

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860692

研究課題名(和文) NASH発症におけるマクロファージの病態生理的意義とレプチンの関与

研究課題名(英文) Pathophysiological role of macrophages and leptin in the development of non-alcoholic steatohepatitis

研究代表者

伊藤 美智子 (Itoh, Michiko)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特別研究員

研究者番号：00581860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の分子基盤としてマクロファージを中心とする慢性炎症が重要である。本研究では細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲んで処理をする病理学的構造(hepatic crown-like structure: hCLS)に注目し、新規NASHマウスモデルにおいてhCLS構成マクロファージが線維化促進因子を産生し、炎症・線維化の起点となってNASHの病態形成に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chronic inflammation is one of the most characteristic features of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and macrophages play pivotal role in the process of inflammation. In this study, we focused on the pathophysiological role of "hepatic crown-like structure (hCLS)", where macrophages surround dead hepatocytes in the novel rodent model of human NASH using melanocortin 4 receptor deficient mice. Our data provide evidence that hCLS-constituting macrophages are the source of fibrogenic factors, and promote inflammation and fibrosis in the development of NASH.

研究分野：代謝学

キーワード：慢性炎症 マクロファージ crown-like structure

### 1. 研究開始当初の背景

内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームの基盤病態として全身の慢性炎症が注目されている。非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis: NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と言われ、高率に肝硬変・肝細胞癌に進展する病態として注目されている。NASH 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 (1<sup>st</sup> ヒット) に引き続き、アディポサイトカイン、酸化ストレス、エンドキシンなどの炎症機転 (2<sup>nd</sup> ヒット) が加わることにより線維化を発症すると考えられている。NASH の肝臓において常在性・浸潤性マクロファージが慢性炎症の中心となり、炎症性サイトカインや酸化ストレスの産生を介して NASH の病態形成に深く関与すると考えられる。しかしながら、従来、肥満の表現型を有する適切な動物モデルが存在しないことが NASH 研究の大きな障壁となってきた。

申請者は、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体 (Melanocortin 4 receptor: MC4R) を欠損するマウス (MC4R-KO マウス) が、高脂肪食負荷により糖脂質代謝障害、高レプチン血症などヒト肥満症患者と同様の表現型に加え、脂肪肝から NASH 様肝病変、肝細胞癌を発症することを明らかにした (Am J Pathol. 179: 2455-2464)。さらに、NASH を発症した MC4R-KO の肝臓とヒト NASH において、脂肪を蓄積し、細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲む像が多数認められ (hepatic crown-like structure: hCLS) hCLS 数は肝線維化面積と正の相関を示すことを見出した (PLoS One 8: e82163, 2013)。また、hCLS 構成マクロファージは他の散在性マクロファージと異なり、CD11c 陽性の活性化状態にあることを明らかにした。以上のように、NASH 発症・進展過程においてマクロファージの機能・分布が局所的に変化し、hCLS が肝線維化の起点となっている可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者が独自に開発した新規 NASH モデルを用いて、機能的に不均一な細胞集団であるマクロファージの中で、肝線維化発症に重要なサブセットの同定と病態への関与を明らかにする。以上より、肥満を背景として単純性脂肪肝から肝線維化にいたる分子機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

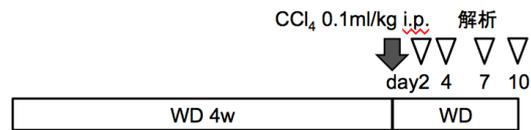
#### (1) 骨髄移植実験

hCLS を構成するマクロファージは CD11c 陽性であることから、CD11c プロモーター下にジフテリア毒素受容体を発現するマウス (CD11c-DTR) から骨髄移植実験を行った。8 週齢の雄性 MC4R-KO に 7.5Gy の  $\gamma$  線を照

射し、10-15 週齢の CD11c-DTR マウスから調整した骨髄細胞を尾静脈より投与した。4 週間の回復期間をおき、骨髄が 90%以上置換されていることを確認し、20 週間の高脂肪食負荷によって NASH を誘導した。

