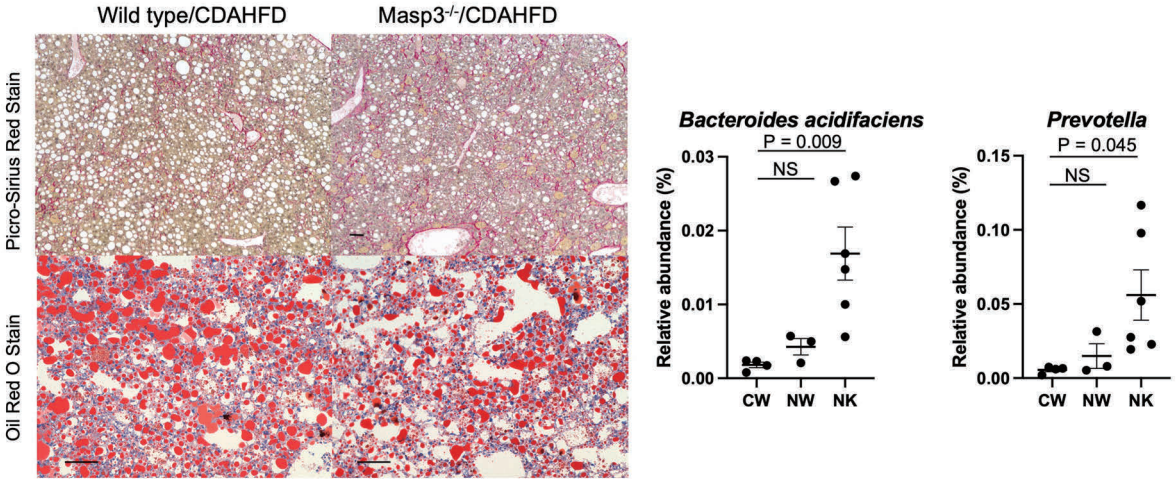
173　非アルコール性脂肪肝疾患の腸肝軸と補体MASP-3	林　学

【目的】非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は肝硬変へ進行しうる慢性肝疾患であるが有効な治療方法がいまだなく進行の抑制が困難であることから病態解明と新規治療法が必要とされている。NAFLD では腸管と肝臓の病態が相互に影響する腸肝軸（Gut-liver axis）が病態形成に影響している。NAFLD では腸内細菌叢の異常を来し肝臓の炎症と線維化へ悪影響を及ぼしている。補体は病原体や死細胞の排除により生体の恒常性を維持する役割を担っている自然免疫因子であり、補体活性化経路における第二経路は補体活性化の中心的な役割を果たしている。過剰な補体活性化は様々な疾患に影響しているが、NAFLD の病態にも補体活性化が影響していることが報告されている。Mannose-binding lectin-associated serine protease-3（MASP-3）は補体第二経路の活性化に重要なセリンプロテアーゼであるが NAFLD における腸肝軸と補体 MASP-3 の関連は未解明である。

【方法】*MASP-3* 欠損 C57BL/6 マウス（*MASP-3* 欠損マウス）を CRISPR/Cas9 システムにより作製した。超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料（CDAHFD）飼料を 24 週間投与することで NAFLD モデルマウスを作製した。NAFLD モデルマウスの表現型を野生型マウスと *MASP-3* 欠損マウスで比較した。肝組織の Picro-Sirius Red 染色で肝線維化を評価した。肝組織の脂肪沈着を Oil red O 染色により評価した。盲腸内容物の DNA を用いたアンプリコンシーケンス解析により腸内細菌叢を解析した。

【結果】CDAHFD 飼料を投与した野生型 NAFLD モデルマウスでは肝線維化が認められたが、*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスでは野生型 NAFLD モデルマウスに比べてより高度の肝線維化が認められた。*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスで肝脂肪沈着の増加を認めたが、野生型 NAFLD モデルマウスに比べると脂肪沈着は軽度であった。次にマウスの盲腸内容物を採取し腸内細菌叢を 16S rDNA 部分塩基配列を標的として解析した。*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスではα多様性の変化量が低下し、β多様性は similarity が低下していた。さらに *MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスでは *Bacteroides acidifaciens* および *Prevotella* の relative abundance の上昇が認められた。本研究では、*MASP-3* 欠損により NAFLD モデルマウスの肝線維化は増悪している一方で、肝脂肪沈着は軽減しており、さらに腸内細菌叢は NAFLD に対して保護的な環境へ変化している可能性があると考えられた。*MASP-3* 欠損による NALFD の肝線維化増悪のメカニズムの解明は MASP-3 に着目したヒトの NALFD の疾患診断や新たな治療方法の創出に寄与できる可能性があると考えられた。

