

40. 過栄養による代謝性組織リモデリングの分子機構の解明

菅波 孝祥

名古屋大学 環境医学研究所 分子代謝医学分野

Key words : 慢性炎症, 非アルコール性脂肪肝炎, 肥満, マクロファージ

緒言

近年、肥満を中心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、「慢性炎症」の重要性が注目されている。慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な細胞間コミュニケーションが持続し、最終的には間質の線維化を来して臓器機能不全に至る。最近、我々は、crown-like structure (CLS) と呼ばれる特徴的な組織像が肥満の脂肪組織や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に共通して形成され、ここを起点として組織線維化が進行することを見出した^{1,2)}。CLS では、脂肪を過剰に蓄積して細胞死に陥った実質細胞 (肝細胞、脂肪細胞) をマクロファージが取り囲み、貪食・処理している。即ち、CLS は、臓器局所における実質細胞と間質細胞の細胞間相互作用の場であり、過栄養に伴う「代謝性組織リモデリング」の駆動エンジンとして働いている。

最近、我々は、死細胞センサーの macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) が脂肪組織 CLS を構成するマクロファージに局在し、組織線維化の鍵分子として働くことを見出した^{1,3)}。また、脂肪組織 CLS は、代表的なケモカインの monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) を介して浸潤マクロファージにより形成される⁴⁻⁶⁾。これに対して、肝臓 CLS に関しては不明の点が多い。我々は、種々の NASH 動物モデルやヒト NASH 症例において CLS が認められること、脂肪組織と同様に、CD11c 陽性マクロファージにより構成され、肝臓の組織線維化の起点となっていることを明らかにした^{2,7,8)}。興味深いことに、CLS は慢性ウイルス性肝炎症例では観察されなかったため、CLS を起点とする組織線維化は代謝性肝障害に特徴的な分子メカニズムと言える。そこで本研究では、肝臓 CLS の形成過程を詳細に解析することにより、過栄養による代謝性組織リモデリングの分子機構を明らかにすることを目的とした。

方法

1. マウスおよび飼料

遺伝性肥満を呈するメラノコルチン 4 型受容体 (*MC4R*) 欠損マウスは、テキサス大学の Joel K. Elmquist 博士より分与を受けた。8 週齢雄性 *MC4R* 欠損マウスおよび対照 C57BL/6J マウスに対して、通常食 (日本クレア CD-2; 343.1 kcal/100 g, 脂質 12.6% (エネルギー)) あるいはウェスタンダイエット (Research Diets D12079B; 468 kcal/100 g, 脂質 41% (エネルギー), 蔗糖 34.0% (重量), コレステロール 0.21% (重量)) を最大 20 週間負荷し、解析に供した。ケモカイン受容体 *CCR2* 欠損マウスは Protein Design Laboratories の William A. Kuziel 博士より、*CD169*DTR マウスは東京薬科大学の田中正人博士より分与を受けた。*CD169*DTR マウスは、ジフテリア毒素の投与により *CD169* 発現細胞の選択的に消去することが可能であり、*CD169* 発現細胞の意義を検討することができる。

2. NASH モデル

既に報告したように、*MC4R* 欠損マウスに対してウェスタンダイエットを負荷することにより、肥満やインスリン抵抗性を背景に、脂肪肝、NASH、肝細胞癌を経時的に発症する NASH モデルを確立している⁹⁾。さらに、本研究では、誘導性に NASH を発症する新たな動物モデルを使用した。即ち、ウェスタンダイエットを 4 週間負荷した *MC4R* 欠損マウスに対して四塩化炭素 (0.1 ml/kg 体重) を 1 回のみ投与すると、肝細胞障害、肝細胞死、肝臓 CLS 形成に引き続き、肝線維化が約 1 週間の過程で形成され、NASH に矛盾しない病理組織像が得られた。四塩化炭素は、オリブオイルで 40 倍に希釈の後、*MC4R* 欠損マウスに腹腔内投与した。

3. 骨髄移植法

CCR2欠損マウス、CD169-DTR マウスおよび対照野生型 C57BL/6J マウスより骨髄細胞を調製し、 3.6×10^6 個/個体を 7.5 Gy の全身照射を行った MC4R 欠損マウスの静脈内に投与した。4 週間の回復期間の後、通常食あるいはウェスタンダイエットを負荷し、解析に供した。

4. 肝組織マクロファージ（クッパー細胞）の標識

クッパー細胞と単球由来マクロファージを生体内で区別するために PKH26 細胞リンカーキットを用いた。即ち、PKH26 蛍光色素 0.2 ml/個体を MC4R 欠損マウスに投与し、全身の単球・マクロファージ系細胞を標識した後、2 週間の間隔を空けることにより、細胞寿命の短い単球は標識が消失し、細胞寿命の長い組織マクロファージは染色が維持される状態を作製した。

