

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790916

研究課題名(和文)新規非アルコール性脂肪性肝炎モデルを用いた脂肪組織・肝臓連関の解析

研究課題名(英文) Pathophysiological role of adipo-hepatic axis in the development of non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

伊藤 美智子 (ITO, MICHIKO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：00581860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肥満の表現型をする新規NASHモデルを用いた解析により、肝臓への異所性脂肪蓄積やNASHの病態形成に先立って、脂肪組織における炎症・線維化変化が認められることを明らかにした。また、NASHの肝臓に認められるhepatic crown-like structureは病勢を反映する病理組織マーカーであり、炎症・線維化の中心として単純性脂肪肝から肝線維化への進展に重要な役割を果たすと考えられる。肥満脂肪組織とNASHの肝臓において、脂肪の過剰蓄積によって実質細胞に障害が加わり、マクロファージとの相互作用から臓器機能障害に至る共通の分子基盤が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Obesity is now viewed as a state of systemic, chronic low-grade inflammation. There is considerable evidence that macrophages are infiltrated into obese adipose tissue to constitute crown-like structures, where they are aggregated to engulf dead adipocytes and induce inflammatory responses. We demonstrated the unique histological structure termed "hepatic crown-like structures" in the novel rodent model of human non-alcoholic steatohepatitis; melanocortin-receptor 4 deficient mice fed a Western diet. Our data provide evidence that hepatic crown-like structures are involved in the development of hepatic inflammation and fibrosis, thereby suggesting its pathophysiologic role in disease progression from simple steatosis to steatohepatitis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム 慢性炎症 マクロファージ Crown-like structure

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内臓脂肪組織における慢性炎症の重要性が注目されており、脂肪組織を起点として複雑かつ巧妙な臓器代謝ネットワークにより全身臓器に慢性炎症が波及し、不可逆な組織リモデリングあるいは臓器機能不全をもたらす可能性がある。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、慢性炎症と線維化からときに肝硬変や肝細胞癌に至る病態として注目されている。その発症機序として「2ヒット仮説」が提唱されており、肝臓の異所性脂肪蓄積(1st ヒット)に引き続き、アディポサイトカイン、酸化ストレス、エンドトキシンなどの炎症機転(2nd ヒット)が加わることにより線維化が発症すると考えられている。肝臓に蓄積する脂肪の約2/3は脂肪組織に由来する遊離脂肪酸であると考えられており、脂肪組織はNASH発症の1st ヒットと2nd ヒットの両者に関与することが予想される。しかしながら、従来、肥満に合併する糖脂質代謝障害を背景として肝線維化(NASH)を経て肝細胞癌を発症する動物モデルが存在しなかったため、NASHにおける脂肪組織の病態生理的異議には不明な点が多い。

2. 研究の目的

申請者らは、摂食調節に關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、新しいNASHモデルマウスを用いて、肥満を背景として単純性脂肪肝から肝線維化に至る分子機構の解明を目的とし、NASHの病態形成における脂肪組織炎症の意義と肝線維化におけるマクロファージの病態生理的意義の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) NASHの病態形成における脂肪組織炎症の意義

脂肪組織炎症とNASH肝病変発症の経時的解析:

脂肪組織炎症とNASH病変発症のタイミングを検討するため、MC4R欠損および野生型マウスに対して高脂肪食を負荷し、2, 4, 8, 20週にサンプリングを行った。脂肪組織の組織学的解析(マクロファージ染色(F4/80染色)、Sirius red染色)および遺伝子発現解析(リアルタイムPCR法)を行った。

(2) 肝線維化におけるマクロファージの病態生理的意義の検討:

マクロファージの組織学的解析:
MC4R欠損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、Sirius red染色によって肝線維化を確認し、F4/80染色によってマクロファージの分布を検討した。さらに連続切片を用いてF4/80、SMA染色、タイプIコラーゲン染色を行い、マクロファージと肝線維化関連因子との局在を検討した。活性化マクロファージマーカーであるCD11cの免疫染色にてマクロファージの極性を検討した。

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欠損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。