非アルコール性脂肪肝疾患モデルマウスにおける MASP-3 の影響



173. 非アルコール性脂肪肝疾患の腸肝軸と補体 MASP-3

林　学

福島県立医科大学 医学部 消化器内科学講座

Key words：非アルコール性脂肪肝疾患，補体，MASP-3，腸内細菌叢

緒　言

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は肝硬変へ進行しうる慢性肝疾患であるが、有病率が高いにもかかわらず有効な治療方法がなく、疾患が進行することで肝硬変へ至ることを抑制することが困難である。そのため病態の解明と新規治療法が必要とされている。NAFLD では腸管と肝臓の病態が相互に影響する腸肝軸（Gut-liver axis）がその病態形成に強く影響を及ぼしている。嫌気性グラム陰性桿菌が増加する腸内細菌叢の異常を来し、腸管壁透過性が亢進による血中 lipopolysaccharide（LPS）の増加が認められ肝組織へ LPS が沈着することで肝炎症と線維化が進行する［1］。腸肝軸における障害機序の解明は NAFLD の新たな治療方法の創出に寄与すると考えられる。

補体は補体因子 C3 の活性化により病原体や死細胞の排除を行い生体の恒常性維持に重要な役割を担っている自然免疫因子である。複数の活性化経路が知られているが、特に第二経路は他経路の増幅経路として補体活性化の中心的な役割を果たしている。過剰な補体活性化は様々な疾患に影響しているが、NAFLD 患者の肝臓では補体活性化による C3 の沈着が認められ、補体第二経路の活性化抑制因子である Factor H が欠損したマウスでは過剰な補体活性化と肝脂肪化を伴う肝障害を呈していることから［2］、NAFLD では補体第二経路が関連していることが推測される。Mannose-binding lectin-associated serine protease（MASP）-1 と MASP-3 は *MASP1* 遺伝子のスプライシングバリアントであり、MASP-3 は補体第二経路の活性化に重要なセリンプロテアーゼであるが、NAFLD における腸肝軸と補体 MASP-3 の関連は未解明である。本研究では NAFLD の腸肝軸における補体活性化因子である MASP-3 の役割を解明することを目的として、*MASP-3* 欠損マウスを用いて実験を行った。

方　法

1. *MASP-3* 単独欠損マウスを用いた NAFLD モデルマウスの作製

MASP-3 欠損 C57BL/6 マウス（MASP-3 欠損マウス）を CRISPR/Cas9 システムにより作製した。MASP-1 および MASP-3 は *Masp1* 遺伝子のスプライシングバリアントであり、MASP-1 と MASP-3 は共通構造とそれぞれの特異的なセリンプロテアーゼドメインにより構成されている。MASP-3 特異的セリンプロテアーゼドメインの前後に相補的ガイド RNA を設計することで *MASP-3* 単独欠損マウスを作製した［3］。NAFLD モデルマウスは 8 週齢の野生型 C57BL/6 マウス（野生型マウス）と *MASP-3* 欠損マウスへ超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料（CDAHFD）飼料（#A06071302、Research Diets、New Brunswick、NJ、USA）を 24 週間の投与することで作製した。対照群は野生型マウスへコントロール飼料（#A06071314、Research Diets）を 24 週間投与し評価した。NAFLD モデルマウスの表現型を野生型マウスと *MASP-3* 欠損マウスで比較した。

2. 肝病態の評価

コントロール飼料、または CDAHFD 飼料を 24 週間投与後にそれぞれのマウスの肝線維化、肝脂肪沈着を解析した。肝組織の Picro-Sirius Red 染色で肝線維化を評価した。肝組織の脂肪沈着を Oil red O 染色により評価した。Picro-Sirius Red 染色、Oil red O 染色による面積を ImageJ（National Institutes of Health）を用いて測定した。

