

## 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 25年 4月 28日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590714

研究課題名（和文） 非アルコール性脂肪肝炎発症における自然免疫機構の解明 -新規治療法の開発に向けて

研究課題名（英文） Innate immunity and non-alcoholic steatohepatitis. A study for developing new immunologic therapy.

研究代表者 三浦 光一（MIURA KOICHI）

秋田大学・医学部・講師

研究者番号：90375238

## 研究成果の概要（和文）：

非アルコール性脂肪性肝炎(以下NASH)はメタボリック症候群の肝臓での表現型とされる。現在、NASHに対する有効な治療法はなく、分子メカニズムに基づいた新規治療法の開発が求められている。我々はメタボリック症候群に伴う自然免疫の異常、特に細菌構成成分を認識する受容体Toll-like receptor(以下TLR)がNASH発症や進展に関与しているとの仮説を立て、コリン欠乏食によるNASH動物モデルを用いて研究を行った。遺伝子改変マウス(以下KOマウス)を用いた結果から、TLR2, TLR4, TLR9はNASHに促進的に作用することが判明した。また炎症性サイトカインはTLRの下流に位置する分子であるが、NASHでは各種炎症性サイトカインが増加した。TLR2 KO, TLR4 KO, TLR9 KOの各KOマウスではNASHの軽減と共に、炎症性サイトカインの低下を認め、特にIL-1 $\beta$ の低下は共通した所見であった。実際、IL-1R KOマウスでもNASHの改善を認めた。またこれらTLR KOマウスに共通するのは炎症性サイトカインの低下とともに、炎症細胞浸潤の軽減であり、これら細胞の一部はLy6c陽性の骨髄由来マクロファージであることが判明した。それら炎症性細胞の誘導に重要な役割を果たすケモカインMCP-1とその受容体CCR2はNASH動物モデルでは増加していた。そこでCCR2 KOマウスにNASH誘導食であるコリン欠乏食を投与したが、NASHの進展は軽微であった。さらにコリン欠乏食長期投与でNASHを完成させた状態で、CCR2阻害剤を投与したところNASHの改善が認められた。これらの成果は現在までに計7本の論文として受理されていることから注目度の高い研究と考えられ、今後治療応用へ向けた研究へ発展させる予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a hepatic manifestation of metabolic syndrome. Currently, no effective treatment for NASH is available due to its complex mechanism. We hypothesized that altered immune response by TLR ligands causes excess lipid accumulation and inflammation in the liver. Thus, we used gene-modified mice including TLR2 KO, TLR4 KO, and TLR9 KO mice to determine the role of TLRs in CDAA-induced NASH. We also examined mice deficiency in CCR2, a chemokine receptor for MCP-1. Compared to WT mice, TLR2 KO, TLR4 KO, and TLR9 KO mice showed less steatosis, inflammation and fibrosis. Several pro-inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$  were decreased in these gene-modified mice. IL-1R KO mice demonstrated lesser grades of NASH. Infiltration of inflammatory cells including macrophages was attenuated in these KO mice. A part of infiltrated macrophages were derived from bone marrow and showed inflammatory phenotype. CCR2 KO mice showed less inflammation and fibrosis. By preventing macrophage recruitment using CCR2 inhibitor, NASH was ameliorated. These results demonstrate that TLR ligands and its target macrophages play key roles in the development of NASH. Pro-inflammatory cytokines released from macrophages contribute to inflammation and promote to the progression of NASH. We will extend these experiments to develop novel immunologic therapy for NASH. To date, seven papers on NASH were accepted to scientific journals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の原因は多岐にわたる。原因の一つに腸内細菌叢とそれ由来する細菌産物の関与が示唆されているが、それを裏付ける十分な証拠がない。また NASH では肝細胞に蓄積する脂肪が注目されているが、他の細胞の役割は不明な点が多い。

2. 研究の目的

NASH 発症および進展における腸内細菌産物とそれに対する受容体(Toll-like receptor)の役割を明らかにする。さらにマクロファージの誘導に関与するケモカイン受容体 CCR2の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスに NASH 誘導食を負荷して、NASH 評価し、WT マウスと比較検討した。

4. 研究成果

細菌由来 DNA やグラム陽性菌壁成分に対する受容体はそれぞれ TLR9 および TLR2 であるが、TLR9 や TLR2 が欠損するマウスでは NASH が軽減された。組織ではマクロファージの浸潤が著明な抑制された。またマクロファージの誘導に関わる受容体 CCR2 も欠損すると NASH が軽減した。その際炎症性サイトカインの発現が低下した。このことから TLR および CCR2 は NASH の進展に重要であり、腸内細菌由来の細菌産物が NASH の増悪因子となり、またマクロファージが重要な役割を演じていると考えられた。

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 7 件)

1. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes

steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. 2010;139(1):323-34.

