

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11595

研究課題名(和文) FoxO3による非アルコール性脂肪肝炎抑制機構の解明

研究課題名(英文) A mechanism underlying the inhibition of steatohepatitis via FoxO3

研究代表者

小松 利光 (Komatsu, Toshimitsu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・技術職員

研究者番号：70380962

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)：肝細胞特異的Foxo3欠失マウス(LKO)は脂肪肝に進行するが、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)には進展しない。本研究では、マクロファージ特異的Foxo3欠失マウスとLKOマウスを交配したダブルコンディショナル欠失マウス(dckO)でNASH誘導を試みた。高脂肪食(HFD)を与えた群では線維化が進行し、dckOマウスでは肝臓がんの発生も観察された。別の実験では、NASHを誘導するためにGAN飼料を与え、LKOマウスに線維化の進行と血漿線維化マーカーの有意な増加が見られた。マクロファージ、肝臓でのFoxo3欠失はNASH進行を促進し、線維化を悪化させる一因と推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肝細胞と免疫細胞でのFoxo3欠失は、通常食飼育下ではNASH化を誘導しないが、高脂肪食によりNASH化が早期に進行し、がん化する可能性があることを示した。さらに、肝細胞におけるFoxo3欠失がNASHの進行を促進し、SREBP機能の低下がその一因である可能性が示唆された。脂肪肝炎の予防や治療戦略にFoxo3を標的とした研究は少ないため、今回のFoxo3が脂肪肝からNASHへの進行に抑制的に関与していることを示した成果は、NASHの進行メカニズムに対する知見を深める上で、また、将来的な治療標的としても学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Hepatocyte-specific Foxo3-deficient (LKO) mice progress to fatty liver but not to non-alcoholic steatohepatitis (NASH). In this study, we attempted to induce NASH in double-conditional deficient (dckO) mice, a cross between macrophage-specific Foxo3-deficient and LKO mice. Fibrosis progressed in the group fed a high-fat diet (HFD), and the development of liver cancer was also observed in dckO mice. In another experiment, a GAN diet was fed to induce NASH, and progressive fibrosis and a significant increase in plasma fibrosis markers were observed in LKO mice. Foxo3 deficiency in macrophages and liver was inferred to be a contributing factor in promoting NASH progression and exacerbating fibrosis.

研究分野：基礎老化学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎 Foxo3 線維化

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満に伴う非アルコール性脂肪肝、脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬変、これらを基盤とした肝細胞癌の発生頻度は、世界的に増加している。日本でも、全人口の約 17.9%が脂肪肝、3%が NASH であると推定されている (Younossi Z et al. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2018)。有病率の大きな差は、脂肪肝が必ずしも NASH に進行するわけではないことも示している。脂肪肝から NASH への進展を抑制する機構を明らかにすることで、新たな NASH 予防、治療法開発へ繋がると考えた。

(2) 過栄養による代謝ストレスが中高齢者の老化や疾病の発症に大きく関わっている。一方、適度なカロリー制限 (CR) は動物の健康寿命が延伸する (CR の抗老化効果)。我々は、全身性 *Foxo3* 遺伝子半欠失マウスモデルを用いて、CR の抗老化効果に *Foxo3* が必須であることを報告した (Shimokawa I, et al. Aging Cell 2015)。また近年、細胞レベルの慢性的で軽微な炎症ストレスが、老化や関連疾患の進行を促進することが指摘されている。我々が作出した肝細胞特異的 *Foxo3* 欠失マウスを長期飼育すると、肝臓における脂肪合成が促進され、脂肪肝が起きるとともに、体内の脂肪沈着、エネルギー代謝の低下、インスリン抵抗性が惹起されたが、肝小葉の炎症細胞浸潤やサイトカインの発現に有意差がなかった (未発表データ)。これは *Foxo3* が加齢に伴う肥満と代謝異常を抑制していることを示唆したが、同時に脂肪肝や代謝異常だけでは NASH に進行しないことも示している。この結果は、NASH の発症に肝細胞以外の非実質細胞、つまりマクロファージの活性化や老化細胞の増加が重要であるとする先行研究 (Xiong X et al., Mol Cell 2019; Omori S et al., Cell Metab 2020) と一致した。これらのことから、本研究では、*Foxo3* は脂肪肝から NASH へ進行する過程に関与する Kupffer 細胞/マクロファージの活性化を抑制しているか検証する実験を行った。