3. 腸内細菌叢の解析

盲腸内容物の DNA を用いて 16S rDNA 部分塩基配列を標的としたアンプリコンシーケンス解析により微生物群集構造を解析した。α多様性を Chao1 index、Shannon index、Simpson index を用いて評価した。β多様性は各群の Bray-Curtis 距離を Analysis of similarities により解析した。

結果および考察

1. NAFLD モデルの肝病態へ対する *MASP-3* 欠損の影響

まず *MASP-3* 欠損が脂肪肝モデルマウスにおける肝線維化へ与える影響を評価した。コントロール飼料、CDAHFD 飼料を 野生型マウス、そして *MASP-3* 欠損マウスへ 24 週間投与した。肝線維化を評価するために肝組織に対して Picro-sirius red 染色を行ったところ、野生型マウスではコントロール飼料を投与したマウスでは線維化は認めなかったが、CDAHFD 飼料を投与したマウスでは肝線維化が認められた。さらに CDAHFD 飼料を投与した *MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスの肝組織を評価すると高度の線維化を認め、野生型 NAFLD モデルマウスに比べて高度の肝線維化が認められた（図 1）。次に *MASP-3* 欠損が CDAHFD 飼料による肝脂肪沈着への影響を評価するために肝脂肪の組織学的評価を行った。Oil red O 染色を行ったところ CDAHFD 飼料による野生型 NAFLD モデルマウスでは高度の脂肪沈着を認めた。*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスでも肝脂肪沈着の増加を認めたが、野生型 NAFLD モデルマウスに比べると脂肪沈着は軽度であった（図 1）。

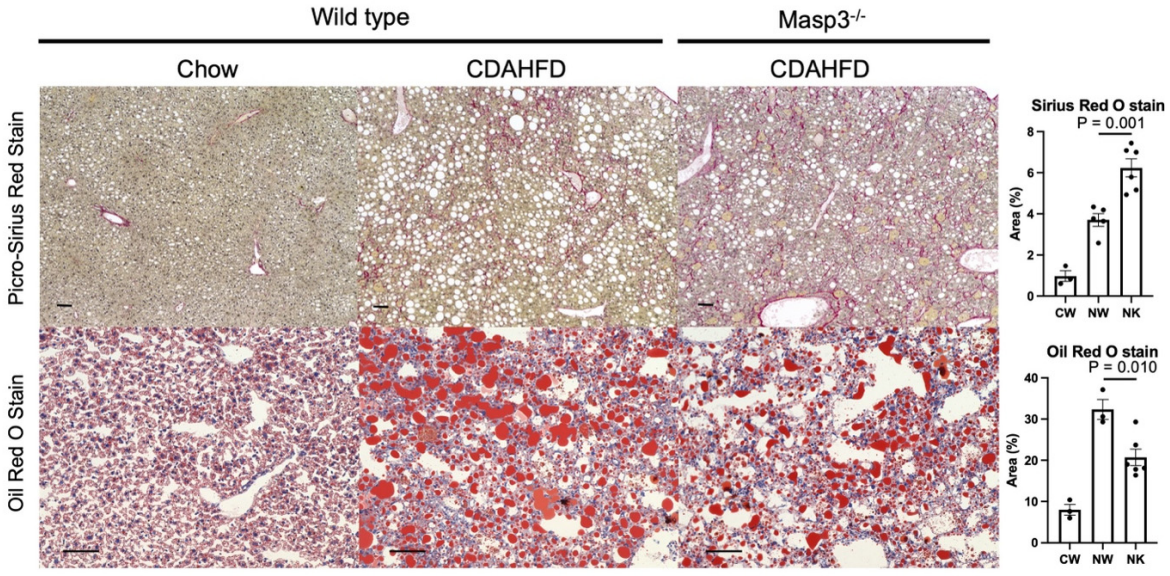


図 1. *MASP-3* 欠損の NASH モデルマウスの肝病態への影響

CDAHFD 飼料投与による肝線維化（Picro-Sirius Red 染色）は *MASP-3* 欠損マウスで増悪していた（P＝0.001、unpaired *t* test）。脂肪沈着（Oil-Red O 染色）は *MASP-3* 欠損マウスで減少していた（P＝0.010、unpaired *t* test）。CW：コントロール飼料投与野生型マウス、NW：CDAHFD 飼料投与野生型マウス、NK：CDAHFD 投与 *MASP-3* 欠損マウス（スケールバー：100μm）。

