

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790682

研究課題名（和文）脂肪性肝炎の病態形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体の役割

研究課題名（英文）Role of macrophage scavenger receptor A in the progression of dietary steatohepatitis in mice

研究代表者

藤井 英樹 (FUJII HIDEKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：20382070

研究成果の概要（和文）：マクロファージスカベンジャー受容体 A (MSR-A) ノックアウトマウスにメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食を投与し NASH を発症させた。MSR-A ノックアウトマウス群はコントロール群に比し肝内に誘導されるマクロファージ数が少なく、肝内の炎症性サイトカインの mRNA レベルも低下していた。更に、主な肝線維化関連遺伝子の mRNA レベルは低下し、膠原線維の量も低下していた。以上の結果より、MSR-A は炎症を調節することで肝線維化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Male MSR-A knockout (MSR-A<sup>-/-</sup>) mice and age-matched C57Bl/6J (MSR-A<sup>+/+</sup>) mice were fed either MCD diet or chow diet for 5 or 15 weeks. Inflammation and fibrosis were determined by tissue staining. Gene expressions were determined by quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR), respectively. MSR-A deficiency attenuated necroinflammatory reaction and macrophage accumulation, as indicated by histopathology and immunohistochemistry for F4/80, in mice fed the MCD diet. This condition reduced the hepatic expression of the proinflammatory genes, such as tumor necrosis factor- $\alpha$ , monocyte chemotactic protein 1, and macrophage colony stimulating factor and the profibrogenic genes, such as collagen type I alpha 1, collagen type III alpha 1,  $\alpha$ -smooth muscle actin, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and connective tissue growth factor. In addition, MSR-A deficiency significantly reduced collagen deposition in the livers. These results indicate that MSR-A contributes to the augmentation of hepatic inflammation and fibrosis in the mouse model of steatohepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：肝臓、炎症、線維化、メチオニン、コリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 非飲酒者であるにも関わらずアルコール性肝障害に類似した肝障害を呈する疾患を非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) と呼ぶ。我が国では、検診受診者の 20～30%が脂肪肝で、約 8%が NAFLD と推測されている。又、NAFLD の進行型で、脂肪化に加え炎症細胞浸潤、線維化を認める疾患を Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) と呼ぶ。日本人の NASH 人口は約 100 万人と推測されるが、肝硬変、肝癌を合併しうるため、早急な病態の解明と治療法の確立が急務である。しかし、NASH の病態進展のメカニズムは不明であり、NASH の特異的な治療法は全く存在しないのが現状である。

(2) NAFLD/NASH の病態を明らかにし、新規治療法を開発する上で、動物モデルを用いた研究は必要不可欠である。最近、申請者らはウサギに高コレステロール食を与えることで脂肪性肝炎を発症するモデルを報告した (Otogawa K, et al. *Am J Pathol.* 2007;170:967-80)。本モデルにおいて、①高コレステロール食により赤血球膜が変性する、②変性赤血球をマクロファージが貪食する、③マクロファージは鉄沈着に伴い活性化し、炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1 等) を産生し炎症反応が進展する、という新たな仮説を提唱した。一方、申請者はマウスを用いた NAFLD/NASH モデルの作成を試みた (科学研究費補助金 若手研究 (B) 平成 17～18 年度課題番号 17790463)。しかしながら、マウスはウサギに比し脂質の代謝回転が速く、高脂肪食を長期にわたり投与しても単純

性脂肪肝しか生じない。

(3) MSR-A (CD204) は分子量 77 kDa のサブユニットのホモ三量体からなる 220-240 kDa の膜蛋白で、粥状硬化におけるマクロファージの泡沫化のみならず生体防御や種々の炎症におけるマクロファージの機能に深く関与している。MSR-A ノックアウトマウスは、Suzuki らにより 1997 年に初めて報告された。マウスの発育や成長は正常であるが、腹腔マクロファージによる酸化 LDL、アセチル LDL 等の取り込みが低下する (Suzuki H et, al. *Nature* 1997; 386:292-6.)。申請者は、MSR-A ノックアウトマウスおよびコントロールマウスにメチオニン・コリン欠乏 (MCD) 食を投与し肝線維化の程度を比較したところ、MSR-A ノックアウトマウスにおいて肝の線維化が有意に抑制されることを予備実験で見出した。

## 2. 研究の目的

NASH の病態形成におけるマクロファージスカベンジャー受容体 A (MSR-A) の役割を明らかにする目的で MSR-A ノックアウトマウスに NASH を発症させる動物モデルを作成し、病態を解析・検討した。

