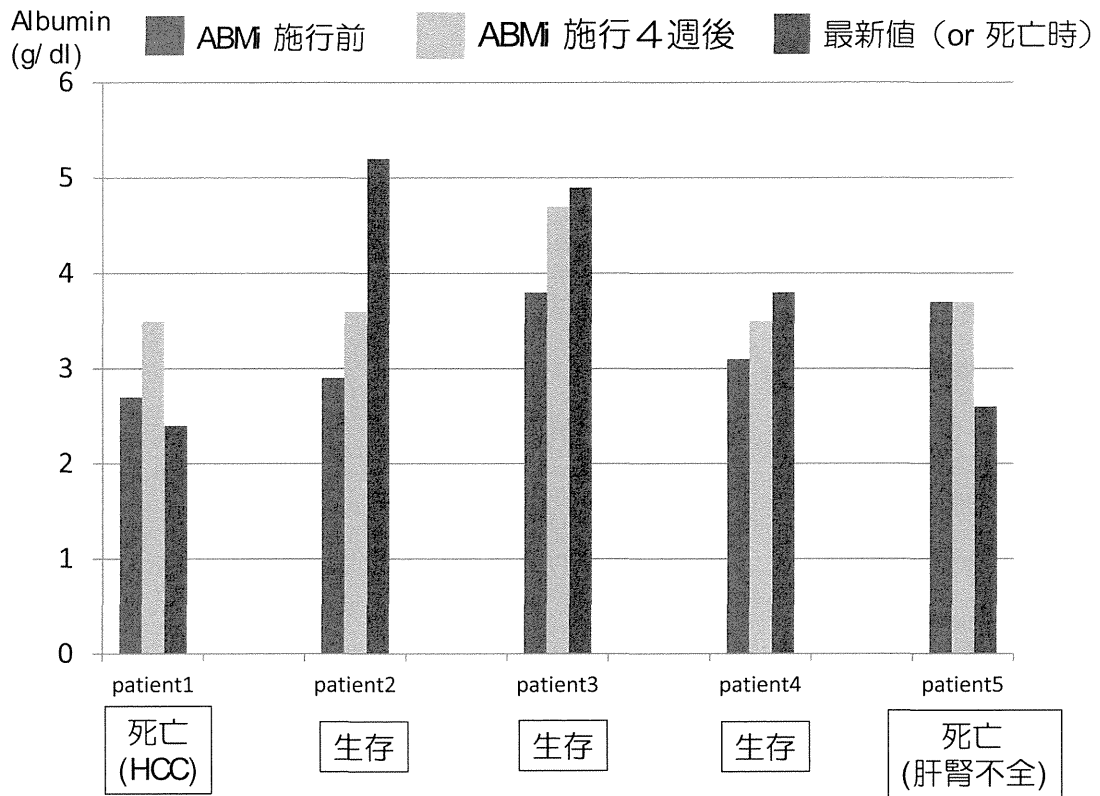


図 2 血清アルブミン値の早期反応と長期経過・生命予後



平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究分担者氏名 : 宮島 篤

所属機関 : 東京大学分子細胞生物学研究所 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】 肝線維化あるいはその改善に関わる骨髄中の細胞種および因子の解析

【方法】 骨髄中で存在比率の高い単球、好中球に着目し、それらの細胞群を単離して、遺伝子発現解析を行う。また、遊走した単球や好中球が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染刺激を行い、その因子を認識する細胞種を特定する。さらに、各種免疫細胞をその因子で刺激し、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

【成績】 遺伝子発現解析の結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことが明らかとなった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。また、単球や好中球を DAMPs の一つである HMGB1 で刺激すると、単球は炎症性サイトカインやケモカインを産生し、好中球は MMP13 を高発現することが明らかになった。

【考案】 本実験により、骨髄投与療法による治療効果には単球によるサイトカイン産生、及び好中球の MMP によるコラーゲンの溶解が寄与している可能性が示された。また、遊走した肝臓内で単球や好中球が反応する物質として DAMPs の一つである HMGB1 が候補の一つであることが示された。

共同研究者
榎本豊、田中稔、伊藤暢

A. 研究目的

ABM_i 法による肝硬変の治療効果を示す細胞種の候補としては、骨髄球系細胞が示唆されている。しかし、骨髄球系細胞は非常にヘテロな細胞集団であり、どの細胞種が肝硬変治療効果を示すかは特定されていない。今後 ABM_i 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で、細胞種の特定は不可欠である。

そこでまず、フローサイトメーターにより、マウスの骨髄中に多く存在する細胞種を特定する。そして、各細胞種で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現量の比較検討を行う。次に、肝臓内に遊走した各細胞種が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染色を行い、その因子を認識する細胞

種を特定する。さらに、各種免疫細胞をその因子で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

B. 研究方法

骨髄中に多く存在する細胞種を特定するため、フローサイトメーターを用いてマウスの骨髄中の細胞種の比率を解析した。次に各細胞種の mRNA から cDNA を作製し、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量、及び、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量を定量的 PCR により解析した。

四塩化炭素投与では、肝細胞がネクロシスを起こすことが知られている。ネクロシスを起こした細胞からは DAMPs の一つである HMGB1 が放出され、広く免疫細胞を活性化することが知られている。そこ

で、四塩化炭素投与により傷害を与えたマウスの血清から、HMGB1の存在量をELISA法により定量した。また、その肝臓内でHMGB1と各種免疫細胞のマーカーを抗体により共染色して、HMGB1を認識する細胞種を特定した。次に、単球や好中球をHMGB1で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析した。