CDAHFD 飼料によりマウスの肝臓には線維化を来し肝内の hydroxyproline は投与期間に応じて増加するため、肝線維化は CDAHFD 飼料の投与期間に応じて増悪すると考えられる［4］。本研究では CDAHFD 飼料投与による肝線維化は *MASP-3* 欠損マウスでは野生型マウスに比べて増加しており、*MASP-3* 欠損は NAFLD における肝線維化へ悪影響を与えていることが明らかとなった。

また本研究では CDAHFD 飼料投与による肝脂肪沈着は *MASP-3* 欠損マウスでは野生型マウスに比べて低下していた。脂肪沈着の軽減は NAFLD の病態改善を関連しており、*C3aR* 欠損、*C5* 欠損マウスやラットでは高脂肪食による肝障害、肝脂肪沈着の軽減が報告されている［5，6］。また補体第二経路の活性化因子である D 因子は主に脂肪細胞で産生されるが、マウスへ高脂肪食を投与すると肝臓では D 因子の mRNA が上昇しており、D 因子欠損マウスでは高脂肪食による肝障害や脂肪沈着が軽減することが報告されている［7］。D 因子欠損マウスでは高脂肪食による *de novo* lipogenesis や脂肪酸取り込みに関連する mRNA の発現亢進が抑制されていることから D 因子は脂質代謝に関連していることが推測される。MASP-3 は D 因子の恒常的に活性化させ、第二経路の活性化を維持し C3 や C5 の活性化を増幅する重要な役割を果たしている。本研究では、*MASP-3* 欠損マウスでは肝脂肪沈着は軽減していたが肝線維化は増悪しており、これまでの報告である C3、C5、そして D 因子の活性低下による NAFLD の病態抑制とは異なる結果が得られた。*MASP-3* 欠損マウスは野生型に比べて体格が小さく、またヒトの *MASP-3* 欠損は骨格の形成不全を来すことから［8］、MASP-3 が補体経路の活性化以外の生体の恒常性維持経路への関与が推測され、さらなる解析が必要と考えられた。

2. NAFLD モデルにおける腸内細菌叢に対する *MASP-3* 欠損の影響

次に NAFLD モデルマウスにおける腸内細菌叢へ MASP-3 が与える影響を評価した。コントロール飼料、または CDAHFD 飼料を 24 週間投与後のマウスの盲腸内容物を採取し、16S rDNA 部分塩基配列を標的とした解析により腸内細菌叢を評価した。α多様性は野生型マウスでは CDAHFD 飼料投与により Chao1 index1、Shannon index、Simpson index の上昇傾向が認められたが、*MASP-3* 欠損マウスでは CDAHFD 飼料投与後の変化量が低下していた（図 2A）。それぞれのβ多様性を解析すると *MASP-3* 欠損 NAFLD モデルでは Bray-Curtis 距離による similarity が低下していた（図 2B）。これらの変化がいずれの菌種の変化を反映しているのかを明らかにするため解析すると、*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスで *Bacteroides acidifaciens* および *Prevotella* の relative abundance が有意に上昇していることが認められた（図 2C）。*Prevotella* はヒトでは口腔内常在菌であるが、NAFLD の病態が増悪するに従いその割合が低下することが報告されている。また *Bacteroides acidifaciens* は脂肪肝の病態改善との関連が示唆されている。β多様性の similarity の低下はこれらの細菌の増加が影響している可能性があると考えられ、*MASP-3* 欠損により腸内細菌叢は NAFLD に対して保護的な環境へ変化している可能性があると考えられた。

