

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670439

研究課題名(和文) 組織線維化の分子機構の解明と革新的な抗線維化医療の開発

研究課題名(英文) Molecular mechanism of tissue fibrosis and development of revolutionary anti-fibrotic therapy

研究代表者

小川 佳宏 (Ogawa, Yoshihiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70291424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：組織線維化は細胞外基質が過剰蓄積した状態であり、全ての組織において認められる慢性炎症性疾患の終末期の病理学的所見である。本研究では、病原体センサーMincleが脂肪組織線維化に及ぼす影響を検討した。肥満の脂肪組織において、Mincleは主に炎症性M1マクロファージに発現することが明らかとなった。また、Mincleの活性化は線維化関連遺伝子の発現上昇をもたらし、脂肪組織において活性化線維芽細胞を増加させることが明らかとなった。以上により、肥満脂肪組織におけるMincleの活性化により脂肪組織線維化が増悪することが明らかになり、Mincle活性の阻害による新しい抗線維化療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibrosis is a final, common pathological outcome of a variety of chronic inflammatory diseases. In this study, we focused on Macrophage-inducible C-type lectin (Mincle), a pathogen sensor that recognizes Mycobacterium tuberculosis and is induced in obese adipose tissue and investigated the role of Mincle in the regulation of adipose tissue fibrosis. In the obese adipose tissue, Mincle was expressed mainly in proinflammatory M1 macrophages. Mincle stimulation caused the upregulation of genes related to fibrogenesis in peritoneal macrophages. Furthermore, Mincle stimulation by trehalose 6,6'-dimycolate, an exogenous ligand for Mincle, in adipose tissue resulted in adipose tissue fibrosis. These observations suggest that Mincle activation in obese adipose tissue leads to the progression of adipose tissue fibrosis, thereby suggesting that Mincle antagonism offers a novel anti-fibrotic therapy for chronic fibrotic diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：線維化 マクロファージ Mincle 脂肪組織 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

組織線維化は、細胞外基質が過剰蓄積した状態であり、全ての組織において認められる慢性炎症性疾患の終末期の病理学的所見である。細胞あるいは組織の傷害に対する修復機転であり、高度に進行性の場合には、しばしば臓器の機能不全あるいは個体死をもたらす。

申請者らは既に、肥満の脂肪組織では脂肪分解により飽和脂肪酸が内因性リガンドとして放出され、マクロファージに発現する病原体センサーTLR4を活性化すること、脂肪細胞とマクロファージのパラクリン調節機構の破綻により炎症反応の慢性化と線維化をもたらされることを証明した。最近では、飽和脂肪酸がTLR4を活性化してマクロファージにおいて誘導される病原体センサー macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) を同定した。MincleはITAM共役活性化サブユニット(FcR $\gamma$ )と特異的に会合するCa<sup>2+</sup>依存型レクチンであり、結核菌糖脂質 trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)や病原性真菌マラセチアを認識する。興味深いことに、Mincleは死細胞から danger signal として放出される核内蛋白質 spliceosome-associated protein 130 (SAP130)を認識することが報告され、組織障害を感知して炎症反応を誘導する受容体として位置付けられている。申請者らは最近、Mincle 欠損マウスでは高脂肪食負荷による肥満の脂肪組織における線維化が有意に抑制されることを予備的に見出した。

以上より、マクロファージを含む Mincle 発現細胞は、細胞あるいは組織の傷害により放出された内因性リガンドを認識して組織線維化を開始・増悪すると想定し、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、Mincle の内因性リガンドと Mincle 発現細胞の同定とともに Mincle の活性化を抑制する中和抗体・低分子化合物を探索し、個体レベルで組織線維化における Mincle の分子機構と病態生理的意義、創薬ターゲットとしての可能性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Mincle 発現細胞の同定

野生型マウスならびに遺伝性肥満 *ob/ob* マウスの脂肪組織より間質細胞を調整し、フローサイトメーター (FACS CantoII, BD Biosciences 社)を用いて Mincle 発現細胞を検討した。また、CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>で代表されるマクロファージを F4/80 の発現強度の差異で分取し (FACS AriaII, BD Biosciences 社) Mincle 発現マクロファージの性質を検討した。