C. 研究結果

骨髄中の細胞種の特定

マウス骨髄中の細胞種を特定するため、フローサイトメトリー解析を行った結果、CD11b+/Ly-6G+の好中球が約40%と最も多く存在し、続いてCD11b+/Ly-6C+の単球が約15%存在することが明らかになった。骨髄中に多く存在するこれらの細胞が、線維化の改善に対して、何らかの機能を持つことが示唆された。

線維化改善関連遺伝子の発現比較

好中球と単球間で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子発現を比較解析した。その結果、線維を溶解すると考えられるMMP-8, 9, 13の発現量は、単球より好中球の方が高いことがわかった。一方で炎症抑制性サイトカインであるIL-10の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。このことから、好中球は繊維を溶解し、単球は炎症を抑制することで線維化の改善に寄与することが示唆された。

血清中のHMGB1の定量解析、及び肝臓内におけるHMGB1の蓄積

四塩化炭素投与により傷害を与えたマウスの血清から、HMGB1の存在量をELISA法により定量した。その結果、四塩化炭素投与後24時間から72時間の間、つまり肝細胞の傷害が見られる時間帯に、血清中のHMGB1レベルが高くなることが明らかになった。さらに、肝臓の免疫染色の結果、その時期には肝臓内でもHMGB1が傷害部位に広く蓄積していることがわかった。そして、その蓄積したHMGB1には単球や好中球、好酸球などの免疫細胞が隣接しており、HMGB1を認識して活性化している可能性が示唆された。

HMGB1による単球、好中球への刺激

次に単球や好中球を*in vitro*でHMGB1(1000 ng/ml)24時間刺激したところ、単球ではTNF α やIL-6などのサイトカイン、MIP1やMIP2、MCP-1などのケモカインの発現量が上昇することが明らかになった。一方好中球では、サイトカインの分泌はほぼ見られなかったが、MMP-13の発現量が上昇することが明らかになった。

D. 考察

肝硬変の治療効果を示す細胞種や遊走した細胞が反応する因子を特定することは、ABMi法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で不可欠である。本研究結果により、骨髄中の単球や好中球が重要であることを示唆する結果が得られた。近年では単球や好中球は炎症の抑制にも働く細胞であると考えられており、治療効果が期待できる細胞種である。

また、単球はサイトカインの分泌、好中球は MMP を高発現するなど、その役割の違いを示唆する興味深い結果が得られた。今後は、投与する細胞数やそのタイミング、刺激の有無など様々な条件を検討し、よりよい治療方法を模索していく。

E. 結論

本研究により、骨髄中の単球や好中球が線維化の改善に重要であることが示唆された。しかし、その具体的なメカニズムの解明や、どのような方法がよりよい治療効果を示すかは未だ明らかでない。今後は、上記の点に留意して研究を進め、実際のヒトへの治療法の改善につなげたい。

研究発表

1. 論文発表

1. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development* 27, 169-181, 2013.
2. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013.
3. Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A. $\alpha 1$ - and $\alpha 5$ -Containing laminins regulate the development of bile

ducts via $\beta 1$ -integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586-28597, 2012.

4. Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012.
5. Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012.
6. Komori T., Tanaka M., Senba E., Miyajima A. and Morikawa Y. Lack of Oncostatin M receptor b leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J. Biol. Chem.* 288, 21861-21875, 2013.
7. Miyaoka Y. and Miyajima A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Division* 8, 8, 2013.
8. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol. Cell. Biol.* 34:900-913, 2014.
9. Komori T, Tanaka M, Semba M, Miyajima A, and Morikawa Y. Deficiency of OSMRb exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J. Biol.*

Chem. 289, 13821-13837, 2014.

10. Yagai T, Miyajima A and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *American J. Pathology* Aug;184(8):2250-2259, 2014.

11. Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N and Miyajima A. Mature resting Ly6Chigh natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur. J. Immunology*. Sep;44(9):2638-47, 2014.

12. Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A and Tanaka M. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by affecting adipogenesis and osteoblastogenesis. *PLoS One* 2014 Dec 31;9(12):e116209.

2. 学会発表

1. 谷貝 知樹, 田中稔、宮島篤. 肝再生および肝線維化における Semaphorin 3E の機能, 第 85 回日本生化学会大会. 福岡, 2012 年 12 月 16 日

2. 佐藤 郁、田中稔、宮島篤. オンコスタチン M による骨髓造血環境の制御機構の解明. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012 年 12 月 14 日~16 日.

3. 田中稔、小森 忠祐、森川吉博、仙波恵美子、宮島篤. オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する. 第 85 回日本生化学会、福岡、2012 年 12 月 16 日.

4. 西條栄子、内木隆寛、宮島篤. 肝臓の発生および代謝機能獲得における Tribbles 遺伝子の

役割. 第35回分子生物学会, 福岡, 2012年12月12日

5. 稲垣冬樹、田中稔、稲垣奈都子、國土典宏、宮島篤. 肝炎におけるネフロネクチンの病態生理的意義. 第19回肝細胞研究会, 札幌、2012年6月29日

6. 金子 洸太、伊藤 暢、宮島 篤
A novel 3D imaging technique reveals dynamic behavior of the biliary tree in regenerating livers. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡, 2012 年 12 月 12 日

7. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima, "Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers" International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. Pacifico Yokohama, June 14th, 2012

8. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima. "FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration" Keystone Symposia "Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease" Banff, February 28, 2013.

9. 松田道隆、田中稔、中内啓光、宮島篤、オンコスタチンMによるマウス肝線維化促進機構の解析、第 86 回日本生化学会、横浜、2013.

10. 西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤, 肝線維化における肝臓 M2 様マクロファージの役割, 第 20 回肝細胞研究会。大阪、2013.

11. Yagai T, Tanaka M and Miyajima A, Function of Semaphorin 3E in liver

- fibrosis and regeneration. 第20回肝細胞研究会。大阪、2013.
12. Miyajima A., Liver stem cells in development and regeneration, Asia Pacific Association of Study of Liver Disease, Singapore, June 8, 2013
 13. Omi A, Kuniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Two subsets of mature mouse NK cells based on the expression of Ly6C, 第78回 日本インターフェロン・サイトカイン学会/ 第21回 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同学術集会, 東京、2013.
 14. Omi A, Kuniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature mouse NK cells, 15th International Congress of Immunology, Milano, 2013.
 15. Omi A, Kuniwa T, Enomoto Y, Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature NK cells, 第42回 日本免疫学会学術集会, 幕張、2013.
 16. 佐藤郁、田中稔、宮島篤, Role of Oncostatin M in the bone marrow microenvironment for hematopoiesis, 日本血液学会, 札幌、2013.
 17. 松田道隆 田中稔 宮島篤 Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M, 第20回 肝細胞研究会, 大阪、2013.
 18. 田中稔、谷貝知樹、宮島篤、肝細胞死から見た肝障害後の再生および線維化の制御機構、第86回日本生化学会、横浜、2013.
 19. Tanaka M., Komori T, Matsuda M, Morikawa Y and Miyajima A., Oncostatin M regulates the cross talk between insulin resistance and liver fibrosis by switching the M1/M2 activation of macrophages. International Symposium on Transcription and Metabolism. 淡路島、2013.
 20. 谷貝 知樹、田中 稔、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析, 第86回日本生化学会大会, 横浜、2013.
 21. 松田道隆、田中稔、宮島篤、Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M. FASEB Summer Research Conferences. Keystone Resort (U.S.A.)2014/7/6-11
 22. 松田道隆、田中稔、宮島篤.オコスタチンMによるマウス肝繊維化促進機構の解析. 第28回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 岡山. 2014.12.13.
 23. 谷貝 知樹、松井 理司、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤、田中 稔. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析.第21回 肝細胞研究会。東京、2014.6.27.
 24. 木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤. Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo. 第43回日本免疫学会学術集会. 京都市。2014.12.10.
 25. Tohru Itoh, Seitaro Ino, and Atsushi Miyajima. Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8
 26. Kota Kaneko, Tohru Itoh, Atsushi

Miyajima. Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8.

27. 神元健児、金子洸太、伊藤暢、宮島篤. マウス肝臓の再生過程における胆管系前駆細胞の性状解析. 第47回発生生物学会. 名古屋市. 2014.5.27

28. 宮島篤. 肝臓の炎症・再生－基礎から応用へ. 第35回日本炎症・再生医学会 教育講演 2014.7.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

- 1.特許取得：該当なし
- 2.実用新案登録：該当なし
- 3.その他：なし

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明」

研究分担者氏名 : 仁科 博史
所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構が存在すると考えられるが、その実体は不明な点が多い。我々は免疫系とは独立した異常細胞の排除機構が存在することを発見したので、この機構の解析を目的とした。

【方法】肝臓のサイズと肝がん抑制を制御する Hippo シグナル伝達経路とその標的分子 YAP に注目した。ROSA マウスや免疫不全 NOG マウス等の尾静脈から hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法でプラスミド DNA を導入し、活性型 YAP を発現誘導しモザイク状に異常肝細胞を誘導した。肝臓サイズの測定と共に誘導された異常肝細胞の運命を追跡した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

【成績】活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、遺伝子導入後 3～7 日で排除されることを見出した。免疫不全 NOG マウスでも同様の排除現象が観察されたことから、本現象は免疫非依存的な現象であることが判明した。cDNA アレイ解析の結果、細胞移動や細胞増殖に関与する遺伝子発現の誘導が観察された。

【考案】これまで老化した肝細胞が免疫系によって排除されることが報告されていたが、免疫非依存的な異常肝細胞の排除現象の報告はない。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がること期待される。自己骨髄細胞を用いた療法による効果と関連しているかの検討が重要と考える。

A. 研究目的

自己骨髄細胞を用いた療法はその有効性が示されつつあるが、その作用点は複数あると考えられる。肝臓自身が持つ恒常性維持機構を高める作用もその一つであると考えられる。それ故、肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構を明らかにすることは重要である。また、恒常性維持機構の増強ができれば、予防医学に貢献できる。それ故、本研究では、我々が新たに見出した免疫系とは独立した異常細胞の排除機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

各種のヒトがんに器官サイズを制御する Hippo シグナル伝達経路および標的分子 YAP が関与することが国内外の研究者から報告されている。そこで活性化型 YAP をモ

ザイク状に正常肝臓に導入することで、異常肝細胞を正常肝細胞集団の中に誘導した。モザイク発現を可能にする hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて、マウスの尾静脈からプラスミド DNA を導入した。野生型 B6 マウスや免疫不全マウス NOG マウス、細胞運命を追跡可能な ROSA マウスを用いて、異常肝細胞の運命を解析した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

C. 研究結果

活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、免疫系の有無に関わらず、遺伝子導入後 7 日以内に排除されることを見出した。細胞死による排除ではなく、管腔側への突き出しが原因であった。興味深いことに、抜けた空間を埋めるように代償性増殖も観察され

た。これら誘導された細胞応答は cDNA アレイの結果からも支持された。

D. 考察

本研究で、免疫依存性の異常細胞排除機構に加えて、免疫非依存性の異常細胞排除機構が存在することが明らかになった。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることが期待される。自己骨髄細胞を用いた療法の有効性の一端はこの機構の能力向上であるかを検討することは今後の重要な課題であると考えられる。肝疾患に対する療法のみならず、予防医学への貢献も期待できる。

E. 結論

成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構を発見した。正常肝細胞集団の中に異常な肝細胞が生じると作動する恒常性維持機構と考えられる。本機構に関与する分子機構の解明が期待される。また、自己骨髄細胞を用いた療法による効果との関連が興味深い。

研究発表

1. 論文発表

1. Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajihō, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2012) A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-22098.

2. Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Involvement of the Stress Kinase Mitogen-activated Protein

Kinase Kinase 7 in the Regulation of the Mammalian Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* 287, 8318-8326.

3. Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activate ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 42, 69-77.

4. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki (2012) Cancer Susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122(12):4505-4518.

5. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* 7(1):e29677

6. Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi (2012) Prospective isolation and characterization of bipotent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem*

Cells and Development 21, 1124-1133.

7. Shoji Hata and Hiroshi Nishina (2012) [Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 35443.

8. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) [review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. *J. Signal Trans.* 2012: 459265.

9. Hiroshi Nishina (2012) [commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. *J. Biochem.* 152, 121-123.

10. Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dis Model Mech.* 2014; 6: 905-14.

11. Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, Northrop JP, Lehnertz B, Barsyte-Lovejoy D, Vedadi M, Arrowsmith CH, Nishina H, Gold MR, Rossi FM, Gingras AC, Zaph C. Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 2013; 26(2): 188-94.

12. Arima N, Uchida Y, Yu R, Nakayama K, Nishina H. Acetylcholine Receptors Regulate Gene Expression that Is Essential for Primitive Streak Formation in Murine Embryoid Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 435: 447-53.

13. Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi

Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (*Corresponding authors). YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature*, 2015; in press

14. Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima. Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 457: 493-499.

15. Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namee, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina. The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE* 2014; 9: e97365.

16. Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina. The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014; 443: 917-923.

17. Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol. Cell. Biol.* 2014; 34: 1607-1621.

18. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. *J. Biochem.* 2014; 155: 235-241.

2. 学会発表

1. Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [2012 FASEB Science Research Conference, Aspen, USA, July 2012]

2. Tokiwa Yamasaki and Hiroshi Nishina; Stress-activated protein kinase MKK7

regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [Neuroscience 2012, SfN's 42nd annual meeting, New Orleans, USA, Oct 2012]

3. Shoji Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S_N2 alkylating agents [International Symposium on GENETIC AND EPIGENETIC CONTROL OF CELL FATE, Kyoto, Japan, November 2012]

4. Hiroshi Nishina; Liver Formation and Disease: Lessons from Fish and Mouse [4th World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan, November 2012]

5. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [第9回心血管幹細胞研究会;2012年1月/東京]

6. 仁科博史; Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [東京大学薬学セミナー;2012年1月/東京]

7. 仁科博史; モデル生物を用いた器官形成機構の解明[山口大学医学部セミナー;2012年1月/宇部]

8. 岩月麻美子他; 神経組織特異的 Mkk7 欠損マウスの解析[第132回日本薬学会; 2012年3月/札幌]

9. 梶星治、仁科博史; がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第16回日本肝臓医生物学研究会; 2012年3月/熱海]

10. 宮村憲央、仁科博史；がん遺伝子 YAP による肝細胞がんの発症機構の解明 [第 16 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 3 月／熱海]
11. 仁科博史；質量顕微鏡法 [第 55 回日本腎臓学会学術総会；2012 年 6 月／横浜]
12. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 19 回肝細胞研究会；2012 年 6 月／札幌]
13. 宮村憲央他；がん遺伝子産物 YAP による細胞競合および肝がん誘導系の確立 [第 19 回肝細胞研究会；2012 年 6 月／札幌]
14. 内田好海他；ストレス応答性キナーゼ MKK7 による概日リズム制御機構の解明 [第 11 回生命科学研究会；2012 年 6 月／秋田]
15. 浅岡洋一；ストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割の解明 [第 34 回日本比較生理生化学会；2012 年 7 月／葉山] 第 21 回吉田奨励賞受賞講演
16. 山崎世和他；細胞の生死を制御するストレス応答性 MKK7 の神経系における生理的役割の解明 [第 21 回日本 Cell Death 学会；2012 年 7 月／名古屋]
17. 仁科博史；マウスとメダカから学ぶ肝形成と肝疾患 [秋田大学医学部セミナー；2012 年 8 月／秋田]
18. 有馬誉恵他；神経細胞特異的欠損マウスを用いた概日リズム制御機構におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析 [第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム；2012 年 9 月／福岡]
19. 内田好海他；ストレス応答性 MKK7-JNK シグナル経路による分子時計制御 [第 11 回ファーマバイオフィオーラム 2012；2012 年 9 月／福岡]
20. 平山順他；ストレス応答性リン酸化酵素による概日リズム制御 [第 19 回日本時間生物学会学術大会；2012 年 9 月／札幌]
21. 山崎世和他；JNK signaling is required for the maintenance of motor performance in old-age animals [第 35 回日本神経科学大会；2012 年 9 月／名古屋]
22. 平山順他；Light-dependent UV-tolerance in zebrafish early embryo [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月／京都]
23. 浅岡洋一他；Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. [第 18 回小型魚類研究会；2012 年 9 月／京都]
24. 宮村憲央、仁科博史；がん遺伝子 YAP による肝細胞癌発症機構の解明 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月／旭川]
25. 千葉恭敬、仁科博史；がん遺伝子 YAP 誘導性肝細胞がんのゲノム解析 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月／旭川]
26. 斎藤光介、仁科博史；YAP パラログ TAZ の肝がん誘導能の検討 [第 17 回日本肝臓医生物学研究会；2012 年 10 月／旭川]
27. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズ制御因子 YAP の網膜分化における機能解析 [第 5 回 RRM；2012 年 12 月／東京]
28. 仁科博史；がん遺伝子 *yap* 依存的異常肝細胞の排除と肝細胞がんの発症 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月／福岡]
29. 平山順他；ストレス応答性キナーゼによる概日リズム制御 [第 35 回日本分子生物学会年会；2012 年 12 月／福岡]
30. 畠星治他；がん遺伝子産物 YAP アセチル化サイクルの同定 [第 85 回日本生化学会大会；2012 年 12 月／福岡]
31. Hiroshi Nishina；A novel mouse model of oncogene *yap*-dependent abnormal

- hepatocyte disappearance. [The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, Osaka, September 26-27, 2013]
32. Shoji Hata, Yutaka Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of YAP is triggered to S_N2 alkylating agentnts [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
33. Norio Miyamura and Hiroshi Nishina; A novel mouse model of oncogene yap-dependent abnormal hepatocyte disappearance [Keystone Symposia on The Hippo Tumor Suppressor Network, Monterey USA, May 19-23, 2013]
34. 仁科博史; 異常肝細胞排除現象の発見と機構解明 [第 19 回日本肝臓医生物学研究会; 2013 年 11 月 30 日/札幌]
35. 仁科博史; Roles of Hippo signaling pathway in murine liver [第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 11-13 日/横浜]
36. 仁科博史; 細胞の生死を制御する JNK シグナル伝達系の新規生理機能の解明 [第 22 回日本 Cell Death 学会; 2013 年 7 月 19-20 日/京都]
37. 仁科博史; 肝臓のサイズとがん発症を制御する Hippo シグナル伝達系 [日本生化学会関東支部例会; 2013 年 6 月 15 日/山梨]
38. 仁科博史; ストレス応答性 MKK の生化学・生理機能の解明 [新潟大学医歯学系分子細胞機能学セミナー; 2013 年 3 月 4 日/新潟]
39. 仁科博史; 器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態 [神戸大学医学部セミナー; 2014 年 1 月 10 日/神戸]
40. 仁科博史; Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis [熊本大学 HIGO Program; 2014 年 2 月 12 日/熊本]
41. 内田好海、仁科博史; マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明 [第 20 回日本肝臓医生物学研究会; 2014 年 2 月 15 日/東京]
42. 有馬誉恵、仁科博史; マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析 [第 134 回日本薬学会; 2014 年 3 月 27-30 日/熊本]
43. Ruoxing Yu and Hirohi Nishina; Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs using murine ES cell-derived 3D culture system [第 134 回日本薬学会; 2014 年 3 月 27-30 日/熊本]
44. 仁科博史; 器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態 [東京女子医科大学セミナー; 2014 年 5 月 29 日/東京]
45. 内田好海、仁科博史; スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明 [第 13 回生命科学研究会; 2014 年 6 月 20-21 日/札幌]
46. 浅岡洋一、仁科博史; 器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析 [第 13 回生命科学研究会; 2014 年 6 月 20-21 日/札幌]
47. 宮村憲央、仁科博史; 成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する [第 21 回肝細胞研究会; 2014 年 6 月 27-28 日/東京]

48. 内田好海、仁科博史；スタチン催奇性の分子機構の解明[第 21 回肝細胞研究会；2014 年 6 月 27-28 日／東京]
49. 仁科博史；器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割 [第 23 回日本 Cell Death 学会；2014 年 7 月 18-19 日／東京]
50. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析 [第 23 回日本 Cell Death 学会；2014 年 7 月 18-19 日／東京]
51. 浅岡洋一 他；Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会；2014 年 7 月 28 日～8 月 1 日／札幌]
52. 濱部凜他；ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *Per2* と *Cry1a* の解析 [第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム;2014 年 9 月 20-21 日／富山]
53. 浅岡洋一、仁科博史；Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会；2014 年 9 月 20-21 日／東京]
54. 平山順他；Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish. [第 20 回小型魚類研究会;2014 年 9 月 20-21 日／東京]
55. 濱部凜他；ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *zPer2* および *zCry1a* の解析 [第 3 回修飾シグナル病若手ワークショップ;2014 年 9 月 30-10 月 2 日／湯河原]
56. 宮村憲央、仁科博史；Hippo シグナル系破綻によって誘導されるマウス肝細胞の動態の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会；2014 年 10 月 4-5 日／静岡]
57. 仁科博史；スタチン催奇性誘導機構の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会；2014 年 10 月 4-5 日／静岡]
58. 仁科博史；成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 87 回日本生化学会大会；2014 年 10 月 15-18 日／京都]
59. 平山順他；ゼブラフィッシュ概日リズムの光同調を担うシグナル経路の解析 [第 21 回日本時間生物学会学術大会;2014 年 11 月 8-9 日／福岡]
60. 浅岡洋一、仁科博史；Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構 [第 7 回 RRM；2014 年 11 月 22 日／東京]
61. 仁科博史；がん原遺伝子産物 YAP 依存的肝細胞消失を誘導する新規マウスモデルの確立[第 37 回日本分子生物学会；2014 年 11 月 25-27 日／横浜]
62. 浅岡洋一、仁科博史；網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割[第 37 回日本分子生物学会；2014 年 11 月 25-27 日／横浜]
63. 仁科博史；細胞内シグナル伝達系[秋田大学医学部セミナー;2014 年 12 月 12 日／秋田]
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**
1. 特許取得 ナシ
 2. 実用新案登録 ナシ
 3. その他 ナシ

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「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」

研究分担者氏名 : 小川 佳宏

所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】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んで貪食する組織像として crown-like structure (CLS) が良く知られており、CLS を構成するマクロファージは monocyte attractant protein-1 (MCP-1)/C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2)系を介して浸潤するものと考えられている。我々は、独自に開発した NASH モデルであるメラノコルチン 4 型受容体欠損マウス (MC4R-KO) を用いて、NASH に特徴的な病理組織マーカーである hepatic crown-like structure (hCLS) が炎症・線維化の起点となることを報告した。本研究では NASH 発症過程におけるマクロファージの動態・hCLS 形成における MCP-1/CCR2 系の機能的意義を検討した。

【方法】MC4R-KO マウスに野生型あるいは CCR2-KO マウスの骨髄を移植し、4 週間の回復期間の後に 20 週間の高脂肪食負荷により NASH を誘導した。

【成績】CCR2-KO マウスの骨髄を移植した MC4R-KO マウスでは脂肪組織におけるマクロファージ浸潤と CLS 形成が減少した。肝非実質細胞分画を用いた FACS 解析により CD11b^{hi} 浸潤性マクロファージの消失が確認されたが、肝組織学的解析では対照群と同程度に hCLS が観察され、炎症性マーカーの発現にも変化は認められなかった。肝線維化面積・ α SMA 陽性面積および線維化マーカーの発現にも変化はなかった。

【考案】脂肪組織 CLS とは異なり、hCLS は MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されると考えられた。脂肪を蓄積して細胞死に陥った肝細胞と常在性マクロファージの相互作用によりマクロファージの機能的変化が誘導され、炎症・線維化機転が促進されることが示唆された。

研究協力者氏名 : 菅波 孝祥、伊藤 美智子

A. 研究目的

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ており、栄養性に肝硬変や肝癌を発症する病態として注目されている。肥満の程度が比較的軽度の本邦においても成人の約 30%に脂肪肝が認められ、NASH の有病率は約 1%にのぼると想定されている。今後、NASH を原因とする肝硬変・肝癌の増加が予測されるため、病態の理解と予防あるいは早期の治療が喫緊の課題である。

従来、肥満に合併する糖脂質代謝障害を背景とし、NASH を経て肝細胞癌を発症す

る動物モデルが存在しないことが、NASH 研究の障壁となってきた。我々は、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体欠損マウス (MC4R-KO マウス) が、高脂肪食負荷により脂肪肝から NASH・肝細胞癌を発症することを報告し (Am. J. Pathol. 179: 2454-2463, 2011)、本モデルを用いて NASH の病態解明に取り組んできた。

近年、全身の軽度の慢性炎症がメタボリックシンドロームの基盤病態を形成することが明らかになってきた。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) がよく知られており (J. Lipid Res. 46: 2347-2355, 2005)、CLS を構成するマクロファージは CD11c 陽性であることが

報告されている (J. Clin. Invest. 117: 175-184, 2007)。昨年度までに我々は NASH を発症した MC4R-KO マウスの肝臓では細胞死に陥った肝実質細胞をマクロファージが取り囲む組織像 (hCLS: hepatic crown-like structure) が多数認められること、hCLS 数は肝線維化面積と正の相関を示すこと、hCLS 近傍にコラーゲンの沈着および α SMA 陽性筋線維芽細胞が認められることを見出した (PLoS ONE 8: e82163, 2013)。さらに、hCLS はヒト NAFLD/NASH においても認められることを確認している。本年度は、hCLS を構成するマクロファージの動態を解析した。

B. 研究方法

1. マウス骨髄移植

骨髄ドナーとして GFP および CCR2-KO マウスの大腿骨、脛骨を採取し、周辺の筋肉を除去後に両端を切断した。3%FBS/PBS にて骨髄細胞をフラッシュし、ACK バッファーを用いて溶血処理を行った。骨髄細胞を PBS にて洗浄し、 1×10^7 個/ml になるように調整した。レシピエントである野生型および MC4R-KO マウスに 7.5Gy の γ 線照射を行い、骨髄液を 0.3ml ずつ尾静脈より投与した。4 週間の回復期間を置き、骨髄が 90%以上置換されていることを確認し、高脂肪食負荷を行った。

2. 肝非実質細胞分画の FACS 解析

麻酔下にマウスの腹部を切開し、門脈から PBS15ml を灌流した。1 個体につき 5ml の Hanks' Balanced Salt Solution (Ca, Mg (+)) / type IV collagenase 1mg/ml / DNaseI 50 μ g/ml) を使用し、GentleMACS (Miltenyi 社)を用いて細胞を分散した。30%

Percoll に懸濁して 1800rpm, 4°C, 15min 遠心し、沈殿した細胞を肝非実質細胞分画として使用した。 1×10^6 個の細胞を 50 μ l の FACS バッファーに懸濁し、Fc block 後に CD45, CD11b, F4/80 抗体を各 0.5 μ l ずつ加え、氷上で 10min 反応させた。細胞をバッファーで洗浄し、死細胞除去のため 7-AAD を加えて FACS 解析に供した。

3. 組織学的解析

脂肪組織および肝臓を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成した。Sirius red 染色および F4/80・ α SMA 免疫染色を行い、画像解析ソフト Winroof (Mitani Co.) を用いて Sirius red・F4/80・ α SMA 陽性面積を測定した。脂肪組織における F4/80 陽性細胞数、CLS 数、および肝臓における hCLS 数は目視にてカウントし、単位 mm² 当りに換算した。

C. 研究結果

1. 脂肪組織の解析

精巢上体周囲脂肪組織の F4/80 染色を行ったところ、野生型マウスと比較して MC4R-KO マウスでは F4/80 陽性マクロファージが増加しており、CLS 数も著明に増加していた (図 1)。骨髄の CCR2 を欠損すると浸潤マクロファージ数、CLS 数は有意に減少した (図 1)。

2. 肝臓におけるマクロファージ分画の変化

肝臓の非実質細胞分画の FACS 解析において、CD45 陽性細胞を F4/80、CD11b にて展開すると、F4/80 を高発現するマクロファージ (F4/80^{hi}) と、CD11b を高発現するマクロファージ (CD11b^{hi}) が存在することが知られている。NASH の発症により