小児炎症性腸疾患患者では補体 C4 因子の遺伝子のコピー数と腸内細菌叢、そして病態との関連が報告されている［9］。*C4* 遺伝子のコピー数が多い患者の血清は細菌に対する補体活性化能が高値であったことから、補体活性化は腸管の炎症を介して腸内細菌叢の dysbiosis へ影響していると考えられている。また *db/db* マウスでは過食により糖尿病に類似した病態を来し腸内細菌叢の変化が認められるが、*db/db* マウスへの C5 阻害薬の投与は腸内細菌叢のα・β多様性を改善し、短鎖脂肪酸産生が亢進する［10］。これらの報告からは過剰な補体活性化亢進が腸内細菌叢を介して病態増悪へ影響していることが推測される。本研究では *MASP-3* 欠損マウスの腸内細菌叢の similarity が低下していたが、NAFLD の病態に対して保護的な細菌種が増加しており、*MASP-3* 欠損マウスでは補体活性化の抑制による腸内細菌叢の dysbiosis が軽減していることが示唆された。

本研究では、補体第二経路の活性化因子である MASP-3 の NAFLD の病態へ与える影響を、*MASP-3* 欠損マウスを用いて NAFLD モデルマウスを作製し肝線維化と腸内細菌叢について解析を行った。*MASP-3* 欠損マウスでは CDAHFD 飼料投与後に肝線維化の増悪を認めた。しかし CDAHFD 飼料投与後の肝脂肪沈着は野生型マウスに比べて *MASP-3* 欠損マウスで面積は軽減しており、また腸内細菌叢の解析では *MASP-3* 欠損マウスでは NAFLD の病態に保護的な影響が示唆されている *Bacteroides acidifaciens* や *Prevotella* が増加していた。これ

らの結果は MASP-3 が補体活性化以外の経路を介した肝病態への関与を示唆していると考えられ、*MASP-3* 欠損による NALFD モデルにおける肝線維化増悪のメカニズムの解明は MASP-3 に着目したヒトの NALFD の疾患診断や新たな治療方法の創出に寄与できる可能性があると考えられた。

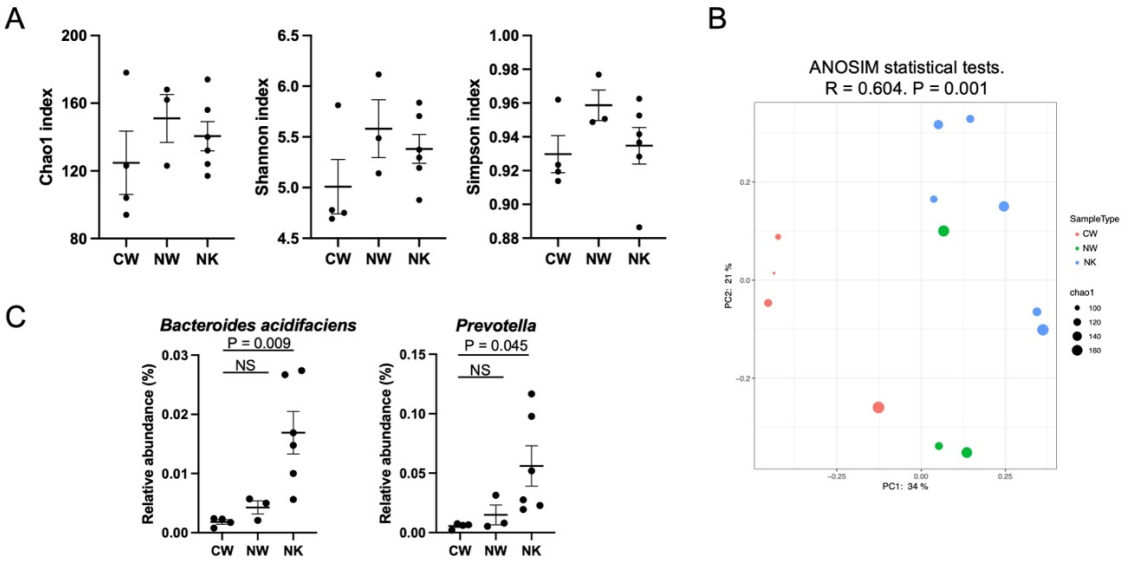


図 2. NAFLD モデルマウスにおける腸内細菌叢へ与える MASP-3 の影響

A) 腸内細菌叢の α 多様性。

B) 腸内細菌叢の β 多様性（Analysis of similarities）。

C) 盲腸内の *Bacteroides acidifaciens* と *Prevotella*。

CW：コントロール飼料投与野生型マウス、NW：CDAHFD 飼料投与野生型マウス、

NK：CDAHFD 投与 *MASP-3* 欠損マウス。P 値は unpaired *t* test による。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、福島県立医科大学大医学部免疫学講座の関根英治教授である。