### (2) Mincle の分子機構に関する検討

既知の Mincle リガンドである trehalose 6,6'-dimycolate (TDM)を用いて、野生型マウスあるいは Mincle 欠損マウス由来腹腔内マ

クロファージを刺激した。total RNA を調整し、Real-time PCR 法 (StepOnePlus, Applied Biosystems)により mRNA レベルを測定した。また、TDM を野生型マウスあるいは Mincle 欠損マウスの脂肪組織に直接注入し、Mincle の活性化により脂肪組織線維化が生じるかどうかを、マッソントリクローム染色による線維化評価ならびに遺伝子発現変化を個体レベルで検討した。

## 4. 研究成果

### (1) Mincle 発現細胞の同定

野生型マウスならびに *ob/ob* マウスの間質細胞を、マクロファージ、樹状細胞、NK 細胞、T 細胞、B 細胞に分画したところ、Mincle 発現細胞はマクロファージに限局して認められた。また、野生型マウスと比較して *ob/ob* マウスでは、間質細胞中のマクロファージの割合が増加するのみならず、マクロファージ中の Mincle 発現細胞の割合が著者に増加した。また、間質細胞中のマクロファージを F4/80(hi)、F4/80(lo)に分画・分取し、遺伝子発現を検討したところ、F4/80(lo)は F4/80(hi)と比較して、Mincle の発現は約 3 倍高値を示した。F4/80(lo)は、CD11c の発現が高く CD206 の発現が低い、いわゆる炎症性 M1 マクロファージの性質を有していたため、Mincle は主に炎症性 M1 マクロファージに発現することが示唆された。

### (2) Mincle の分子機構に関する検討

TDM を用いて刺激した野生型マウス由来腹腔マクロファージでは、既に報告のある炎症性サイトカインの発現上昇のみならず、TGF $\beta$ 1、PDGFB、TIMP1 などの線維化関連遺伝子の発現上昇が認められた。一方、Mincle 欠損マウス由来腹腔マクロファージでは、このような変化は認められなかったため、Mincle シグナルが線維化関連遺伝子を誘導することが明らかとなった。また、Mincle シグナルによる炎症性サイトカインの発現誘導には、細胞内の spleen tyrosine kinase (Syk) が関与することが知られているが、線維化関連遺伝子の発現誘導も Syk 阻害剤でほぼ完全に阻害された。TDM を野生型マウスの脂肪組織に直接注入したところ、活性化線維芽細胞のマーカーである  $\alpha$ SMA やコラーゲンの著明な遺伝子発現上昇が認められ、実際に、組織像で広範な線維化を認めた。一方、Mincle 欠損マウスを用いた検討では、これらの変化が著しく抑制された。以上より、Mincle の活性化は、線維化関連遺伝子の発現上昇をもたらすこと、脂肪組織内の活性化線維芽細胞を増加させることで脂肪組織線維化を促進することが考えられた。

## 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 12 件)

Hatazawa Y, Tadaishi M, Nagaike Y, Morita A, Ogawa Y, Ezaki O, Takai-Igarashi T, Kitaura Y, Shimomura Y, Kamei Y, Miura S. PGC-1 $\alpha$ -mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. **PLoS ONE** 2014, 9(3):e91006. doi: 10.1371/journal.pone.0091006.

Inoue K, Maeda N, Mori T, Sekimoto R, Tsushima Y, Matsuda K, Yamaoka M, Suganami T, Nishizawa H, Ogawa Y, Funahashi T, Shimomura I. **PLoS ONE** 2014, 9(2):e87661. doi: 10.1371/journal.pone.0087661

Sawada N, Jiang A, Takizawa F, Safdar A, Manika A, Tesmenitsky Y, Kang KT, Bischoff J, Kalwa H, Sartoretto JL, Kamei Y, Benjamin LE, Watada H, Ogawa Y, Higashikuni Y, Kessinger CW, Jaffer FA, Michel T, Sata M, Croce K, Tanaka R, Arany Z. Endothelial PGC-1 $\alpha$  mediates vascular dysfunction in diabetes. **Cell Metab.** 2014, 19(2):246-58. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.014.