5. リアルタイム PCR

肝臓より total RNA を抽出、cDNA を作製した後に、StepOnePlus (Applied Biosystems) を用いて遺伝子発現を検討した。

6. フローサイトメトリー解析

採取した肝臓を IV 型コラゲナーゼ (Sigma) と DNaseI (Roche) により消化した後、gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて分散し、フローサイトメトリー解析に供した。

7. 組織学的解析

4 μ m 厚のパラフィンおよび新鮮凍結切片を作製し、F4/80 (マクロファージ)、 α SMA (活性化線維芽細胞)、CD11c (M1 マクロファージマーカー) 抗体などを用いて免疫染色を施行した。

8. 統計解析

データは、平均 \pm 標準誤差で示し、*P < 0.05, **P < 0.01 を有意とした。有意差検定は、Tukey-Kramer 試験を用いて行った。

結 果

1. 肝臓 CLS 形成における CCR2 の意義 (図 1)

脂肪組織と肝臓における CLS は、実質細胞の細胞死を CD11c 陽性マクロファージが取り囲むなど組織学的に類似点が多い¹⁻³⁾。肥満の脂肪組織では、CCR2 依存性に浸潤する単球由来マクロファージが CLS を形成するため⁴⁻⁶⁾、NASH における肝臓の CLS 形成に CCR2 が関与するか否かを検討した。骨髄移植法により、骨髄細胞特異的に CCR2 を欠損する MC4R 欠損マウスを作製し、4 週間の回復期間の後にウェスタンダイエットを 20 週間負荷した。我々を含む多くの施設が既に報告しているように、骨髄細胞で CCR2 を欠損すると、MC4R 欠損マウスにおいても、脂肪組織のマクロファージ浸潤、CLS 形成、炎症性サイトカイン発現は顕著に抑制され、全身の糖代謝も良好に保たれた。一方、肝臓においても、浸潤マクロファージの細胞数は著明に抑制されたが、CLS 形成や肝線維化は全く変化がなかった。即ち、肝臓 CLS 形成に MCP-1 や浸潤マクロファージは必須でないことが明らかになった。なお、骨髄細胞の CCR2 発現は、MC4R 欠損マウスの体重増加には影響を及ぼさなかった。