文　献

1) Carpino G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D, et al. Increased Liver Localization of Lipopolysaccharides in Human and Experimental NAFLD. Hepatology. 2020;72(2):470-85. Epub 20200522. doi: 10.1002/hep.31056. PubMed PMID: 31808577.

2) Laskowski J, Renner B, Pickering MC, Serkova NJ, Smith-Jones PM, Clambey ET, et al. Complement factor H-deficient mice develop spontaneous hepatic tumors. J Clin Invest. 2020;130(8):4039-54. doi: 10.1172/JCI135105. PubMed PMID: 32369457; PubMed Central PMCID: PMC7410061.

3) Hayashi M, Machida T, Ishida Y, Ogata Y, Omori T, Takasumi M, et al. Cutting Edge: Role of MASP-3 in the Physiological Activation of Factor D of the Alternative Complement Pathway. J Immunol. 2019;203(6):1411-6. Epub 20190809. doi: 10.4049/jimmunol.1900605. PubMed PMID: 31399515.

4) Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. Int J Exp Pathol. 2013;94(2):93-103. Epub 20130111. doi: 10.1111/iep.12008. PubMed PMID: 23305254; PubMed Central PMCID: PMC3607137.
5) Mamane Y, Chung Chan C, Lavallee G, Morin N, Xu LJ, Huang J, et al. The C3a anaphylatoxin receptor is a key mediator of insulin resistance and functions by modulating adipose tissue macrophage infiltration and activation. Diabetes. 2009;58(9):2006-17. Epub 20090706. doi: 10.2337/db09-0323. PubMed PMID: 19581423; PubMed Central PMCID: PMC2731537.
6) Bavia L, Cogliati B, Dettoni JB, Ferreira Alves VA, Isaac L. The complement component C5 promotes liver steatosis and inflammation in murine non-alcoholic liver disease model. Immunol Lett. 2016;177:53-61. Epub 20160728. doi: 10.1016/j.imlet.2016.07.014. PubMed PMID: 27477770.
7) Tsuru H, Osaka M, Hiraoka Y, Yoshida M. HFD-induced hepatic lipid accumulation and inflammation are decreased in Factor D deficient mouse. Sci Rep. 2020;10(1):17593. Epub 20201016. doi: 10.1038/s41598-020-74617-5. PubMed PMID: 33067533; PubMed Central PMCID: PMC7568538.
8) Sirmaci A, Walsh T, Akay H, Spiliopoulos M, Sakalar YB, Hasanefendioglu-Bayrak A, et al. MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes. Am J Hum Genet. 2010;87(5):679-86. Epub 20101028. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.09.018. PubMed PMID: 21035106; PubMed Central PMCID: PMC2978960.
9) Nissila E, Korpela K, Lokki AI, Paakkanen R, Jokiranta S, de Vos WM, et al. C4B gene influences intestinal microbiota through complement activation in patients with paediatric-onset inflammatory bowel disease. Clin Exp Immunol. 2017;190(3):394-405. Epub 20170925. doi: 10.1111/cei.13040. PubMed PMID: 28832994; PubMed Central PMCID: PMC5680072.
10) Li L, Wei T, Liu S, Wang C, Zhao M, Feng Y, et al. Complement C5 activation promotes type 2 diabetic kidney disease via activating STAT3 pathway and disrupting the gut-kidney axis. J Cell Mol Med. 2021;25(2):960-74. Epub 20201206. doi: 10.1111/jcmm.16157. PubMed PMID: 33280239; PubMed Central PMCID: PMC7812276.