#### (2) 短期モデルの作成

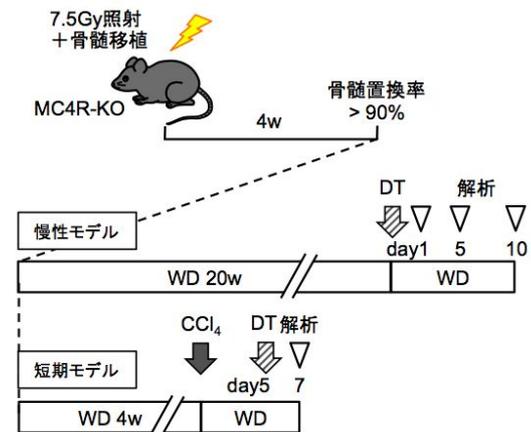
MC4R-KO マウスに高脂肪食を 4 週間負荷して脂肪肝を誘導し、四塩化炭素 0.1ml/kg を腹腔内に単回投与した。投与後 10 日まで経時的にサンプリングした (図 1)。



(図1) 短期モデル—実験プロトコール

#### (3) ジフテリア毒素による CD11c 陽性細胞消去

慢性モデルにおける消去実験では、CD11c-DTR の骨髄を移植し、長期間高脂肪食負荷によって NASH を誘導した MC4R-KO マウスに対して、4ng/kg のジフテリア毒素を腹腔内に単回投与し、CD11c 陽性細胞を消去した。短期モデルでは四塩化炭素投与 5 日後にジフテリア毒素 0.4ng/kg を投与し、その 2 日後に解析した (図 2)。



(図2) CD11c陽性細胞消去実験

#### (4) 組織学的解析

肝臓サンプルを 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成後、HE 染色、Sirius red 染色、F4/80 染色、TUNEL 染色を行った。線維化の程度は画像解析ソフト Winroof (Mitani Co.) を用いて Sirius red 陽性面積を測定した。hCLS 数および TUNEL 陽性細胞数は目視にてカウントし、単位 mm<sup>2</sup> 当たり換算した。凍結切片を用いて F4/80 および CD11c 免疫染色を行った。

#### (5) 遺伝子発現解析

肝臓より抽出した RNA から cDNA を合成し、real-time PCR 法により mRNA レベルを測

定した。内因性コントロールとして 36B4 を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 長期間高脂肪食負荷モデル (慢性モデル) における CD11c 陽性細胞消去

CD11c-DTR の骨髄を移植した MC4R-KO マウスに 20 週間の高脂肪食負荷により NASH を誘導した。ジフテリア毒素投与 1 日後には hCLS を含む F4/80 陽性細胞が消失し、5 日後にはほぼ回復した。CD11c 染色ではジフテリア毒素投与 1 日後には消失し、5 日目から 10 日目にかけて徐々に回復した。遺伝子発現ではマクロファージの消失とともに TGF $\beta$  や PDGF-B といった線維化促進因子の発現が低下し、hCLS がこれら因子の産生源となっていることが示唆されたが、組織学的解析では線維化面積の改善は認められなかった。

##### (2) 短期モデルの確立

従来の慢性モデルでは肝線維化発症までに 20 週間かかることが技術的な障壁であり、短期的な介入で線維化形成に対する影響を検討するためには不十分であると考えられた。そこで、より短期間に hCLS 形成および肝線維化を観察可能な短期モデルの作成を試みた。具体的には、4 週間の高脂肪食負荷によって脂肪肝を発症した MC4R-KO マウスに低用量の四塩化炭素を投与し、投与後 2, 4, 7, 10 日に解析を行った。投与後 2 日に中心静脈周辺に肝細胞風船様変性が観察され、4 日後に TUNEL 陽性細胞の増加が認められた。投与後 7 日には同領域に hCLS が出現し、慢性モデルと同様に CD11c 陽性であることを確認した。また、7 日から 10 日にかけて hCLS 周辺に線維化を認め、1 週間の経過で hCLS 形成から肝線維化を観察可能なモデルであると考えられた。

##### (3) 短期モデルにおける CD11c 陽性細胞消去

CD11c-DTR の骨髄を移植した MC4R-KO マウスを用いて短期モデルを作成した。hCLS が出現する時期 (四塩化炭素投与 5 日後) にジフテリア毒素を投与し、その 2 日後に解析した。F4/80 染色にて散在性マクロファージは残存していたが、hCLS は消失しており、組織学的に線維化面積の抑制も確認された。

