

# 非アルコール性脂肪性肝炎から肝発癌における腸内細菌叢と肝自然免疫の役割の解明と治療応用へ向けた基礎的検討

三 浦 光 一

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻腫瘍制御医学系消化器内科 特任講師

## 緒 言

非アルコール性脂肪性肝炎（以下 NASH）はメタボリック症候群の肝臓での表現型とされ、肝硬変や肝臓癌へ進展する可能性のある疾患である。近年、NASH 患者数は増加傾向にあり、今後重要な健康問題となると予想されるが、いまだ有効な治療法は少ない。NASH 発症メカニズムに関して不明な点が多いことから、その解明が有効な治療法の開発につながると考えられる。

NASH 発症メカニズムとして Day らが提唱した two hits theory<sup>1)</sup> が広く浸透している。これによると、まず栄養過多により脂肪肝が生じ、肝細胞での貯蔵限界を超えると酸化ストレスが生み出され、それが肝細胞障害を引き起こし、NASH に進展するという説である。すなわち NASH の原因は肝細胞で、そこに貯蔵される脂肪の量や質であるとされてきた。しかし、軽度の脂肪肝でも酸化ストレスマーカーが上昇することから、Two hits theory のみで NASH とその後の肝発癌の発症機序を説明しにくいのも現状である。

我々が注目しているのはマクロファージである。NASH においては腸内細菌叢が増大し、さらに腸管壁透過性亢進も加わることで、多量の腸内細菌産物が門脈に流入し、肝臓に達する。それらによりマクロファージが刺激を受け、炎症性サイトカインやケモカインを産生し続ける。我々はマクロファージから産生される様々な因子が肝細胞に対し障害を与え、NASH の病態を生み出していると考えている<sup>2)</sup>。また NASH で「病的状態」の根源は肝細胞よりもむしろマクロファージで、その「病的マクロファージ」を生み出しているのはマクロファージ自身に発現する Toll-like receptor(以下 TLR) やケモカイン受容体でないかと我々は考えている。

そこで我々は NASH 発症のメカニズムをマクロファージの動態からアプローチし、治療応用を含めた検討を行う。「病的マクロファージ」が生じるメカニズム解明のため、マクロファージに発現する TLR やケモ

カイン受容体を分子生物学的手法にて解析する。さらには TLR のリガンドの源と推定される腸内細菌叢をターゲットにした治療戦略を検討する。

## 方 法

今回は採択研究課題のうち、NASH におけるマクロファージの動態について行った実験方法を示す。

NASH の原因が「マクロファージ説」であることを証明する手がかりとして、NASH 発症におけるマクロファージ性質を検討した。次にマクロファージ誘導に重要な役割を果たすケモカイン MCP-1 とその受容体である CCR2 について検討を行った。CCR2 KO マウスに NASH 誘導食であるコリン欠乏食を投与し、病態評価とマクロファージ誘導の状況を検討した。次に CCR2 阻害剤による NASH の治療効果を検討した。さらに MCP-1 - CCR2 の上流に位置する TLR4、TLR9、MyD88 の各遺伝子欠損 (KO) マウスにおける MCP-1 および CCR2 発現、さらにはマクロファージの浸潤の程度を評価した。

## 結 果

### コリン欠乏食誘導 NASH で炎症性マクロファージの浸潤が著明である

WT マウスにコリン欠乏食を 22 週投与すると著明な脂肪肝、炎症細胞浸潤、肝細胞の風船様変化が認められた (図 1A)。また線維化や活性化星細胞のマーカーである  $\alpha$ SMA 発現が増加した (図 1A)。NASH 進行に伴い CCR2 陽性細胞、マクロファージの代表的マーカーである F4/80、骨髄由来炎症性マクロファージのマーカーである Ly6C の陽性細胞が NASH において増加した (図 1A, 1B)。肝臓中の mRNA レベルでも CCR2 のリガンドである MCP-1 や CCR2、F4/80、CD68 発現増加を認めた (図 1C)。またコントロールマウスおよび NASH マウスよりマクロファージを分離すると、