Morita S, Horii T, Kimura M, Arai Y, Kamei Y, Ogawa Y, Hatada I. Paternal allele influences high fat diet-induced obesity. **PLoS ONE** 2014, 9(1):e85477. doi: 10.1371/journal.pone.0085477.

Aoyama-Mani C, Kawachi S, Ogawa Y, Kato N. Vascular complications and coagulation-related changes in the perioperative period in Japanese patients undergoing non-cardiac surgery. **J. Atheroscler. Thromb.** 2014, 21(5):414-34.

Ito R, Satoh-Asahara N, Yamakage H, Sasaki Y, Odori S, Kono S, Wada H, Suganami T, Ogawa Y, Hasegawa K, Shimatsu A. An increase in the EPA/AA ratio is associated with improved arterial stiffness in obese patients with Dyslipidemia. **J. Atheroscler. Thromb.** 2014, 21(3):248-60.

Itoh M, Kato H, Suganami T, Konuma K, Marumoto Y, Terai S, Sakugawa H, Kanai S, Hamaguchi M, Fukaiishi T, Aoe S, Akiyoshi K, Komohara Y, Takeya M, Sakaida I, Ogawa Y. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. **PLoS ONE** 2013, 8(12):e82163. doi: 10.1371/journal.pone.0082163.

Iwasaki Y, Suganami T, Hachiya R, Shirakawa I, Kim-Saijo M, Tanaka M, Hamaguchi M, Takai-Igarashi T, Nakai M, Miyamoto Y, Ogawa Y. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. **Diabetes** 2014, 63(1):152-61. doi: 10.2337/db13-0757.

Mori T, Maeda N, Inoue K, Sekimoto R, Tsushima Y, Matsuda K, Yamaoka M,

Suganami T, Nishizawa H, Ogawa Y, Funahashi T, Shimomura I. A novel role for adipose ephrin-B1 in inflammatory response. **PLoS ONE** 2013, 8(10):e76199. doi: 10.1371/journal.pone.0076199.

Suganami T, Ogawa Y. Role of chronic inflammation in adipose tissue in the pathophysiology of obesity. **Nihon Rinsho** 2013, 71(2):225-30.

Takahashi M, Kamei Y, Ehara T, Yuan X, Suganami T, Takai-Igarashi T, Hatada I, Ogawa Y. Analysis of DNA methylation change induced by Dnmt3b in mouse hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2013, 434(4):873-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.041.

Kohmura YK, Kanayama N, Muramatsu K, Tamura N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Aoe S, Sasaki T, Suganami T, Ogawa Y, Itoh H. Association between body weight at weaning and remodeling in the subcutaneous adipose tissue of obese adult mice with undernourishment in utero. **Reprod. Sci.** 2013, 20(7):813-27. doi: 10.1177/1933719112466300.

〔学会発表〕(計3件)

Ogawa Y. Role of parenchymal-stromal cell interaction in metabolic diseases. **2014 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology: Innate Immunity, Metabolism and Vascular Injury** Whistler, Canada (2014.3.23-28).

Ogawa Y. Regulation of metabolic genes by DNA methylation. **8<sup>th</sup> World Congress on Developmental Origins of Health and Disease.** SUTEC, Singapore (2013.11.17-20).

Ogawa Y. Chronic inflammation and ectopic fat accumulation in the metabolic syndrome. **2013 International Conference on Diabetes and Metabolism (ICDM2013) & 5<sup>th</sup> Scientific Meeting of the Asian Association for the Study of Diabetes (5<sup>th</sup> AASD Scientific Meeting).** Seoul, Korea (2013.11.6-9).

〔図書〕(計0件)

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 佳宏 (OGAWA Yoshihiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・教授  
研究者番号：70291424

### (2) 研究分担者

山崎 晶 (YAMASAKI Sho)  
九州大学・生体防御医学研究所・教授  
研究者番号：40312946

### (3) 連携研究者

田中 都 (TANAKA Miyako)  
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・メディカルフェロー  
研究者番号：60622793