

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590979

研究課題名(和文) 異常Kupffer細胞におけるNASH発症に関連する因子の同定

研究課題名(英文) Investigation of the pathogenetic factors for the development of NASH

研究代表者

小野 正文(Ono, Masafumi)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：70304681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発症病態においてKupffer細胞からのサイトカイン過剰分泌と貪食能低下状態の存在が病態形成に重要である。NASH肝においては炎症性サイトカイン分泌能を有するCD11b+Kupffer細胞が増加する一方、貪食能、ROS産生能を有するCD68+ Kupffer細胞が減少することで貪食能が低下すること、またKupffer細胞の肝小葉での分布が、NASH肝では肝小葉全体、特に中心静脈周辺にも分布するように変化することが明らかとなった。このように、NASH肝ではKupffer細胞のサブセットと分布の変化がNASHの病態に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hyper-secretion of inflammatory cytokines from Kupffer cells and impairment of phagocytic function of Kupffer cells are considered to be important pathogenic factors for development of non alcoholic steatohepatitis (NASH). We clarified that number of CD11b+ Kupffer cells which enable to secrete inflammatory cytokines increase, and CD68+ Kupffer cells which enable to phagocyte and production of ROS decrease in NASH livers. In distribution, Kupffer cells distributed on whole hepatic lobes in the livers of NASH unlike normal livers. It was clarified and reported that the changes of subset and the distributions of Kupffer cells would be important pathogenic factors for development of NASH at several domestic and international medical meeting and some articles.

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：NASH kupffer細胞 貪食能 分化 サブセット

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の発症病態における Kupffer 細胞の 2 面性機能異常、すなわち活性化に基づくサイトカイン過剰分泌と貪食能低下状態の共存が重要であることを明らかにして来たが、Kupffer 細胞の膨化や分化、増殖のメカニズム、さらにはそのような現象と NASH 発症との関連については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

Kupffer 細胞は肝臓における免疫機能の中心のかつ最前線として働く細胞であり、サイトカイン分泌や貪食作用を有している。これまで、機能亢進した Kupffer 細胞からの TNF- α 、IL-1 β 、IL-12、IL-16 などの炎症性サイトカインの過剰分泌が肝脂肪化や NASH 発症に重要であるとされて来た。一方、これまで我々が報告したように、Kupffer 細胞のもう一つの重要な機能である貪食能については、正常肝と比べ NASH 肝では明らかに機能が低下していることが明らかとなっている。すなわち、このような矛盾したように見える Kupffer 細胞の 2 面性の存在が NASH 発症病態に関わっていると考えられるが、その原因については明らかではなかった。さらに、NASH 肝において Kupffer 細胞の膨化現象が認められる原因や肝小葉内における分布の違い、さらには各種サブセットへの分化と NASH 発症との関わりについても明らかではなかった。このため、本研究では NASH 肝における Kupffer 細胞のサブセットの変化を中心に Kupffer 細胞の 2 面性の存在と NASH 発症病態の関係を解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

NASH 肝において Kupffer 細胞の膨化現象が認められる原因や肝小葉内における分布の違いを検査するために、NASH マウスモデル肝における Kupffer 細胞について組織学的、および免疫組織学的検討を行う。さらに、NASH マウスモデル肝から Kupffer 細胞を分離しサブセット変化について FACS を用いて分類を行う。さらに、分離した Kupffer 細胞に対し分子生物学的検討により Toll Like receptor の違いを始め各種の発現遺伝子の差異について検討を行う。

また、NASH 肝における apoptosis の状態を検討し、Kupffer 細胞の 2 面性状態との関連について検討を行う。

4. 研究成果

Kupffer 細胞の肝小葉内での分布についても、正常肝の Kupffer 細胞は門脈域周辺で主に活性化された状態で存在しているのに対し、NASH 肝では活性化した Kupffer 細胞の数は明らかに増加し、肝小葉全体、特に中心静脈周辺にも分布するように変化することが明らかとなった (図 1)。

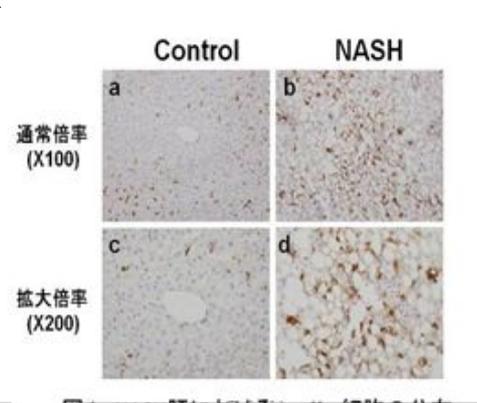


図1 NASH肝におけるKupffer細胞の分布

さらに本研究では、Kupffer 細胞のサブセット変化に注目し FACS 等を用いて解析を行った。

肝臓には主に貪食能、ROS 産生能を有する CD68⁺ Kupffer 細胞と炎症性サイトカイン分泌能を有する CD11b⁺ Kupffer 細胞に分けることが出来ることが知られているが、NASH 肝においては CD11b⁺ Kupffer 細胞が増加することでサイトカイン分泌が過剰になる一方、CD68⁺ Kupffer 細胞が減少することで貪食能が低下する現象の存在が明らかとなった。さらに、NASH 肝で増加する CD11b⁺ Kupffer 細胞上には Toll Like receptor-9 (TLR-9) や TLR-4 などが特異的に増加していることが確認された。近年注目されている口腔内および腸内細菌由来の LPS 等に対する TLR-9 や TLR-4 を介した Kupffer 細胞の過剰な反応と、それに引き続くサイトカインの過剰分泌による NASH 発症の病態に繋がる重要な結果を示唆するものと考ええる。

また、NASH では肝細胞の apoptosis が増加していることは知られているが、MFGE-8 蛋白などのいわゆる「eat me signal」が増加していることが明らかとなり (図 2) NASH で減少している CD11b⁺ Kupffer 細胞の貪食処理の限界を超えた apoptosis 肝細胞の過剰状態もその要因の一つであり、このような現象を介して Kupffer 細胞が膨化を来すものと推定されるに至った。

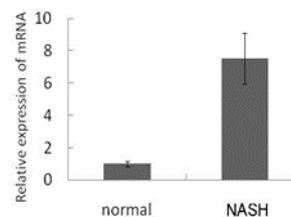


図2、肝臓におけるMFGE-8遺伝子発現

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 14 件)

Hashiba M, Ono M, Munekage K, Ochi T, Saibara T (他 11 名): Glycemic variability is an independent predictiv

e factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease. PLoS One 8(11):e76161, 2013. 査読有

doi: 10.1371/journal.pone.0076161.

Ono M, Saibara T, (他 11 名): Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. J Gastroenterol, E-pub, 2013. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800945>

Toda K, Ono M, Saibara T (他 3 名): Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. Transgenic Res, E-pub, 2013. 査読有

doi: 10.1007/s11248-013-9771-y.

Ue M, Munekage K, Ochi T, Ono M, Saibara T (他 1 名): Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis in the liver of chronic hepatitis C patients on hemodialysis. J Viral Hepat 20 (5): 350-357, 2013. 査読有 doi: 10.1111/jvh.12031.

小野正文, 高橋宏和, 兵庫秀幸, 江口有一郎, 西原利治: 飲酒よりも肥満や内臓脂肪蓄積の方が脂肪肝発症に重要である. 消化器内科 56(1): 120-125, 2013. 査読無

西原利治, 羽柴基, 小野正文: 特集 糖尿病と脂質代謝異常の病態リンク 糖尿病と脂肪肝. Diabetes Frontier 24(4): 408-411, 2013. 査読無

Masuda K, Ono M, Munekage K, Ochi T, Saibara T (他 5 名): Usefulness of Technetium-99m-2-methoxy-isobutyl-isocyanide liver scintigraphy for evaluating disease activity of non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res 42(3): 273-279, 2012. 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00923.x.

Toda K, Ono M, Saibara T (他 1 名): Impact of ovarian sex steroids on ovulation and ovulatory gene induction in aromatase-null mice. Endocrinology 153(1): 386-394, 2012. 査読有 doi: 10.1210/en.2011-1462.

Toda K, Ono M, Saibara T (他 2 名): 17 β -Estradiol is critical for the preovulatory induction of prostaglandin E₂ synthesis in mice. Molecular and Cellular Endocrinology 362(1-2): 176-182, 2012. 査読有

doi: 10.1016/j.mce.2012.06.006.

小野正文, 岡本宣人, 西原利治: NASH 患者からの肝癌発症の頻度と危険因子. 肝

胆膵 65(6): 1023-1028, 2012. 査読無
Ogasawara M, Ono M, Saibara T (他 12 名): A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-fat diet. Liver Int 31(4): 542-551, 2011. 査読有 doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02443.x.

Ono M, Ochi T, Munekage K, Saibara T (他 5 名): Angiotensinogen gene haplotype is associated with the prevalence of Japanese non-alcoholic steatohepatitis. Hepatol Res 41(12): 1223-1229, 2011. 査読有 doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00883.x.

小野正文, 岡本宣人, 西原利治: 今日の NAFLD・NASH 治療法. Pharma Medica 29: 47-52, 2011. 査読無

宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: NASH に関係するリポ蛋白遺伝子. 肝胆膵 62: 977-984, 2011. 査読無

[学会発表](計 13 件)

Ochi T, Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Munekage K, Okamoto N, Iwasaki S, Chayama K, Eguchi Y, Saibara T: Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013, Poster, Walter E. Washington convention center (Washington USA), 2013. 11.1-11.5

Ono M, Eguchi Y, Hyogo H, Takahashi H, Ochi T, Munekage K, Hirose A, Takahashi M, Okamoto N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T: Alcohol intake is less important as predictive factors for development of fatty liver disease compared to obesity, impairment of glucose metabolism and dyslipidemia. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Poster Sessions, Hyatt Convention Center (Boston USA), 2012. 11.9-11.13

Ono M, Ochi T, Munekage K, Ogasawara M, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara T: Angiotensinogen gene haplotype associate with the prevalence of Japanese NASH. The 62nd Annual Meeting Of The American Association For The Study Of Liver Diseases. Poster, Moscone Center West (San Francisco USA), 2011. 11.4-11.8

Ochi T, Hashiba M, Ono M, Hyogo H, I

keda Y, Munekage K, Okamoto N, Iwasaki S, Chayama K, Eguchi Y, Saibara T: Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013, Poster, Walter E. Washington convention center (Washington USA), 2013.11.4-11.8

小野正文, 羽柴基, 西原利治: NASH 肝線維化に影響を及ぼす耐糖能異常の病態. 第 99 回日本消化器病学会総会. シンポジウム「NAFLD/NASH の病態解明と治療への展開」, (城山観光ホテル) 鹿児島, 2013.3.21-3.23

越智経造, 宗景玄祐, 小野正文: 耐糖能異常からみた NAFLD の組織学的, 生化学的特徴についての検討. 第 40 回日本肝臓学会西部会. ワークショップ「NAFLD/NASH の病態と治療」, (長良川国際会議場・岐阜都ホテル) 岐阜, 2013.12.6-12.7

Ono M, Eguchi Y, Hyogo H, Takahashi H, Ochi T, Munekage K, Hirose A, Takahashi M, Okamoto N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T: Alcohol intake is less important as predictive factors for development of fatty liver disease compared to obesity, impairment of glucose metabolism and dyslipidemia. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Poster, Hynes Convention Center (Boston USA), 2012.11.9-11.12

小野正文, 兵庫秀幸, 江口有一郎: 脂肪肝発症には飲酒の有無よりも肥満や内臓脂肪蓄積が重要である. 第 98 回日本消化器病学会総会. ワークショップ「生活習慣と肝・胆・膵疾患」, (京王プラザホテル) 東京, 2012.4.19-4.21

Ono M, Ochi T, Munekage K, Ogasawara M, Hirose A, Nozaki Y, Takahashi M, Iwasaki S, Saibara T: Angiotensinogen gene haplotype associate with the prevalence of Japanese NASH. The 62nd Annual Meeting Of The American Association For The Study Of Liver Disease. Poster, Moscone Center West (San Francisco USA), 2011.11.4-11.8

Ono M, Ochi T, Munekage K, Ogasawara M, Hirose A, Nozaki Y, Fujimura Y, Takahashi M, Okamoto N, Iwasaki S, Eguchi Y, Saibara T: Three single nucleotide polymorphisms haplotype of angiotensinogen gene associated with the prevalence of Japanese NASH. 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Poster, Internationales Congress Centrum (Berlin Germany), 2011.3.30-4.3