2. Miura K, Seki E, Ohnishi H, Brenner DA. Role of toll-like receptors and their downstream molecules in the development of nonalcoholic Fatty liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;2010:362847.
3. Brenner DA, Seki E, Taura K, Kisseleva T, Deminici S, Iwaisako K, Inokuchi S, Schnabl B, Oesterreicher CH, Paik YH, Miura K, Kodama Y. Non-alcoholic steatohepatitis-induced fibrosis: Toll-like receptors, reactive oxygen species and Jun N-terminal kinase. *Hepatol Res*. 2011;41:683-6.
4. Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M. Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *FASEB J*. 2011 ; 25: 1133-44
5. Miura K, Yang L, van Rooijen N, Ohnishi H, Seki E. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 ;302:G1310-21.

- 6) Miura K and Ohnishi H. Nonalcoholic fatty liver disease: from lipid profile to treatment. Clin J Gastroenterol 2012; 5 313-21
- 7) Miura K, Yang L, van Rooijen N, Brenner DA, Ohnishi H, Seki E. Toll-like receptor 2 and palmitic acid cooperatively contribute to the development of nonalcoholic steatohepatitis through inflammasome activation in mice. **Hepatology**. 2013;57:577-89.

[学会発表] (計 16 件)

- 1) 三浦光一, 石亦宏, 大西洋英. NASH 進展における腸内細菌叢と肝自然免疫の役割 (ワークショップ). 2010 年 4 月、第 96 回日本消化器病学会総会, 新潟
- 2) Miura K, Inokuchi S, Ohnishi H, Brenner DA, Seki E. Toll-like Receptor (TLR) 2 in Kupffer cells plays a crucial role in the development of steatohepatitis in mice. (Oral presentation), 2010 年 5 月, New Orleans, USA
- 3) 三浦光一, 田浦康二郎, 大西洋英. マウス肝線維化における肝細胞の上皮間葉移行の関与 (優秀演題) 2010 年 5 月、第 46 回日本肝臓学会, 山形
- 4) 三浦光一, 石亦宏, 大西洋英. NASH 発症における耐糖能異常と Toll 様受容体の役割 (シンポジウム) 2010 年 10 月, JDDW2010, 横浜
- 5) 三浦光一, 石亦宏, 大西洋英. NASH 進展におけるケモカイン様受容体 CCR2 の役割 (ポスター) 2010 年 10 月, JDDW2010, 横浜
- 6) Miura K, Seki E, Brenner DA, Ohnishi H. MCP-1 and CCR2 contribute to the development of NASH in mice. 2010 年 11 月, The 9 th JSH Single Topic Conference. 東京
- 7) Miura K, Ohnishi H, Brenner DA, Seki E. CCR2 promotes the progression of NASH in mice. (Oral presentation), 2011 年 5 月, Chicago, USA
- 8) 三浦光一, 大西洋英. NASH 動物モデルとしてのコリン欠乏食の有用性(ミニシンポジウム) 2011 年 5 月, 第 97 回日本消化

器病学会総会, 東京

- 9) 三浦光一, 石亦宏, 大西洋英. NASH 進展における Toll-like receptor 2 および Kupffer cell の役割 (ワークショップ) 2011 年 6 月、第 47 回日本肝臓学会, 東京
- 10) 三浦光一, 大西洋英. 肝非実質細胞の役割を中心に据えた NASH 発症のメカニズム(シンポジウム) 2011 年 10 月, JDDW 2011, 福岡
- 11) 三浦光一, 石亦宏, 大西洋英. NASH 進展における自然免疫の役割(シンポジウム) 2011 年 10 月, JDDW 2011, 福岡
- 12) 三浦光一, 大西洋英. マクロファージをターゲットにした肝線維化抑制の試み -NASH モデルでの検討- 2012 年 4 月、第 98 回日本消化器病学会、東京
- 13) 三浦光一, 大西洋英. 遊離脂肪酸によるインフラマゾーム活性化と NASH 進展への役割. 2012 年 6 月, 第 48 回日本肝臓学会、金沢、
- 14) Kouichi Miura, Hirohide Ohnishi, Ekihiro Seki. Palmitic acid contributes to the progress of nonalcoholic steatohepatitis by activating inflammasome. (oral presentation) DDW, 2012 年 5 月, San Diego, USA.
- 15) 三浦光一, 石亦宏, 大嶋重敏, 後藤隆, 大西洋英. NASH におけるマクロファージのリクルートと TLR-MCP1-CCR2 の役割. JDDW2012, 2012 年 10 月、神戸
- 16) 三浦光一, 大嶋重敏, 大西洋英. 炎症抑制にフォーカスをあてた肝線維化改善の試み, 2012 年 12 月、第 39 回日本肝臓学会東部会、東京

[図書] (計 1 件)

1. 三浦光一, 大西洋英 (2011) NASH 発症および進展における腸内細菌と肝自然免疫の役割. 消化器内科 52:499-505

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三浦 光一 (MIURA KOICHI)  
秋田大学・医学部・講師  
研究者番号：90375238

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：