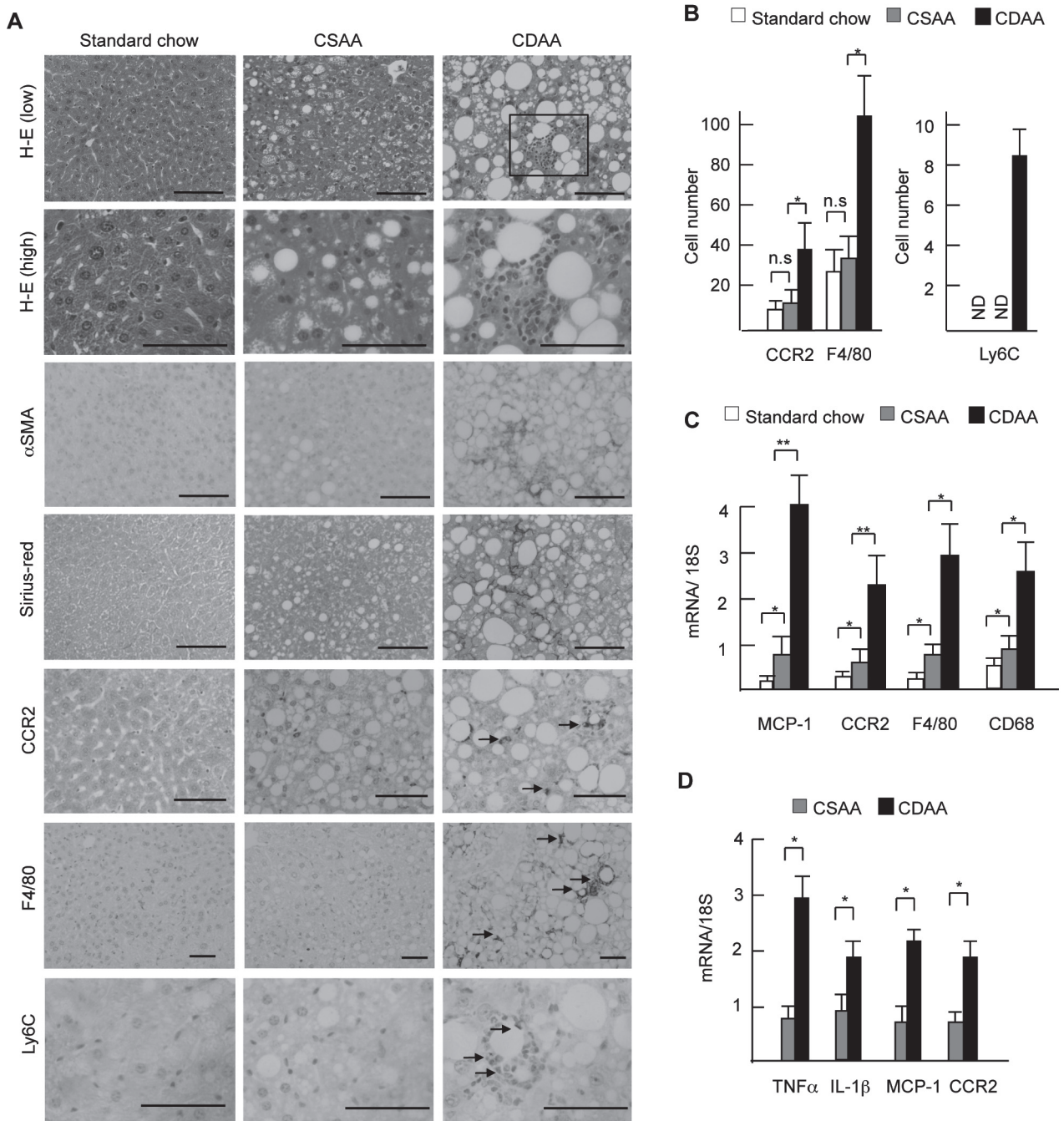


図1 NASHで炎症性マクロファージの浸潤が著明である

標準食 (Standard diet)、CSAA食 (コリン欠乏食のコントロール食)、CDAА食 (コリン欠乏食) を 22 週投与した WT マウスの所見 (A) 上段から HE, HE 拡大、 $\alpha$  SMA 免疫染色、Sirius red 染色、CCR2 免疫染色、F4/80 免疫染色、Ly6C 免疫染色。(B) CCR2、F4/80、Ly6C の各陽性細胞数。(C) Real-time PCR による肝組織中遺伝子発現比較 (D) CSAA および CDAА 食投与マウスから分離したマクロファージの遺伝子発現。Real-time PCR