2. 研究の目的

細胞特異的 *Foxo3* 遺伝子欠失マウスを用いて、老化遅延・寿命延伸に関与する *Foxo3* 転写因子が、肝細胞においては脂肪合成を抑制し、Kupffer 細胞/マクロファージにおいては、インフラマソーム活性化を阻害することにより、脂肪肝から NASH への進展を抑制するか検証する。

3. 研究の方法

実験動物

細胞特異的遺伝子欠失マウスの作出には Cre-loxP システムを用いた。実験には全て雄マウスを使用した。

それぞれ Alb-cre ノックインマウス、LysM-cre ノックインマウスと *Foxo3*-flox マウスの交配から作出して維持している肝細胞特異的 *Foxo3* 欠失マウス [LKO] (*Alb*, *Foxo3*^{fl}; +/w, +/+) とマクロファージ特異的 *Foxo3* 欠失マウス [LysmKO] (*Lysm*, *Foxo3*^{fl}; +/w, +/+) を交配することにより、肝細胞、マクロファージ特異的 *Foxo3* 欠失マウス (*Alb*, *Lysm*, *Foxo3*^{fl}; +/w, +/w, +/+, double conditional KO マウス [dcKO]) を作出した。

実験 1

対照群 flox マウス (Cnt)、dcKO マウスを作製し、通常飼料 (RD) で 12 ヶ月以上飼育した。経時的に摂食量、体重を計測し、外見の変化を観察した。55 週齢からは NASH 発症を促進するため、

各群4匹を高脂肪食(HFD)に変更して飼育し比較した。80週齢で安楽死させ、HE染色、シリウスレッド染色で組織学的評価を行い、オールインワン蛍光顕微鏡で取り込み後に染色面積を測定した。

実験2

肝細胞特異的Foxo3欠失マウス[LKO]マウスにGAN飼料(高脂肪・高コレステロール・フルクトース)を与えて人工的にNASH化誘導する実験群(対照群floxマウス、LKOマウス)を作製し、12週齢からそれぞれ通常食(RD)群とNASH誘導食(GAN; 高脂肪+フルクトース+コレステロール添加)群に分けて飼育した。飼育中は摂食量、体重変化を測定し、33週齢、44~50週齢で安楽死させ、血漿、臓器を採取し、実験1と同様の検証を行った。線維化、炎症関連遺伝子群の発現変化を捉えるためリアルタイムPCRで定量した。

4. 研究成果

実験1; 肝細胞と免疫細胞でのFoxo3の欠失は、高脂肪食飼育下においてがん化を促進する可能性がある

(1)-①; 通常食飼育ではdcKOマウスはNASH化しない

dcKOマウスを通常食(RD)で80週齢まで飼育した結果、予測と異なりdcKOマウスの体重が対照群(Cnt)と比較して有意に低かった。摂食量には有意な差はなかった。HE染色による肝臓の形態観察では、両群共に顕著な脂肪滴の蓄積、線維化は観察されなかった。肝臓、白色脂肪組織の重量は、dcKOマウスで低い傾向はあったが、統計的有意差は無かった。これらの結果から、肝細胞とマクロファージでのFoxo3欠失は通常飼育下ではNASH化を誘導しないことが示された。