F4/80染色

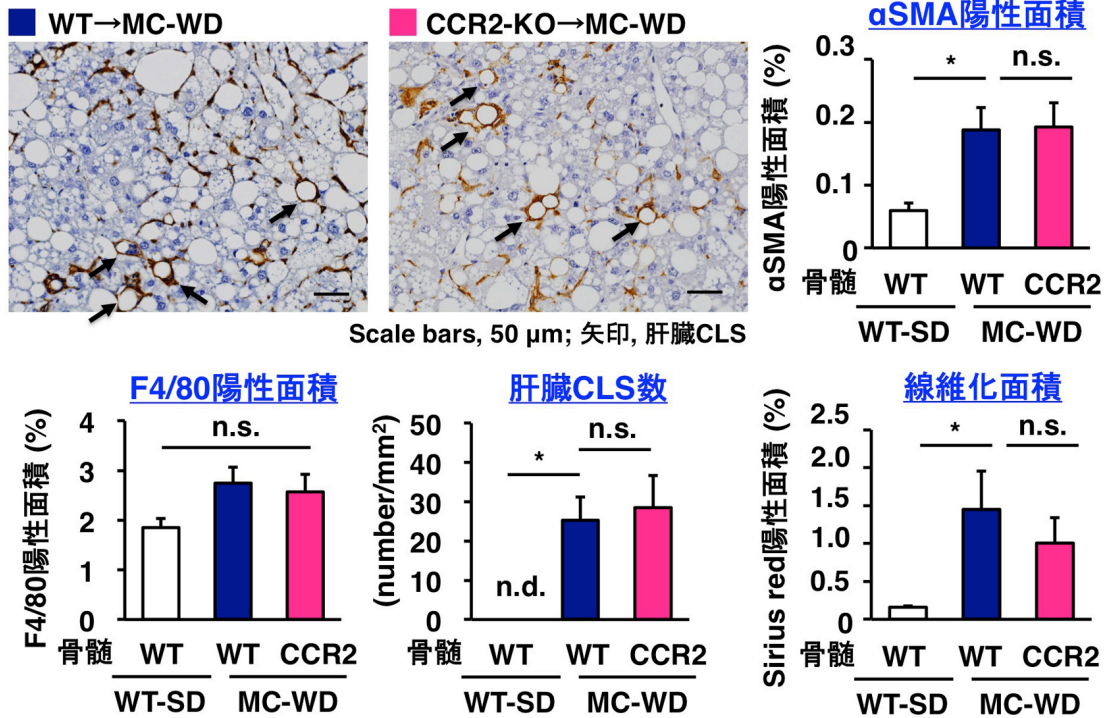


図1. 肝臓 CLS 形成における CCR2 の意義

CCR2欠損マウスの骨髄を MC4R欠損マウスに移植して、4週間の回復期間の後にウェスタンダイエットを20週間負荷した。

2. 肝臓 CLS 形成における組織マクロファージの意義

上述の結果を踏まえて、肝臓 CLS 形成に肝臓マクロファージ（クッパー細胞）が関与する可能性を検討した。即ち、PKH26を用いて MC4R欠損マウスの単球・マクロファージを標識した後、四塩化炭素を投与して誘導性 NASH モデルを作製した。PKH26を投与後、2週間後に四塩化炭素を投与することにより、末梢血単球は PKH26 陰性、クッパー細胞は PKH26 陽性となることをフローサイトメーターにより確認した。この状態において誘導性 NASH モデルを作製したところ、CLS 構成マクロファージの大部分が PKH26 陽性であることが判明した。これにより、肝臓 CLS は主にクッパー細胞により形成されることが明らかになった。

3. 肝臓 CLS 形成における CD169 陽性マクロファージの意義 (図2)

近年、各臓器に常在する組織マクロファージには臓器特異性があり、各臓器の恒常性維持に重要な役割を果たすことが知られている。クッパー細胞のマーカースとして CD169 や clec4f などが知られているため、本研究では、ジフテリア毒素を用いて CD169 陽性マクロファージを消去し、肝臓 CLS 形成に及ぼす影響を検討した。即ち、CD169 陽性マクロファージを消去した後に誘導性 NASH モデルを作製すると、肝細胞障害や肝細胞死は惹起されたものの、肝臓 CLS や肝線維化は形成されなかった。一方、肝臓 CLS を構成するマクロファージは CD11c が陽性 (F4/80hi CD11c+ CD169+) であり、散在性に存在するクッパー細胞 (F4/80hi CD11c- CD169+) とは表面マーカーが異なることより、クッパー細胞が細胞死に陥った肝細胞と相互作用することにより形質転換した可能性が示唆される。

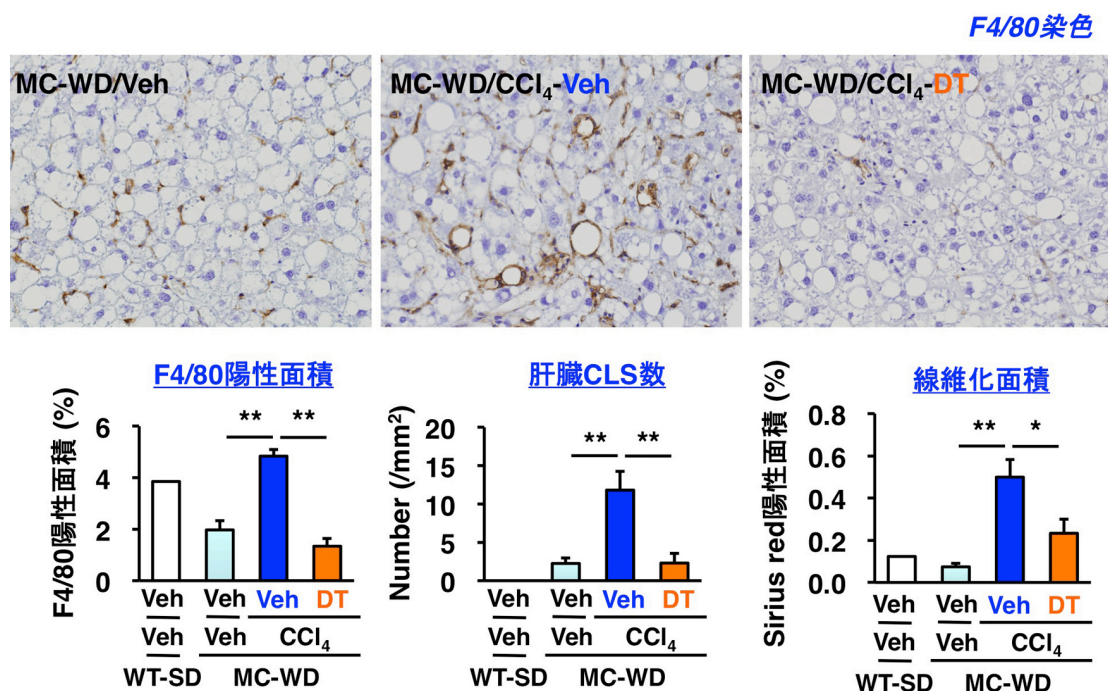


図2. 肝臓 CLS 形成における CD169 陽性細胞の意義

CD169 プロモーター制御下にジフテリア毒素受容体を発現する *CD169*-DTR マウスの骨髄を *MCAR* 欠損マウスに移植して、4 週間の回復期間の後に誘導性 NASH モデルを作製した。

