて非特異性反応をブロックした。1 次抗体として 100 倍希釈した、抗 TLR-2 抗体 (abcam:ab24192) または抗 TLR-4 抗体 (abcam:ab13556) にて 4°C の条件下で一晩静置した。PBS にて洗浄後、Histofine Simple Stain Mouse MAX-PO kit (Nichirei Corp., Tokyo, Japan) により、酵素抗体反応を行い、3,3'-diaminobenzidine (DAB) 発色を行った。

(6) **【In situ hybridization による検討】** マウス肝組織での TLR-2 と TLR-4 の発現を in situ hybridization にて調べた。Ribomap kit と discovery automatic staining module (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) を用い、説明書に従い行った。マウス肝を

4%paraformaldehyde (in PBS) で室温にて 3 日間固定した。連続した 8 μ m のスライスを作製し、脱パラフィン、スライドガラスへの固定、酸処理を行った。剥切肝を、1 μ g/ml の濃度の proteinase K 溶液で 25°C、5 分間消化し、80°C の PBS に入れ酵素を不活化させた。純水にて洗浄後、室温でスライド上にて hybridization を行った。Digoxigenin をラベルした antisense と sense の cRNA を in vitro transcription 法にて合成した。Hybridization は、antisense あるいは sense プローブ (10ng/slide) 存在のもと、Ribohybe hybridization solution にて 60°C 5 時間行った。

アルカリフォスファターゼをラベルした抗 digoxigenin 抗体 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) を用い、hybrids を検出した。hybridization のシグナルの検出は、暗室下で nitro blue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 4-toluidinium 塩を用い行った。

(7) **【マウスサイトカイン解析】** マウスサイトカイン抗体アレイ (RayBiotech Inc, Norcross, GA, USA) を用いサイトカイン解析を行った。説明書の指示に従い、アッセイを行った。Lysis buffer にて肝組織ホモジネートを作成した。解析に用いたサンプルの蛋白濃度を一定にするため、蛋白濃度を定量した。非特異性反応をブロックした後、マウス肝ホモジネート 500 μ l (蛋白量 1~1.5mg) を膜に載せた。一晩インキュベートした後、膜を洗浄した。ビオチンを結合させた一時抗体を 1:250 に希釈し、室温で 2 時間インキュベートした。十分洗浄し、膜をペルオキシダーゼと結合させた streptavidin と 30~60 分反応させた。十分膜を洗浄し、ペルオキシダーゼ検出基質と反応させ、X 線フィルム (Kodak

X-OMAT AR film) に感光させた。検出されたシグナルを Bio-Rad VersaDoc Imaging System 3000 にて定量し、Quantity One software (Bio-Rad) にて解析した。

(8) **【統計解析】**結果を平均±SD にて表した。統計学的解析は、unpaired sample に対する Student t test にて行った。2 グループ以上を含む研究では、ANOVA 解析を行った。

4. 研究成果

(1) **【肝における TLR-2、TLR-4 の発現の検討】**

通常食にて飼育した Wild type マウス肝における TLR-2、TLR-4 の発現を酵素抗体法にて調べた。TLR-2、TLR-4 ともに Kupffer 細胞や中心静脈周囲の肝細胞に散在性に発現していた。

また、in situ hybridization 法にて mRNA の発現を調べ、その特異性を確認した。酵素抗体法の結果と同様に、TLR-2 と TLR-4 は肝細胞や Kupffer 細胞に発現されていた。

内臓脂肪組織についても、TLR-2 と TLR-4 の発現を酵素抗体法と in situ hybridization にて調べたが、同組織に発現されていなかった。

(2) **【脂肪性肝炎発症・進展における TLR-2 と TLR-4 の役割の検討】**

通常食にて飼育した Wild type マウス、TLR-2(-/-) マウス、TLR-4(-/-) マウスとも何れの血液検査項目も差を認めなかった。Wild type マウスにおいて、MCD 食投与開始2週間より、血清中 AST と ALT の上昇を示した。MCD 投与開始後4週目には、コントロール群 (通常食飼育した wild type) に比べ有意な ALT と AST の上昇を認めた。(p<0.001)

MCD 食開始4週目、TLR-2(-/-)群の血清 AST と ALT 値は、Wild type 群に比べ、有意な上

昇を認めた。(P<0.01) これに対し、MCD 食を投与した TLR-4(-/-)群では、AST と ALT の上昇はなくコントロール群と同様であった。

ALP は、AST や ALT と同様に変化し、Wild type 群は、MCD 食投与開始4週目有意に上昇した。TLR-2(-/-)群は、Wild type 群に比べ有意に上昇した。(P<0.01) 一方、TLR-4(-/-)群は、Wild type 群に比べ有意に低下した。(P<0.001)。

MCD 食開始後、経時的に中性脂肪を調べた。コントロール群、Wild type 群、TLR-2(-/-)群、TLR-4(-/-)群とも有意差はなかった。一方、コレステロールは、MCD 食開始により Wild type 群と TLR-2(-/-)群においてコントロール群に比べ有意に上昇した。(各々P<0.001, P<0.01) TLR-4(-/-)群のコレステロール値は、wild type 群と同様であった。

肝組織像の検討では、MCD 食投与開始後、1週目では何れの群も脂肪沈着はなかった。2週目より、wild type 群は脂肪化が起こり、4週目に Wild type 群では、脂肪化と炎症細胞の浸潤が認められた。TLR-2(-/-)群は、Wild type 群に比べ著明に脂肪化と炎症細胞浸潤を認めた。また、TLR-4(-/-)群は、Wild type 群に比べ有意に脂肪化と炎症細胞浸潤を抑制した。

肝脂肪沈着と炎症の程度について、判定量的な組織学的評価を行った。脂肪沈着の程度は、wild type マウスに比べ TLR-2(-/-)群において著しかった(P<0.01)。TLR-4(-/-)群においては、ほとんど脂肪沈着を認めなかった(P<0.01)。肝の炎症の程度も、TLR-2(-/-)群において、wild type マウスより著しく(P<0.01)、TLR-4(-/-)群において軽微であった(P<0.01)。

(3) **【脂肪性肝炎発症に伴う TLR-2 と TLR-4 の発現の変化の検討】**

NAFLD 発症に TLR-2 と

TLR-4 がどの様に関わっているか調べるため、wild type マウスにおける MCD 食投与後の TLRs 発現の変化を調べた。免疫組織学的検査では MCD 食投与 2 週間目、TLR-2 の発現は中心静脈周囲や浸潤した炎症細胞で増加したのに対し、TLR-4 の発現はやや減少した。

また、MCD 食投与後 2 週間目の in situ hybridization では免疫組織学的検討と同様で mRNA レベルにても確認できた。

(4) 【肝におけるサイトカイン抗体アレイによる解析】 96 種類のサイトカイン抗体を載せた high-throughput protein chip を用い、wild type 群、TLR-2(-/-)群、TLR-4(-/-)群におけるサイトカイン産生の差を調べた。wild type 群を基準に各ノックアウトマウス群のサイトカイン発現の差を比較した。

MCD 投与前のサイトカイン発現に関し、Wild type 群、TLR-2(-/-)群、TLR-4(-/-)群において、サイトカイン発現に明らかな差はなかった。

次に、脂肪性肝炎を発症していない時期の MCD 食投与開始 1 週目に肝組織中のサイトカイン発現の差を調べた。Wild type 群に比べ TLR-2(-/-)群では、TSLP、IGFBP-2、MMP-2、Pro-MMP-9 の産生が著明に低下していた。また、IL-7、Osteoprotegerin、Osteopontin、I-TAC などの pro-inflammatory cytokines の発現が増大していた。

一方、TLR-4(-/-)群では、wild type 群に比べ IL-7、TNF- α 、Osteoprotegerin、Resistin、I-TAC、ICAM-1 などの pro-inflammatory cytokines の発現低下が認められた。また、IL-15、TSLP、Fc gammaR II B、IGFBP-2、MMP-2 の発現が、亢進していた。特に、TLR-4(-/-)マウスの IGFBP-2 は、TLR-2(-/-)に比べ最も発現に差を認めた。