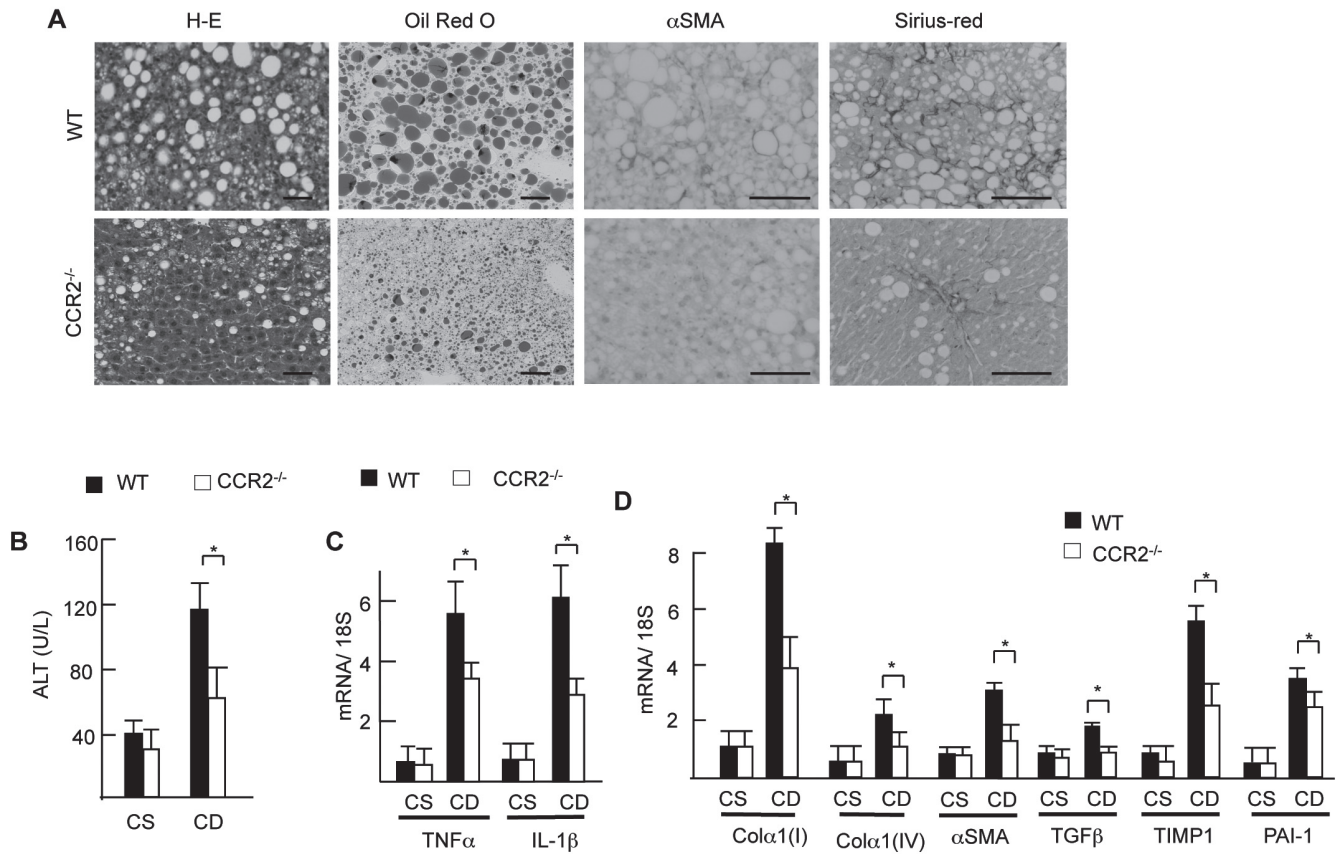


図2 CCR2KO マウスでNASH改善する

WT および CCR2KO マウスにコリン欠乏食を 22 週投与した所見。(A) 左より HE 染色、Oil red O 染色、 $\alpha$  SMA 免疫染色、Sirius red 染色 (B) 血清 ALT (C, D) Real-time PCR による肝組織中遺伝子発現比較