## 3. 研究の方法

MSR-A ノックアウトマウスおよびコントロールマウス (各群 n=6) に MCD 食を投与し NASH を発症させ、両群間の脂肪化、炎症、線維化の程度の差異を組織レベル、蛋白レベル、および遺伝子レベルで比較検討した。食事のコントロールとしては通常食を用いた。

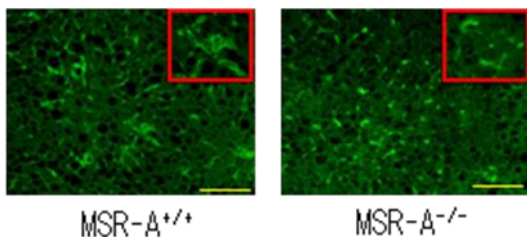
## 4. 研究成果

### (1) 肝脂肪化

MCD 投与開始 5 週間後の肝組織の肝脂肪化の程度を評価した。半定量化は NAFLD activity score (NAS) に準じた (Hepatology 2005;41:1313)。MSR-A ノックアウトマウス群では有意に脂肪化が抑制されていた(コントロール V.S. ノックアウト  $2.2 \pm 0.41$  vs  $1.2 \pm 0.41$ )。

### (2) 炎症、マクロファージ浸潤

MCD 投与開始 5 週間後の肝組織を NAS システムで解析した。炎症細胞浸潤: コントロール V.S. ノックアウト  $2.0 \pm 0.63$  vs  $1.5 \pm 0.84$ 、風船化肝細胞: コントロール V.S. ノックアウト  $0.67 \pm 0.52$  vs  $0.17 \pm 0.41$  とこれら 2 項目では有意な軽快を認めなかったが、NASH の病勢の指標である NAS score はコントロール V.S. ノックアウト  $4.8 \pm 0.98$  vs  $3.0 \pm 1.1$  であり有意に低下していた。マクロファージのマーカーである F4/80 の面積染色を行ったところ、同抗体陽性領域の面積はコントロール V.S. ノックアウト  $3.58 \pm 0.71\%$  vs  $2.31 \pm 0.61\%$  と MSR-A ノックアウト群で有意に低下していた(図 1)。これらのデータから、MSR-A をノックアウトすると NASH の炎症時に肝内に流入するマクロファージの個数が減少し、病勢が軽快すると思われた。



(図 1) F4/80 の蛍光免疫染色 (MCD5 週)

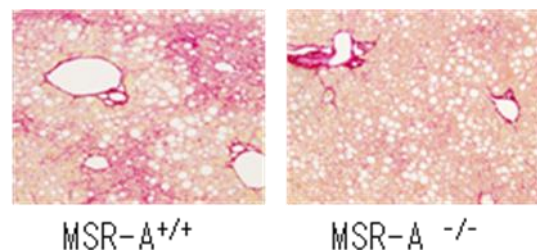
### (3) 炎症性サイトカイン

MCD 投与開始 5 週間後の肝組織より mRNA を抽出し、Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、

Monocyte chemotactic protein (MCP)-1、及び Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) の mRNA レベルを検討したところ、コントロール群に比しノックアウトマウス群でそれぞれ 53%、48%、38%といずれも有意に低下していた。

### (4) 肝線維化

MCD 投与開始 15 週間後の肝組織中の collagen type I alpha 1 (Col1a1), collagen type III alpha 1 (Col3a1),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2), 及び connective tissue growth factor (CTGF) の mRNA レベルはコントロール群に比しノックアウト群でそれぞれ 71%、47%、33%、39%、57%といずれも有意に低下していた。更に、肝内の膠原線維を Azan 染色および Sirius red 染色で染色し、面積測定ソフトを用いて陽性領域を定量化したところ、コントロール群に比しノックアウトマウス群では Azan 染色で 36%、Sirius red 染色で 64%と有意に低下していた(図 2)。



(図 2) Sirius red 染色 (MCD15 週)

### (5) 結論

MSR-A は NASH における肝臓の炎症や線維化の調節に関与している可能性がある。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

①Hideki Fujii

The 9th JSH Single Topic Conference "NASH  
2010 "

Role of Macrophage Scavenger Receptor A  
in Hepatic Fibrogenesis of an Animal NASH  
Model

November 18-19, 2010

Tokyo, Japan

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 英樹 (FUJII HIDEKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：20382070

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし