

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・αSMA 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 , 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 \cdot 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 \cdot F4/80 \cdot 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 当たり 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

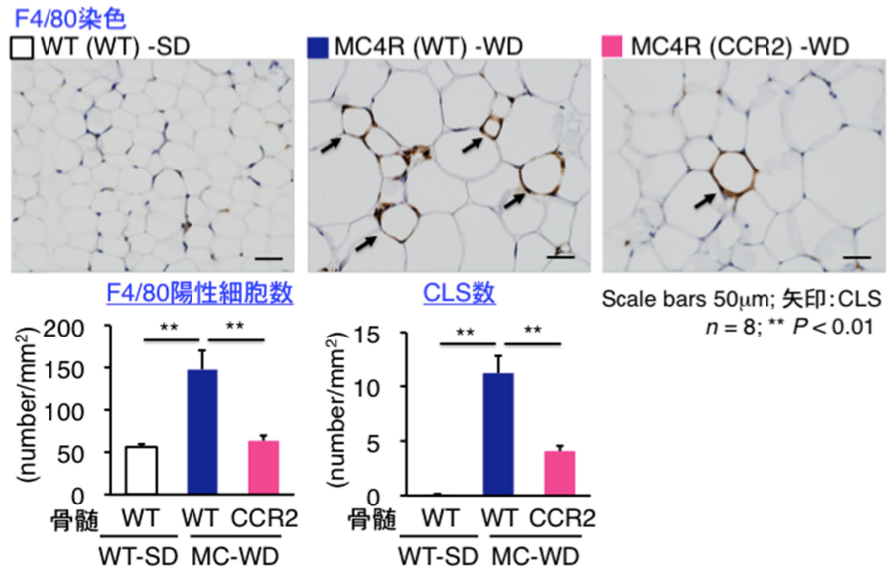


図1. 脂肪組織を用いた組織学的解析

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

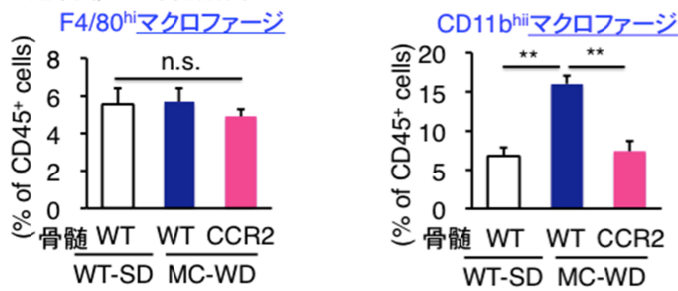


図2. 肝非実質細胞分画を用いたFACS解析

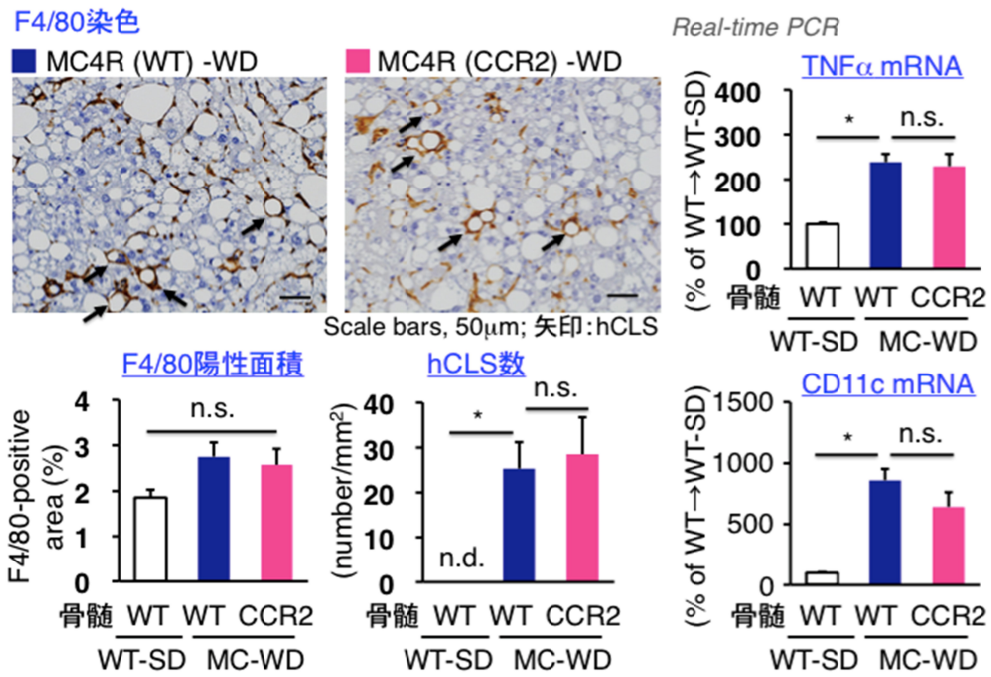


図3. 肝臓における炎症性変化

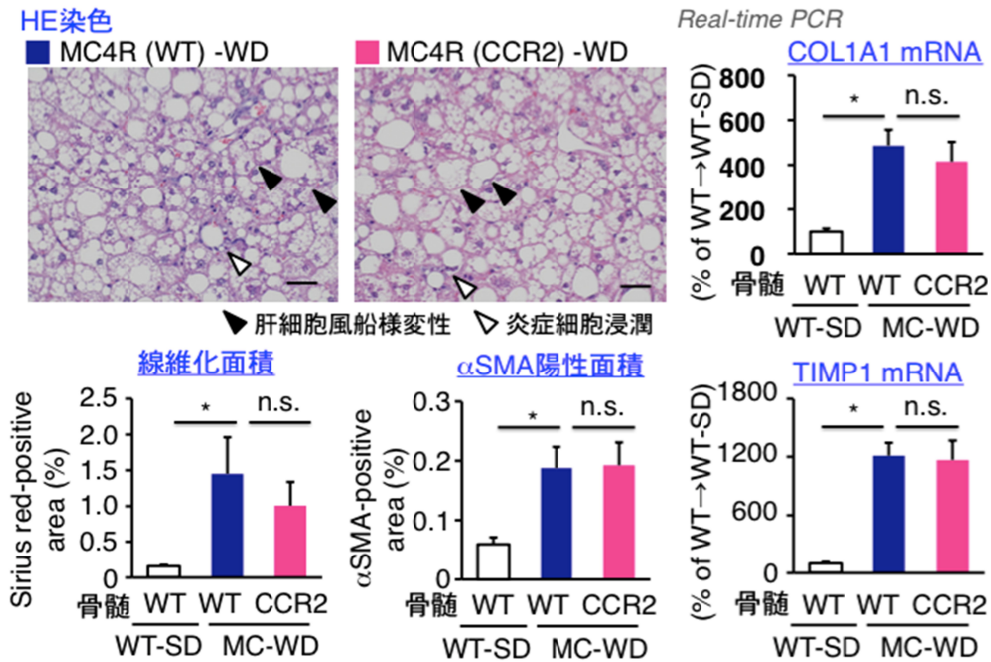


図4. 肝臓における線維化変化