NASH 由来マクロファージでは TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ などの炎症性サイトカイン、MCP-1、CCR2 発現が増加していた (図 1D)。これらのことから炎症性マクロファージが NASH において重要な役割を果たしていると考えられた。

### CCR2KOマウスでNASH改善する

次にマクロファージの誘導が NASH に及ぼす影響を検討するため、CCR2KO マウスにコリン欠乏食を 22 週投与した。CCR2KO マウスでは脂肪肝、炎症細胞浸潤、肝細胞の風船様変化が軽減した (図 2A)。血清中の ALT 値も KO マウスで低値を示した (図 2B)。肝臓組織内の炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルにおいても KO マウスで TNF $\alpha$  や IL-1 $\beta$  が低値であった (図 2C)。次に進行した NASH の所見である肝線維化の評価を行った。KO マウスでは NASH に特徴的な perisinusoidal fibrosis や  $\alpha$  SMA 発現が軽減した (図 2A)。さらに肝組織でのコラーゲンや TIMP-1 などの線

維化関連遺伝子発現も KO マウスで低値であった (図 2D)。以上の所見より CCR2 は NASH の進行に密接に関与していることが判明した。

CCR2 は NASH において炎症性マクロファージを誘導する。

CCR2KO マウスで脂肪性肝炎が軽減したことから、肝臓におけるマクロファージ数を計測した。F4/80 陽性細胞や Ly6C 陽性細胞は WT マウスで NASH 進行とともに増加したのに対し、CCR2KO マウスでは増加は軽微であった (図 3A,3B)。肝組織での mRNA レベルでも MCP-1、F4/80、CD68 などのケモカインやマクロファージのマーカーは CCR2KO マウスで低下した (図 3A,3B)。

### TLRシグナルはMCP-1産生を介してNASHを促進する

次に TLR と炎症性マクロファージとの関連を検討するため、TLR4KO, TLR9KO、さらにはそれら下流のアダプター分子である MyD88 の KO マウスを用いて