(1)-②; 高脂肪食負荷と免疫、肝細胞でのFoxo3欠失の影響

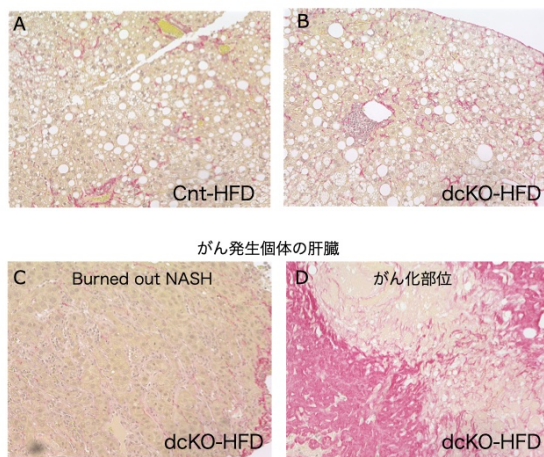


図1.高脂肪食負荷による線維化の比較

52週齢までにNASH化の明確な兆候が確認できなかったことから、線維化誘導負荷をかけるため55週齢から一部マウスの食餌を高脂肪食(HFD)に変更して6ヶ月間飼育した。dcKO-HFD群の摂食量は対照群(Cnt-HFD)と比べて有意差はなかったが、通常食の場合と同様に体重が有意に低く推移した。80週齢ではdcKO-HFD群の腎周囲白色脂肪、褐色脂肪重量が対照群と比較して有意に減少していた。両群の肝臓で脂肪滴の顕著な蓄積が見られ、繊維化の進行も確認された(図1A, B)。また、dcKO-HFD群の50%(2/4匹)で肉眼的に肝がんが認められ、一個

体は脂肪滴が極度に少なく、顕著ながん進行が認められたことから、Burned-out NASH化したと考えられる(図1C, D)。がん組織を除外した場合のdcKO群の線維化の程度は、対照群と比較して有意差がなく、血漿AST、ALT濃度も有意差は検出されなかった。これらのことから、dcKO-HFD群ではNASH化が予測よりも早く進行し、線維化の差を捉える前になんか化した可能性がある。

実験2 肝細胞における Foxo3 欠失は、NASH の進行を促進する

(2)-① ; NASH 化誘導飼料 (GAN) 21 週経過

GAN 飼料を与えたマウスは、RD 群と比較して体重、脂肪重量が有意に高く、肝臓への脂肪滴の沈着及び線維化が観察された。LKO-GAN マウスの体重、摂食量、肝臓および白色脂肪重量は Cnt-GAN マウスと比較して有意差はないが高い傾向にあった。血漿 AST、ALT、AST/ALT 比、総コレステロール濃度は LKO マウスで高い傾向にあったが統計的有意差はなく、シリウスレッド染色、線維化指標である血漿 Mac-2bp 濃度にも有意差はなかった。

(2)-② ; NASH 化誘導飼料 (GAN) 33~38 週経過

LKO マウスの体重、摂食量は、Cnt マウスと比較して有意差はなかった。肉眼的に肝臓がんと見られる所見が Cnt マウスで 2 例 (2/12 匹、16.7%)、LKO マウスで 1 例 (1/8 匹、12.5%) 観察されたが、発生に差はなかった。シリウスレッド染色の結果、LKO マウスの線維化が有意に進行しており

(図 2A&B)、血中線維化マーカー Mac-2bp も LKO マウスで有意に高く、シリウスレッド染色の結果と一致した (図 2C)。線維化関連遺伝子 Col1a1 は LKO マウスで高い傾向にあったが統計的有意差はなかった (図 3A)。興味深いことに、炎症性サイトカイン IL1 β 、Foxo3 の標的遺伝子でもあり脂肪酸代謝を制御する Srebp1c 遺伝子の発現が LKO

マウスで有意に減少し、コレステロール合成律速酵素である Hmgcr 遺伝子の発現が有意に増加した (図 3B-D)。最近の研究では、NASH 化が進行・悪化した burned-out NASH と呼ばれる病態

では SREBP 機能が低下し、リン脂質の構成が変化することで生体膜の流動性を低下させて ER ストレスが増加し、線維化を悪化させることが報告されている (Kawamura S, et al., JCI, 2022)。この報告と併せて考えると、LKO マウスで観察された線維化の進展は、Foxo3 欠失により Srebp1c 遺伝子発現量が減少し、SREBP 機能が低下したことが一因である可能性がある。

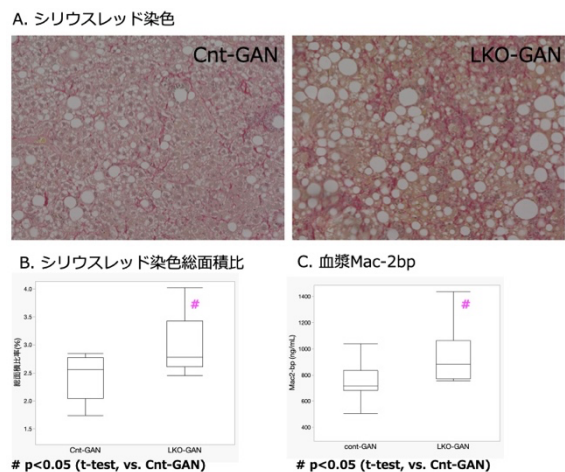


図 2. LKOマウスのNASH化がより進行している

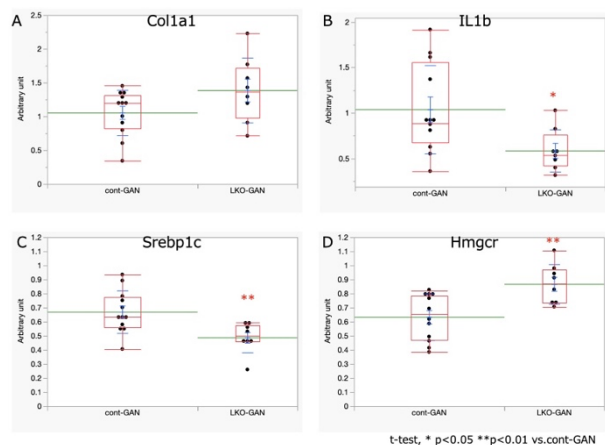


図 3. 肝臓における線維化関連遺伝子、サイトカイン、脂質合成系遺伝子の発現変化

まとめと展望

本研究の期間中に、肝細胞・マクロファージ特異的 Foxo3 欠失マウス (dcK0) を作製し、NASH に至るか評価した。当初の予測と異なり通常食飼育下では NASH 化しなかったが、高脂肪食 (HFD) 飼育に切り替えると脂肪滴沈着・線維化し、dcK0 マウスの 50% でがんを発症した。一方、肝細胞特異的 Foxo3KO マウス (LKO) に NASH 化誘導飼料 (GAN) を与えた試験では、LKO マウスの線維化がより進行したが、がんの発症率に有意差はなかった。飼料条件は異なるが、マクロファージでも Foxo3 を欠失した dcK0 マウスでがん化が進行したことから、NASH の悪化に対してマクロファージでの Foxo3 が抑制的に機能すると考えられる。現在、実験条件を再検討した解析を予定している。また、LKO マウスでの Srebp1c 遺伝子発現低下と線維化の進行は、burned-out NASH 化で観察される変動と一致し、dcK0 マウスで burned-out NASH が観察されたことも併せると、

Foxo3 が NASH 化に対する抑制的機能を有していることを示した。今後はこれらのモデルマウスを使用してシングルセル解析を行い、発症に関与する特異な細胞集団の特定、活性化機構の制御、他細胞との相互作用について明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下川 功、小松 利光、朴 盛俊、森 亮一
2. 発表標題 肝臓のFoxO3は加齢に伴う全身のエネルギー代謝とインスリン抵抗性を制御する
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会 名古屋国際会議場
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・医療科学専攻・長崎大学医学部病理学・病理学分野 https://www.med.nagasaki-u.ac.jp/pathlgy1/

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
研究協力者	下川 功 (Shimokawa Isao) (70187475)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員 (17301)	

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
---------	---------