Eguchi Y, Kitajima Y, Ono M, Mizuta T, Ishibashi E, Ozaki I, Oda Y, Ono N, Eguchi T, Anzai K, Iwakiri R, Koizumi S, Fujimoto K: The decrease of intra-muscular adipose tissue content is an independent target for treatment of nonalcoholic steatohepatitis /nonalcoholic fatty liver disease. 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Poster, Internationales Congress Centrum (Berlin Germany), 2011.3.30-4.3

Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta K, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T: The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the general population during the last 2009 to 2010 years in Japan. 46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver. Poster, Internationales Congress Centrum (Berlin Germany), 2011.3.30-4.3

小野正文, 越智経造, 宗景玄祐: NASH 発症における PNPLA3 (adiponutrin) 遺伝子の ER ストレスへの役割について. 第 15 回日本肝臓学会大会. (JDDW 2011) シンポジウム「NASH 発症の分子機構と治療標的」, (福岡国際センター他) 福岡, 2011.10.20-10.23

〔図書〕(計 17 件)

小野正文: 非アルコール性脂肪性肝疾患. 今日の治療指針 私はこう治療している TODAY'S THERAPY 2013, 497-498, 医学書院, 2013.

小野正文, 西原利治: Debate 薬物起因による“NASH”は NASH ではない?. NASH・アルコール性肝障害, 105-109, 文光堂, 2013.

西原利治, 小野正文: NAFLD (NASH/NAFL). 消化器疾患 最新の治療 2012-2013, 328-331, 南江堂, 2013.

西原利治, 小野正文: 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH). 専門医のための消化器病学 第 2 版, 381-385, 医学書院, 2013.

宗景玄祐, 小野正文, 西原利治: カラー版 消化器病学 基礎と臨床. 7 非ア

ルコール性脂肪性肝疾患，1217-1221，西村書店，2013.

小野正文，西原利治：NASH/NAFLD の疫学：症例に学ぶ NASH/NAFLD の診断と治療，2-6，診断と治療社，2012.

小野正文，増田弘誠，西原利治：症例 9 睡眠時無呼吸症候群（SAS）を合併した症例．症例に学ぶ NASH/NAFLD の診断と治療-臨牀で役立つ症例 32，120-124，診断と治療社，2012.

小野正文，増田弘誠，西原利治：症例 17 タモキシフェン誘発性 NASH に対するフィブラード系薬剤の有効例．症例に学ぶ NASH/NAFLD の診断と治療-臨牀で役立つ症例 32，151-154，診断と治療社，2012.

小野正文，宗景玄祐，越智経浩，西原利治：NAFLD/NASH の治療．先端医療シリーズ 42 消化器疾患の最新医療，81-84，先端医療技術研究所，2012.

西原利治，羽柴基，小野正文：二次性糖尿病 慢性肝疾患と耐糖能異常．最新糖尿病学(下) - 糖尿病学の最新動向 - ，日本臨牀 70 巻増刊号 5，165-169，日本臨牀社，2012.

西原利治，小野正文：非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の診断基準．消化器疾患の診断基準 病型分類 重症度の用い方，199-203，日本メディカルセンター，2012.

西原利治，小野正文：非アルコール性脂肪性肝疾患．消化器疾患診療のすべて，S271-S273，日本医師会，2012.

西原利治，小野正文：脂肪肝．新臨牀栄養学，569-574，医学書院，2012.

角田圭雄，兵庫秀幸，小野正文：3 診断の進めかたと鑑別診断．症例に学ぶ NASH/NAFLD の診断と治療，44-49，診断と治療社，2012.

小野正文，西原利治：非アルコール性脂肪性肝疾患 NAFLD．消化器診療最新ガイドライン 第 2 版，187-189，総合医学社，2011.

小野正文，中田博文，西原利治：6 非アルコール性脂肪性肝疾患．Annual Review 2011 消化器，146-151，中外医学社，2011.

小野正文，麻植啓輔，西原利治：メタボリック症候群と肝臓 2.NASH の診断と治療．肝硬変のマネジメント，53-56，医薬ジャーナル社，2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kochi1nai.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 正文 (ONO MASAFUMI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：70304681

(2)研究分担者

西原 利治 (SAIBARA TOSHIJI)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：60145125

越智 経浩 (OCHI TSUNEHIRO)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30617840

宗景 玄祐 (MUNEKAGE KENSUKE)

高知大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60617843