ヒトNASH肝組織を用いたマクロファージの組織学的解析:

研究協力者である山口大学消化器病態内科学の寺井崇二博士よりヒトNASH肝組織を提供頂き、マクロファージマーカーであるCD68の免疫染色を行った。NASHの活動度、線維化ステージに関する臨床情報とCD68染色の結果を比較検討した。

4. 研究成果

(1) NASHの病態形成における脂肪組織炎症の意義

脂肪組織炎症とNASH肝病変発症の経時的解析:

野生型マウスでは20週間の負荷期間を通して脂肪組織重量・体重比が増加し、肝重量・体重比には変化が認められなかった。一方、MC4R欠損マウスでは負荷早期から脂肪組織重量・体重比が増加するが、負荷4週をピークに減少に転じ、逆に肝重量・体重比は負荷4週以降に増加した。F4/80染色ではMC4R欠損マウスにおいて著明なマクロファージの集積が認められ、野生型マウスと比較して負荷2週からすでに増加していた。

Sirius red染色ではMC4R欠損マウスにおいて脂肪組織の線維化と線維化マーカーの発現亢進が認められ、MC4R欠損マウスの脂肪組織では肝臓への脂質蓄積に先立って炎症・線維化変化が起こっていることが明らかになった。このような炎症・線維化変化が脂肪分解の促進や脂肪組織拡張障害を引き起こし、肝臓への異所性脂肪蓄積を促進することでNASHの病態形成に關与することが示唆された。

(2) 肝線維化におけるマクロファージの病態生理的意義の検討:

マクロファージの組織学的解析:

肥満の脂肪組織では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)が認められることが知られているが、NASH を発症した MC4R 欠損マウスの肝臓では CLS に類似した組織像が多数認められた (hepatic CLS: hCLS) (図 1A)。興味深いことに、hCLS 数と肝線維化面積と非常によい相関を示した (図 1B)。

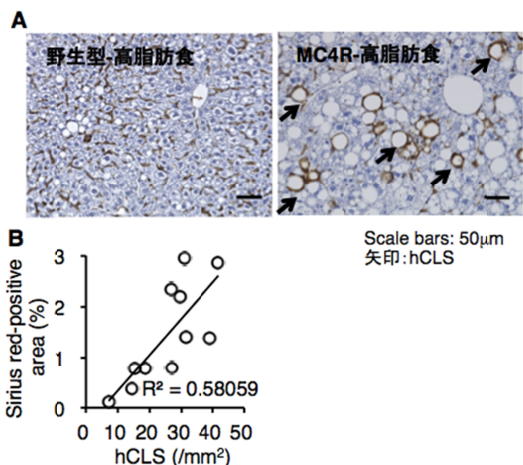


図1. 高脂肪食20週における肝マクロファージの分布
A F4/80染色, B hCLS数と線維化面積の相関

経時的に肝組織像を解析すると、MC4R 欠損マウスでは負荷 8 週で SMA 陽性筋線維芽細胞が出現し、負荷 20 週で線維化が顕在化した。一方、hCLS は負荷 4 週から増加しており、線維化形成や α SMA 陽性筋線維芽細胞の出現に先立って形成されることが明らかになった。連続切片を用いた免疫染色では、hCLS の近傍に α SMA 陽性筋線維芽細胞やコラーゲン沈着が認められた。また、hCLS 構成マクロファージは CD11c 陽性の活性化マクロファージであることが明らかとなった。

クロドロネートリポソームを用いたマクロファージ除去実験：

クロドロネートリポソーム法によりマクロファージを除去すると、単純性脂肪肝を呈する野生型マウスではマクロファージが効率的に消失し、炎症・線維化マーカーの発現が低下した。一方、NASH を発症した MC4R 欠損マウスではhCLS 特異的にマクロファージが残存し、炎症・線維化マーカーの発現には変化が認められなかったことから、hCLS は炎症・線維化の起点となって肝線維化の発症・進展に関与することが示唆された。