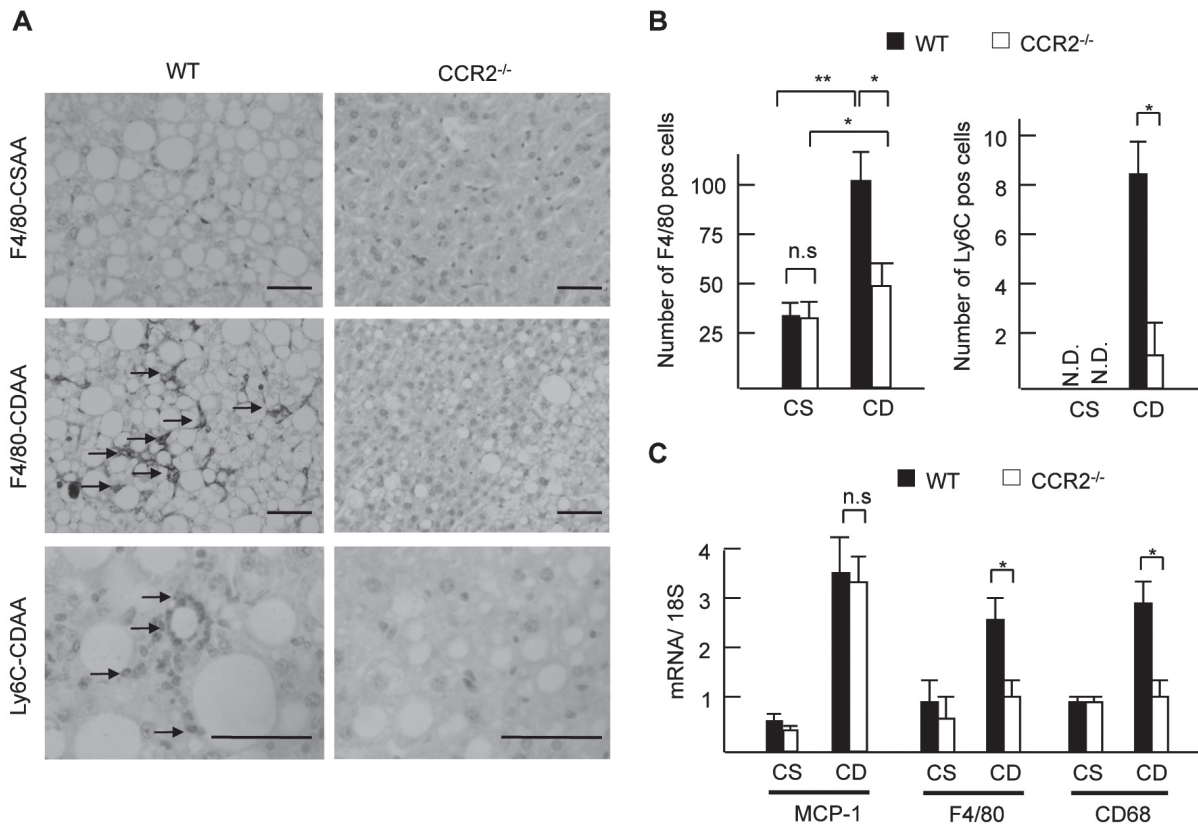


図3 CCR2はNASHにおいて炎症性マクロファージを誘導する

WTおよびCCR2KOマウスにコリン欠乏食を22週投与した所見。(A)上段よりF4/80免疫染色(CSAA食), F4/80免疫染色(CDAA食), Ly6C免疫染色(B)F4/80陽性細胞数およびLy6C陽性細胞数(C)Real-time PCRによる肝組織中遺伝子発現比較

NASHを誘導した。TLR4KOマウス、TLR9KOマウス、MyD88KOマウスではNASHは軽減し、それら肝臓において、MCP-1、CCR2、F4/80およびCD68発現は低下した(図4A)。それらKOマウスではF4/80陽性細胞、CCR2陽性細胞、Ly6C陽性細胞数は肝臓で減少した(図4B)。肝マクロファージにTLR4 ligandであるLPSやTLR9 ligandであるCpG-DNAで刺激するとMCP-1発現が増加した、このことから、TLR-MCP-1-CCR2を介したマクロファージの誘導はNASH促進のひとつのメカニズムと考えられる。

### CCR2阻害剤はNASHを著明に改善する

NASHにおいてCCR2を介した炎症性マクロファージの誘導が重要との結果より、まずコリン欠乏食開始と同時にCCR2阻害剤を2週間投与した。CCR2阻害剤投与により肝臓におけるF4/80陽性細胞、CCR2陽性細胞、Ly6C陽性細胞は減少し(図5A,5B)、脂肪性肝炎の軽減を認めた(図5A,5C)。脂肪肝の軽減は肝組織

中の中性脂肪量も減少でも証明された(図5D)。また血清ALT値、肝組織中TNF $\alpha$ やIL-1 $\beta$ 発現が減少した(図5F)。また遺伝子レベルで線維化マーカーは上昇したが、CCR2阻害剤により発現低下が認められた(図5G)。

次にNASHと診断されてからの治療介入をの効果をみるため、NASHが完成してからCCR2阻害剤を投与した。早期投与と同様にCCR2阻害剤にてCCR2陽性細胞やLy6C陽性細胞は減少した(図6A,6B)。脂肪肝は有意に改善しなかったが(図6A,6C)、炎症細胞浸潤、ALT値、肝線維化が改善した(図6A,6D,6E)。よってNASHが完成された状態からでもCCR2阻害剤は有用である。