(5) 【結論】 肝におけるサイトカイン産生の差異により、TLR-2 は脂肪性肝炎発症・進展を抑制し、TLR-4 は促進した。特に growth factor の効果を調節に関わる IGFBP-2 の変動は大きく、IGFBP-2 が NAFLD に対する新たなバイオマーカーや治療法になりうるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Ishii R, Togashi H (15名中2番), Okumoto K, et al. ^{99m}Tc-GSA SPECT analysis was clinically useful to evaluate the effect of interferon in a patient with interferon non-responsive chronic hepatitis C. Ann Nucl Med. 査読有. vol25, 2011, 520-523.
DOI:10.1007/s12149-011-0484-0
- ② Saito T, Okumoto K, Togashi H (14名中10番目), et al. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. Stem Cells Dev. 査読有. vol20, 2011, 1503-1509.
DOI:10.1089/scd.2011.0074
- ③ Haga H, Okumoto K, Togashi H (12名中11番目), et al. Enhance expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into the hepatocytes lineage. Cell Tissue Res. 査読有. vol343, 2011, 371-378.
DOI:10.1007/s00441-010-1093-2
- ④ Ito J, Okumoto K, Togashi H (15名中14番目), et al. A case of monocular blindness as the initial presentation of hepatocellular carcinoma with skull metastasis. Clin J Gastroenterol. 査読有. vol14, 2011, 273-277.
DOI:10.1007/s12328-011-0237-6
- ⑤ Togashi H. Time for liver injury and repair. Hepatol Res. 査読有. vol140, 2010, 1060-1062.
DOI:10.1111/j.1872-034X.2010.00738x
- ⑥ Hattori E, Okumoto K, Togashi H (11名中10番目), et al. Expression of RNA-binding protein Musashi1 in adult

- liver stem-cells. Hepatol Res. 査読有 . vol40, 2010, 432-437.
DOI:10.1111/j.1872-034X.2009.00612x
- ⑦ Sanjo M, Okumoto K, Togashi H (17名中10番目), et al. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. J Med Virol. vol182, 2010, 1364-1370.
DOI:10.1002/jmv.21818
- ⑧ Nishise Y, Okumoto K, Togashi H (15名中8番目), et al. Relationship between alcohol consumption and serum adiponectin levels: the Takahata study--a cross-sectional study of a healthy Japanese population. J Clin Endocrinol Metab. 査読有. vol195, 2010, 3828-3835.
DOI:10.1210/jc.2009-1862
- ⑨ Kamata M, Togashi H (7名中5番目), et al. Association study between the -1021C/T polymorphism of the dopamine-beta-hydroxylase gene promoter and personality traits in healthy subjects. Neurosci Lett. 査読有. vol462, 2009, 54-57.
DOI:10.1016/j.neulet.2009.06.077
- ⑩ Saito T, Okumoto K, Togashi H (14名中11番目), et al. Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. Metabolism. 査読有. vol58, 2009, 1067-1075.
DOI:10.1016/j.metabol.2009.03.008

[学会発表] (計 2 件)

- ① 早坂 真貴子、富樫 整、他. 過体重・肥満新入生における生活習慣病危険因子の横断的研究. 第48回全国大学保健管理研究集会. 2010年10月21日. 幕張メッセ (千葉市)
- ② 早坂 真貴子、富樫 整、他. 肥満学生における各種検査成績と食習慣の分析. 第47回全国大会保健管理研究集会. 2009年9月17日. 札幌コンベンションセンター (札幌市)

[図書] (計 1 件)

- ① 富樫 整、河田 純男. 改訂第7版内科学

書 (中山書店)、糖原病、尿素代謝異常、肝アミロイドーシス、肝脂質蓄積症、肝性ポルフィリン症、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠乏症、色素代謝異常、2009、275-280.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富樫 整 (TOGASHI HITOSHI)

山形大学・保健管理センター・教授

研究者番号：60192209

(2) 研究分担者

奥本 和夫 (OKUMOTO KAZUO)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00466608