ヒト NASH 肝組織を用いたマクロファージの組織学的解析：

ヒト NAFLD/NASH においても hCLS を認め、ウイルス性肝炎ではほとんど認められなかった (図 2)。また、hCLS 数は肝細胞障害の指標である肝細胞風船様変性のスコアと正の相関が認められた。

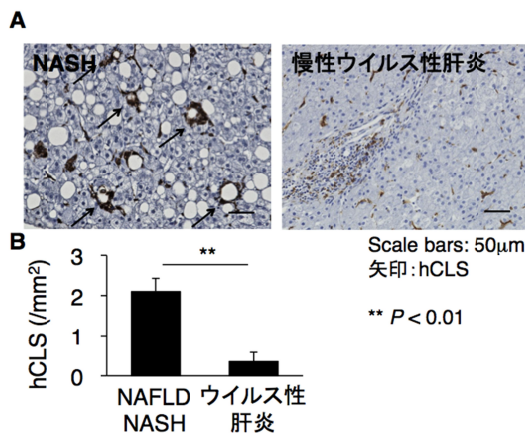


図2. ヒトNAFLD/NASHにおけるhCLS
A 肝CD68染色, B hCLS数

以上から、hCLS は NASH の病勢を反映する病理組織マーカーであると考えられ、炎症・線維化の中心として単純性脂肪肝から肝線維化への進展に重要な役割を果たすことが示唆された。肥満脂肪組織と NASH の肝臓において、脂肪の過剰蓄積によって実質細胞 (脂肪細胞や肝細胞) に障害が加わり、マクロファージとの相互作用から臓器機能障害に至る、共通の分子基盤が存在する可能性が示唆された (PLoS One 8: e82163, 2013)。

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 4 件)

1. M. Itoh, H. Kato, T. Suganami, K. Konuma, Y. Marumoto, S. Terai, H. Sakugawa, S. Kanai, M. Hamaguchi, T. Fukaiishi, S. Aoe, K. Akiyoshi, Y. Komohara, M. Takeya, I. Sakaida, Y. Ogawa. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. **PLoS One** 8: e82163, 2013. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0082163
2. 伊藤美智子、田中都、菅波孝祥、小川佳宏：「中枢神経系を介するレプチンの炎症・免疫調節作用」**BIO Clinica** 28: 45-48, 2013. 査読なし
3. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏：「n-3 多価不飽和脂肪酸と糖代謝改善、動脈硬化改善のメカニズム」**内分泌・糖尿病・代謝内科** 36: 502-506, 2013. 査読なし
4. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪酸の質的・量的変化がもたらす慢性炎症とメタボリックシンドローム」**実験医学** 30: 418-422, 2012. 査読なし

[学会発表](計 3 件)

1. 伊藤美智子 他：NASH の病勢を反映する

- 病理組織マーカー（口演）hepatic crown-like structure の意義, 第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会、宮崎、2014/2/14
2. 小沼邦葉、伊藤美智子 他：NASH に対する EPA の予防・治療効果の検討-新規 NASH モデルを用いて-(口演) 第 28 回日本糖尿病・肥満動物学会、宮崎、2014/2/15
3. 伊藤美智子 他：NASH 発症における hepatic crown-like structure の意義(口演) 第 34 回日本肥満学会、東京、2013/10/12

〔図書〕(計 2 件)

伊藤美智子 他, 文光堂, そうだったんだ! 脂肪酸, 2012, 178 頁
伊藤美智子 他, エル・アイ・シー, 疾患モデルの作成と利用-糖尿病・肥満/感染症, 2012, 230 頁

〔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

<http://www.tmd.ac.jp/grad/cme/>

プレスリリース

東京医科歯科大学 (2013/12/12)

<http://www.tmd.ac.jp/archive-tmdu/kouhou/20131212.pdf>

山口大学 (2013/12/20)

<http://www.yamaguchi-u.ac.jp/topics/2013/3094.html>

日本経済新聞 (2013/12/12)、読売新聞 (2013/1/9)、日刊工業新聞 (2013/12/18) 掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 美智子 (ITO, Michiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・
寄附講座教員
研究者番号：00581860