考 察

CLS は、肥満の脂肪組織において 2003 年に初めて報告された特徴的な組織像であり、肥満の過程で過剰に脂肪を蓄積した脂肪細胞が細胞死に陥って、これをマクロファージが取り囲んで、貪食・処理する像とされる。CLS は CD11c 陽性マクロファージで構成され、CLS の数は全身のインスリン抵抗性とも相関するなど、肥満における病態生理的意義が精力的に研究されてきた。我々は、肥満の脂肪組織における慢性炎症の結果、CLS を起点として脂肪組織線維化が誘導されることを見出した。一方、我々は、脂肪肝から NASH を発症する過程において、肝細胞死を起点とする CLS が肝線維化に働くことを報告している。このように、脂肪組織と肝臓の CLS は病理組織的、病態生理的に非常に共通点が多いが、本研究により、構成細胞やその由来の違いが初めて明らかになった。従来より、貪食能の低下など NASH におけるクッパー細胞の機能異常が報告されていたが、NASH 病態形成における意義は明確でなかった。細胞死に陥った肝細胞のクリアランスが低下することにより、炎症反応が遷延化して肝臓 CLS を起点とする肝線維化に繋がる可能性がある。近年、炎症促進性 M1 と炎症抑制性 M2、浸潤マクロファージと組織マクロファージなど、従来のシンプルな分類では説明できないマクロファージの多様性が注目されており、実際、肺の線維化を制御する新たなマクロファージ重集団が報告されるなど¹⁰⁾、疾患特異的マクロファージの概念が提唱されている。また、肥満の脂肪組織では死細胞センサーの Mincle が線維化の鍵分子として働くが、NASH の肝臓において Mincle に相当する死細胞センサーを同定する必要がある。このように、本研究で明らかになった CLS の臓器特異性や疾患特異性は、慢性炎症を標的とする治療戦略を開発する上で重要な知見と考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科の小川佳宏、伊藤美智子である。

文 献

- 1) Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. *Nat Commun*. 2014 Sep 19;5:4982. doi: 10.1038/ncomms5982.
- 2) Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. 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. *PLoS One*. 2013 Dec 11;8(12):e82163. doi: 10.1371/journal.pone.0082163.
- 3) Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. Ichioka M, Suganami T, Tsuda N, Shirakawa I, Hirata Y, Satoh-Asahara N, Shimoda Y, Tanaka M, Kim-Saijo M, Miyamoto Y, Kamei Y, Sata M, Ogawa Y. *Diabetes*. 2011 Mar;60(3):819-26. doi: 10.2337/db10-0864.
- 4) Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. Ito A, Suganami T, Yamauchi A, Degawa-Yamauchi M, Tanaka M, Kouyama R, Kobayashi Y, Nitta N, Yasuda K, Hirata Y, Kuziel WA, Takeya M, Kanegasaki S, Kamei Y, Ogawa Y. *J Biol Chem*. 2008 Dec 19;283(51):35715-23. doi: 10.1074/jbc.M804220200.
- 5) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26602-14.
- 6) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. *J Clin Invest*. 2006 Jun;116(6):1494-505.
- 7) Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using melanocortin 4 receptor-deficient mice. Konuma K, Itoh M, Suganami T, Kanai S, Nakagawa N, Sakai T, Kawano H, Hara M, Kojima S, Izumi Y, Ogawa Y. *PLoS One*. 2015 Mar 27;10(3):e0121528. doi: 10.1371/journal.pone.0121528.
- 8) Antifibrotic effect of pirfenidone in a mouse model of human nonalcoholic steatohepatitis. Komiya C, Tanaka M, Tsuchiya K, Shimazu N, Mori K, Furuke S, Miyachi Y, Shiba K, Yamaguchi S, Ikeda K, Ochi K, Nakabayashi K, Hata KI, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y. *Sci Rep*. 2017 Mar 17;7:44754. doi: 10.1038/srep44754.
- 9) Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, Terai S, Sakaida I, Ogawa Y. *Am J Pathol*. 2011 Nov;179(5):2454-63. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.014.
- 10) Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanogoh A, Akira S. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):96-101. doi: 10.1038/nature20611.