

## 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 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890052

研究課題名（和文） NASHにおけるマクロファージの病態生理的意義に関する検討—新規モデルを用いて

研究課題名（英文） Pathophysiological role of macrophages in development of NASH

研究代表者

伊藤 美智子 (ITO MICHIKO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・寄附研究部門教員

研究者番号：00581860

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は肝硬変・肝癌に進展する病態として注目されているが、従来、肥満と NASH 様肝病変を併せ持つ動物モデルが存在しないことが問題となっていた。申請者らはメラノコルチン 4 型受容体欠損マウスに対する高脂肪食負荷によって、脂肪肝から肝線維化を経て肝細胞癌を発症するマウスモデルを確立した。本モデルを用いた解析により、NASH の病態形成過程におけるマクロファージの分布と機能に変化が起きていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is considered a hepatic phenotype of metabolic syndrome and at high risk for the progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The molecular mechanisms are still unclear partly because of no appropriate animal models that reflect a liver condition similar to human NASH. In this study, we showed that MC4R-KO mice on a high-fat diet would provide a novel mouse model of NASH with which to investigate the sequence of events that comprise diet-induced hepatic steatosis, liver fibrosis, and hepatocellular carcinoma. Using this mouse model, we found changes in macrophage distribution and function during the course of NASH development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1230000	369000	1599000
2011年度	1130000	339000	1469000
年度			
年度			
年度			
総計	2360000	708000	3068000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：NASH、肝細胞癌、肥満、慢性炎症、マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームの基盤病態として慢性炎症が注目されており、特に、メタボリックシンドロームの発症・進展におけるマクロファージの病態生理的意義が明らかになりつつある。一方、非アルコール性脂肪

性肝炎（NASH: non-alcoholic steatohepatitis）はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられ、実質細胞である肝細胞とマクロファージを含む免疫担当細胞や線維芽細胞などの間質細胞との相互作用が病態の発症・進展に関与する。

しかしながら、従来、メタボリックシンドロームの病態と NASH 様の肝病変を併せ持つ動物モデルが存在しなかったため、NASH の発症・進展における各細胞群の相互作用の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

申請者らは、摂食調節に関与するメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R: melanocortin 4 receptor) を欠損するマウス (MC4R-KO) に対する高脂肪食負荷により、肥満、インスリン抵抗性といったヒト肥満症患者と共通の表現型とともに、NASH 様肝病変を発症することを見いだした。本研究では、MC4R-KO の NASH モデルとしての有用性を検証し、さらに NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義を明らかにする目的で検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) MC4R-KO における肝病変の進展

#### ① NASH 様病変発症過程の経時的解析：

NASH 様病変が形成される過程を詳細に検討するため、高脂肪食負荷 1, 4, 8, 16, 20 週にサンプリングを行い、肝臓の組織学的解析 (HE 染色、Sirius red 染色) および遺伝子発現 (リアルタイム PCR 法) 解析を行った。

② MC4R-KO に対する長期間高脂肪食負荷：高脂肪食負荷を 1 年間行い、NASH 様病変からの進展を組織学的解析 (HE 染色、Sirius red 染色、AFP 染色) によって評価した。

### (2) NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義

#### ③ マクロファージの組織学的解析：

MC4R-KO および野生型マウスに対して 20 週間の高脂肪食負荷を行い、MC4R-KO が NASH 様肝病変を発症していることを HE 染色および Sirius red 染色によって確認し、マクロファージマーカーである F4/80 の免疫染色を行った。

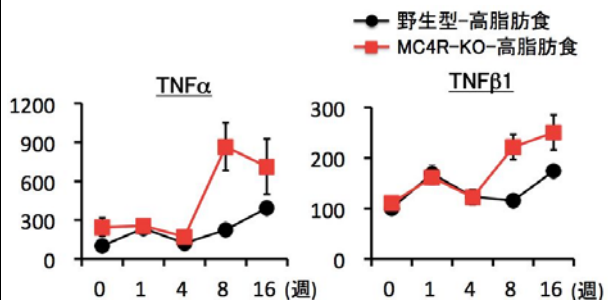
④ クロドロネートリポソームを用いたマクロファージ消去実験：鶏卵由来ホスファチジルコリンとコレステロールを用いて脂質フィルムを作成し、クロドロネート含有リポソームを作成した。20 週間高脂肪食負荷を行った MC4R-KO および野生型マウスに対してクロドロネートリポソームを静脈内投与した。3 日おきに 2 回投与し、1 週間マクロファージを消失させた後、サンプリングを行い、肝臓の組織学的解析と遺伝子発現を検討した。

## 4. 研究成果

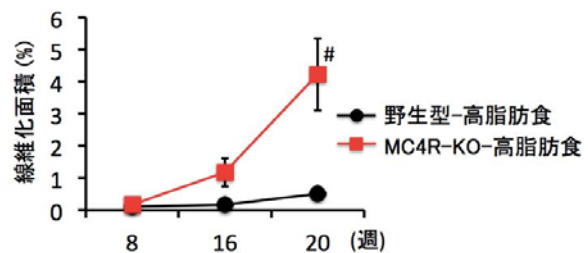
### (1) MC4R-KO における肝病変の進展

① NASH 様病変発症過程の経時的解析：野生型マウスでは負荷 16 週以降に肝脂質蓄積の増加と炎症・線維化マーカーの発現が増加したが、MC4R-KO では負荷 4 週から肝臓への著しい脂質蓄積が認められ、負荷 8 週において炎症性マーカー (TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ) と線維化マーカー (TGF $\beta$ 1: transforming growth factor  $\beta$ 1) の発現増加が認められた (図 1)。組織学的解析では、野生型マウスでは負荷 20 週においても単純性脂肪肝の所見のみであるのに対し、MC4R-KO では負荷 8 週で炎症細胞浸潤・肝細胞風船様変性、負荷 16 週で線維化形成が明らかとなり、負荷 20 週ではより線維化面積が増加した (図 2)。

以上より、MC4R-KO マウスは脂肪肝から肝線維化への進展過程を経時的に解析可能なモデルであることが明らかとなった。



(図1) 肝遺伝子発現の経時的変化



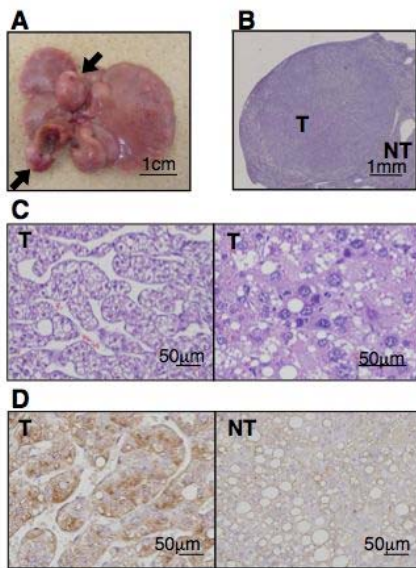
(図2) 肝線維化レベルの変化

② MC4R-KO に対する長期間高脂肪食負荷：1 年間の長期間にわたって高脂肪食負荷を行うと、野生型マウスの肝臓においても炎症性細胞浸潤、肝細胞風船様変性が散見され、軽度の線維化が認められた。一方、MC4R-KO ではさらに顕著な炎症性細胞浸潤、肝細胞風船様変性が認められ、線維化面積の増加とともに架橋形成に近い所見も認められた。

さらに、MC4R-KO では検討をおこなった全個体 ( $n=5$ ) に腫瘍形成を認め、HE 染色にて圧排性の増殖と被膜形成を認めた (図 3)。

腫瘍内部の細胞では核/細胞質比の増大、核の大小不同、脂質蓄積を認め、これらの細胞が不規則な索状構造を取り、正常な脈管構造は消失していた。さらに、肝細胞癌マーカーである AFP が陽性であり、高分化型肝細胞癌に一致する所見であった (図 3)。一方、野生型マウスでは同様の変化は認められなかった。

これまで肝細胞癌を発症する遺伝子改変マウスの報告はあるが、肥満・インスリン抵抗性を伴うものはなく、MC4R-KO マウスは肥満の表現型とともに、肝線維化から肝細胞癌へと進展する全く新しいマウスモデルであると考えられた。



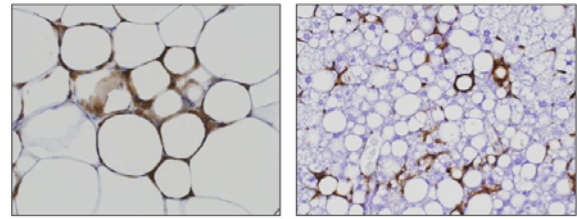
(図3) MC4R欠損マウスにおける肝癌発症  
A 肉眼所見 矢印: 腫瘍形成  
B, C HE染色 D  $\alpha$ -fetoprotein染色  
T, tumor; NT, non-tumor

## 2. NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義

③ マクロファージの組織学的解析: 野生型マウスでは 20 週間高脂肪食負荷後に著明な脂肪蓄積を認めるものの、炎症性変化・線維化変化は認められず、単純性脂肪肝の所見であった。F4/80 染色においてもマクロファージの分布は通常食のマウスと比較して明らかな変化は認められなかった。

一方、MC4R-KO は HE 染色において著明な小葉内炎症細胞浸潤、肝細胞風船様変性を認め、Sirius red 染色にて肝細胞周囲性線維化が認められたことから、NASH の診断基準に合致していると考えられた。F4/80 染色では、肝細胞をマクロファージが取り囲む像が多数認められ (図 4)、肥満脂肪組織において細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージ

が取り囲む、Crown-like structure (CLS) に類似した所見と考えられた (図 4)。

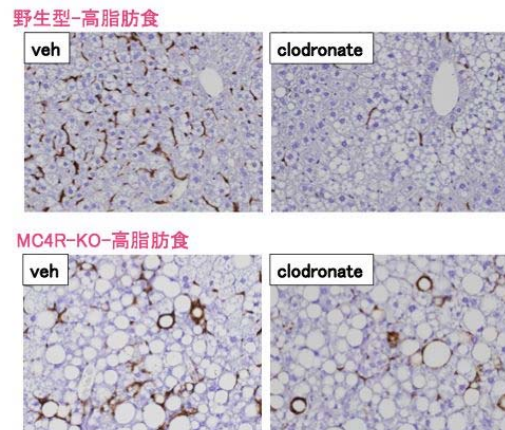


肥満脂肪組織における Crown-like structure (CLS) MC4R-KOの肝臓におけるCLS様構造  
(図4) 肥満脂肪組織とNASH様肝病変におけるF4/80染色

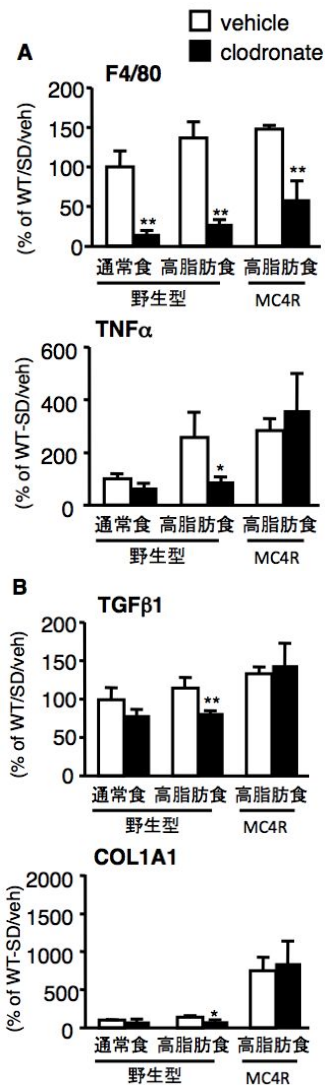
④ クロドロネートリポソームを用いたマクロファージ消去実験: 野生型マウスに対してクロドロネートリポソームを投与すると、F4/80 陽性細胞がほぼ完全に消失し (図 5)、F4/80 遺伝子発現も著明に減少した (図 6)。また、炎症性マーカー (TNF $\alpha$ )・線維化マーカー (TGF $\beta$ 1、COL1A1: collagen  $\square$ 1(I)) の発現が低下した (図 6)。

一方、MC4R-KO では F4/80 陽性細胞の消失効率が悪く、特に CLS 様構造の残存が特徴的であった (図 5)。F4/80 の遺伝子発現は約 1/2 に減少したが、炎症・線維化マーカーの発現には変化は認められなかった (図 6)。

以上から、NASH を発症した肝臓においてマクロファージの分布に変化があることが明らかとなった。さらに、CLS 様構造を形成するマクロファージが特にリポソーム抵抗性であることは、NASH 発症過程においてマクロファージの局在や性質に変化が起きていることを強く示唆している。肥満脂肪組織において CLS を構成するマクロファージは活性型マクロファージと考えられており、脂肪組織における慢性炎症やインスリン抵抗性に関与することが報告されている。現在のところ MC4R-KO の肝臓における CLS 様構造の機能的意義は不明であるが、炎症・線維化の中心として NASH の病態形成に関与している可能性が示唆される。



(図5) 高脂肪食20週間におけるclodronate liposomeの効果



(図6) マクロファージ消去時の肝遺伝子発現  
 A 炎症性マーカー (F4/80, TNF $\alpha$ )  
 B 線維化マーカー (TGF $\beta$ 1, COL1A1)  
 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 各vehicle

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 3 件)

1. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. **Am. J. Pathol.** 179: 2454-2463, 2011.
2. M. Itoh, T. Suganami, R. Hachiya, Y. Ogawa. Adipose tissue inflammation as homeostatic inflammation. **Int. J. Inflamm.** 2011: 720926, 2011.

3. A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. Anti-obesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. **Diabetes** 59: 2495-2504, 2010.

[学会発表] (計 4 件)

1. 伊藤美智子、菅波孝祥、田中都、亀井康富、小川佳宏：NASH の発症・進展と脂肪組織炎症—新しい NASH モデル・MC4R 欠損マウスを用いて— (口演) 第 32 回日本肥満学会、淡路島、2011/9/23-24
2. 伊藤美智子、菅波孝祥、中川信貴、田中都、亀井康富、小川佳宏：MC4R 欠損マウスを用いた新規 NASH モデルの確立 (口演) 第 84 回日本内分泌学会、神戸、2011/4/21(-23)
3. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, Y. Ogawa: Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. (Poster) Keystone symposia: Type 2 diabetes, insulin resistance and metabolic dysfunction and obesity. Keystone, Colorado, USA 2011/1/12-17
4. 伊藤美智子、菅波孝祥、中川信貴、田中都、亀井康富、小川佳宏：新しい NASH モデルとしての MC4R 欠損マウス (YIA プレゼンテーション、口演) 第 31 回日本肥満学会、前橋、2010/10/1-2

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/prm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

( 伊藤 美智子 )

研究者番号 : 00581860