F4/80^{hi} マクロファージの割合に変化は認められなかったが、CD11b^{hi} マクロファージ分画が著明に増加し、骨髄の CCR2 を欠損することによりこの変化が消失することが明らかになった (図 2)。

3. 肝臓における炎症・線維化変化

F4/80 染色では骨髄の CCR2 を欠損しても対照群の MC4R-KO マウスと同程度に F4/80 陽性細胞が認められ、hCLS の数にも変化はなかった (図 3)。また、炎症性マーカーである TNF α や CD11c の発現にも変化は認められなかった (図 3)。HE 染色では NASH に特徴的とされる肝細胞風船様変性や炎症細胞浸潤も同等に認められ、線維化・ α SMA 陽性面積、線維化マーカー (COL1A1, TIMP1) の発現にも変化はなかった (図 4)。

D. 考察

MC4R-KO マウスにおいて骨髄の CCR2 を欠損させると脂肪組織へのマクロファージ浸潤、CLS 形成が抑制されたことから、既報と同様に脂肪組織 CLS は MCP-1/CCR2 系を介して浸潤したマクロファージが寄与していると考えられた。一方、肝臓では FACS 解析において認められる CD11b^{hi} マクロファージは MCP-1/CCR2 系依存的と考えられ、hCLS は F4/80^{hi} マクロファージが中心となり、MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されることが示唆された。

これまでの検討において hCLS が炎症・線維化の起点となって NASH の病態形成に寄与することが示唆されている。hCLS の形成機序や機能的変化には不明な点も多いが、hCLS の詳細を明らかにすることで、これまで原因が不明であった NASH の発

症機序を解明する重要な手がかりとなり、新規バイオマーカーの探索や新しい治療法の開発に繋がると期待される。

E. 結論

脂肪組織 CLS とは異なり、hCLS は MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されることが示唆された。脂肪を蓄積して細胞死に陥った肝実質細胞と常在性マクロファージの相互作用によりマクロファージの機能的変化が誘導され、炎症・線維化機転が促進されることが示唆された。

研究発表

1. 論文発表

1. Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care* 2012; 35:2631-2639
2. Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 2012; 61:1199-1209
3. Y. Iwasaki, T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M.

Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai, Y. Miyamoto, Y. Ogawa. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes* 63: 152-151, 2014.

4. M. Itoh, H. Kato, T. Suganami, K. Konuma, Y. Marumoto, S. Terai, H. Sakugawa, S. Kanai, M. Hamaguchi, T. Fukaishi, 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.

5. 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.

6. M. Tanaka, K. Ikeda, T. Suganami, C. Komiya, K. Ochi, I. Shirakawa, M. Hamaguchi, S. Nishimura, I. Manabe, T. Matsuda, K. Kimura, H. Inoue, Y. Inagaki, S. Aoe, S. Yamasaki, Y. Ogawa. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun* 5: e4982, 2014.

2. 学会発表

1. Suganami T, Itoh M, Tanaka M, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y,

Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. 2012 Keystone Symposia, Boston, US, 2012

2. 小川佳宏, メタボリックシンドロームと自然炎症, 第49回日本臨床分子医学会学術集会, 京都, 2012

3. 菅波孝祥, 小川佳宏, 脂肪組織炎症における飽和脂肪酸の意義, 第85回日本内分泌学会学術総会, 名古屋, 2012

4. 菅波孝祥, 小川佳宏, 慢性炎症とインスリン抵抗性, 第55回日本糖尿病学会年次学術集会, 横浜, 2012

5. 菅波孝祥, 小川佳宏, 脂肪組織の慢性炎症と飽和脂肪酸, 第33回日本炎症・再生医学会, 福岡, 2012

6. 伊藤美智子, 菅波孝祥, 小沼邦葉, 丸本芳雄, 寺井崇二, 坂井田功, 小川佳宏: NASHの病勢を反映する病理組織マーカー: 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

7. 伊藤美智子, 菅波孝祥, 小沼邦葉, 丸本芳雄, 寺井崇二, 佐久川廣, 坂井田功, 小川佳宏: NASH発症における hepatic crown-like structureの意義: 第34回日本肥満学会, 東京, 2013/10/12

8. 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, 宮崎, 2014/10/24

9. 加藤秀昭, 伊藤美智子, 菅波孝祥, 小沼邦葉, 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,