以上より、hCLS は細胞死に陥った肝細胞と相互作用し、線維化促進因子の産生源となって NASH 発症に関与することが明らかとなった。また、短期モデルは約 5 週間という期間で肝細胞障害から hCLS 形成、肝線維化という一連の過程を観察可能であり、短期モデルと慢性モデルを組み合わせることで、NASH の病態解析が加速度的に進展することが期待される。

#### 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 1 件)

1. K. Konuma\*, M. Itoh\*, T. Suganami, S. Kanai, N. Nakagawa, T. Sakai, H. Kawano, M. Hara, S. Kojima, Y. Izumi, Y. Ogawa. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin 4 receptor-deficient mice. PLoS One 10: e0121528, 2015. \* equally contributed. 査読有 doi. 10.1371/journal.pone.0121528

(学会発表)(計 9 件)

1. M. Itoh, T. Suganami, Y. Ogawa. "Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans." Keystone symposia: Diabetes: New insights into molecular mechanisms and therapeutic strategies. Westin Miyako Kyoto (Kyoto, Japan) 2015/10/26
2. 伊藤美智子、加藤秀昭、金井紗綾香、菅波孝祥、小川佳宏「hepatic crown-like structure に注目した NASH 発症機構の解析」第 36 回日本肥満学会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015 年 10 月 2 日
3. 酒井建、伊藤美智子、菅波孝祥、金井紗綾香、小川佳宏「NASH モデルマウスにおけるテネグリップチンの肝保護効果の検討」第 36 回日本肥満学会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015 年 10 月 2 日
4. 小宮力、土屋恭一郎、池田賢司、宮地康高、柴久美子、伊藤美智子、田中都、菅波孝祥、小川佳宏「ピルフェニドンを用いた NASH における肝細胞死の病態生理的意義の検討」第 36 回日本肥満学会、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2015 年 10 月 2 日
5. 小宮力、土屋恭一郎、池田賢司、宮地康高、柴久美子、伊藤美智子、田中都、菅波孝祥、小川佳宏「ピルフェニドンは NASH モデルマウスの肝線維化を抑制する」第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、海峡メッセ下関 (山口県下関市) 2015 年 5 月 21 日
6. 菅波孝祥、田中都、伊藤美智子、小川佳宏「臓器間ネットワークによる異所性脂肪蓄積の新たな分子機構」第 88 回日本内分泌学会学術総会、ホテルオークラ東京 (東京都港区) 2015 年 4 月 23 日
7. 伊藤美智子、加藤秀昭、菅波孝祥、小沼邦葉、酒井建、小川佳宏「NASH 発症過程におけるマクロファージの動態解析—hepatic crown-like structure に注目して」第 35 回日本肥満学会、フェニックス

- シーガイアコンベンションセンター（宮崎県宮崎市）2014年10月24日
8. 小川佳宏、菅波孝祥、伊藤美智子、田中都「生活習慣病における crown-like structure (CLS)の病態生理的意義」第87回日本生化学会大会、国立京都国際会議場（京都府京都市）2014年10月15日
  9. 加藤秀昭、伊藤美智子、菅波孝祥、小山邦葉、小川佳宏「非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）における hepatic crown-like structure の意義」第57回日本糖尿病学会学術集会、大阪国際会議場（大阪府大阪市）2014年5月22日

〔図書〕(計2件)

1. 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏「肥満と非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）」実験医学増刊（羊土社）2016年、212頁
2. Yoshihiro Ogawa, Takayoshi Suganami, Michiko Itoh, Miyako Tanaka. “Pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis and its potential therapeutic strategies.” Innovative Medicine - Basic research and development - (Springer Japan) 2015. 339 pages.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：非アルコール性脂肪肝炎モデル動物の製造方法  
発明者：小川佳宏、菅波孝祥、伊藤美智子  
権利者：同上  
番号：2015-122913  
出願年月日：2015年6月18日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 美智子 (ITOH, Michiko)  
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・特別研究員  
研究者番号：00581860