大阪、2014/5/24

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

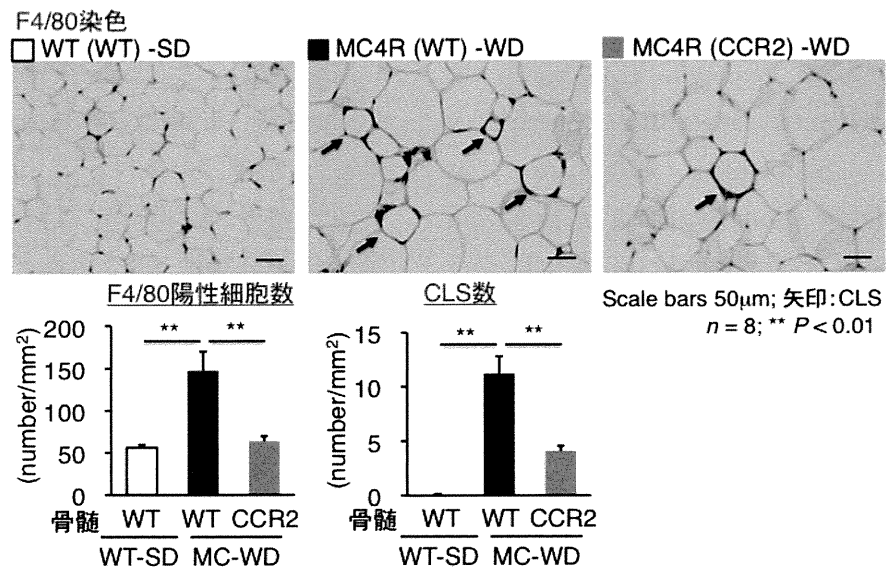


図1. 脂肪組織を用いた組織学的解析

WT: 野生型, MC4R: MC4R-KO, CCR2: CCR2-KO, 括弧内は骨髄
SD: 通常食, WD: 高脂肪食

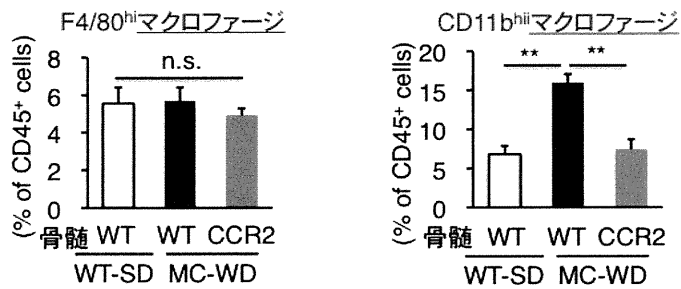


図2. 肝非実質細胞分画を用いたFACS解析

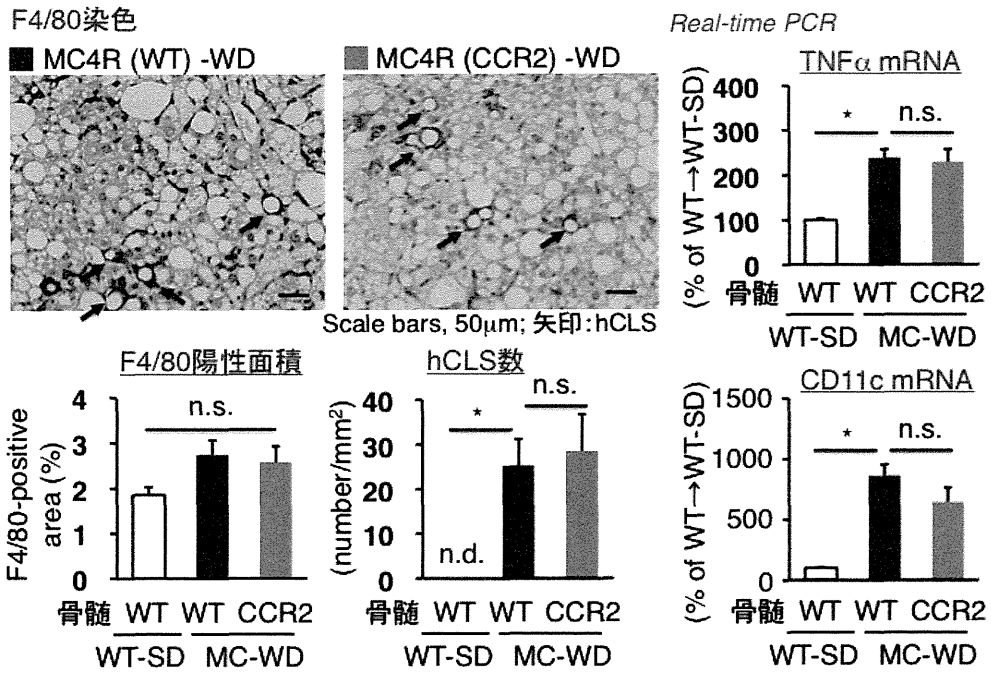


図3. 肝臓における炎症性変化

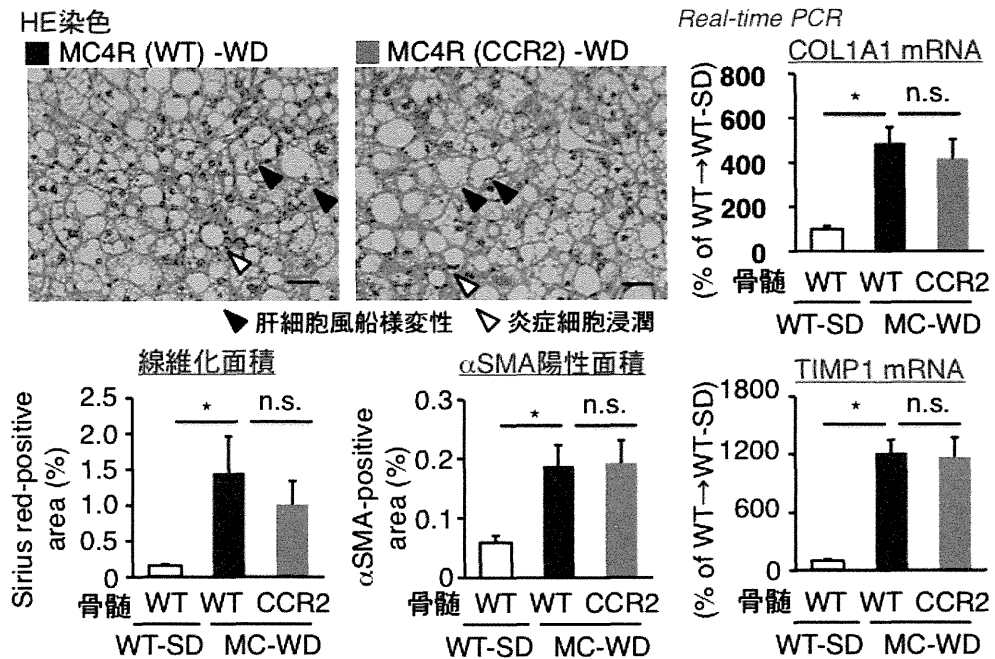


図4. 肝臓における線維化変化