### 考察

本研究結果から、NASHの発症や進行にはマクロファージの誘導や活性化が重要であることが判明した。最近の研究で、マクロファージはおおまかに分けて炎症性作用を有するM1マクロファージと抗炎症作用を有

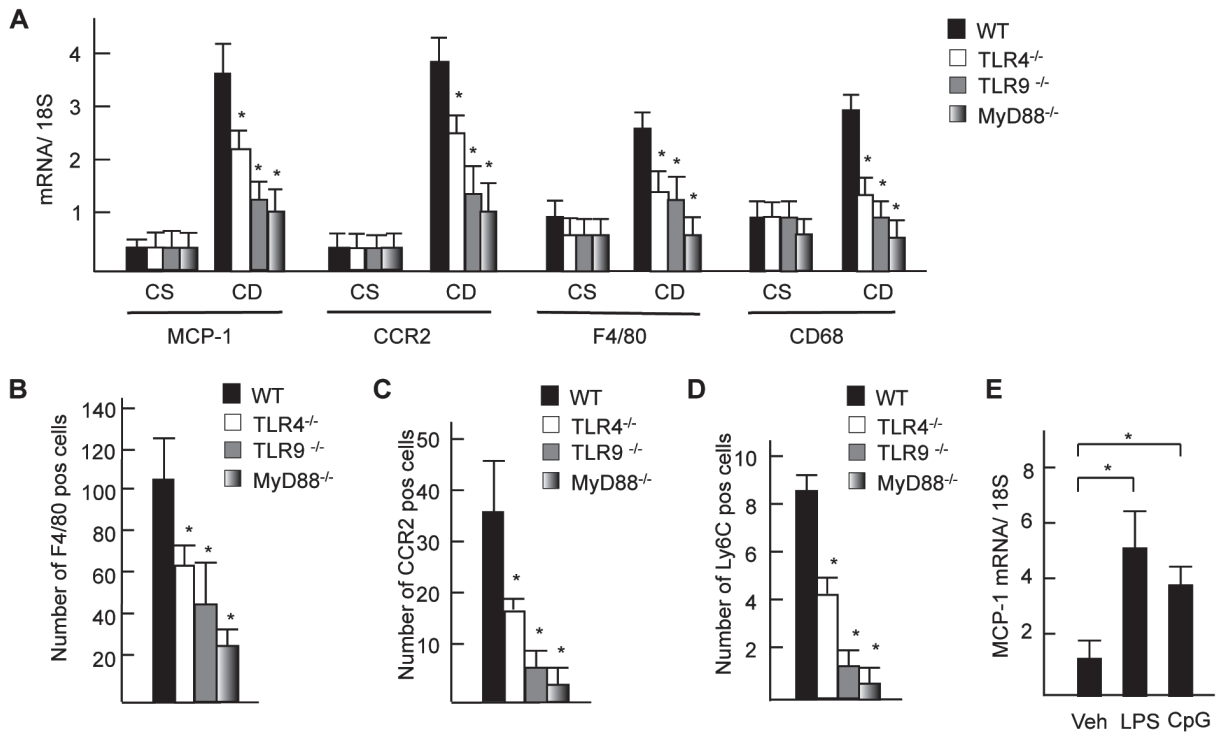


図 4 TLR シグナルは MCP-1 産生を介して NASH を促進する

WT、TLR4KO、TLR9KO、MyD88KO マウスにコリン欠乏食および CSAA 食を 22 週投与した所見。(A) Real-time PCR による肝組織中遺伝子発現比較 (B-D) F4/80 陽性細胞数、CCR2 陽性細胞数および Ly6C 陽性細胞数 (E) WT マウスより肝マクロファージを分離し、LPS および CpG で刺激した際の MCP-1 発現。Real-time PCR による遺伝子発現比較

する M2 マクロファージが存在することが知られている。コリン欠乏食誘導による NASH では肝臓から分離されるマクロファージは TNF  $\alpha$  や IL-1  $\beta$  などの炎症性サイトカインの発現レベルが高いことや骨髄由来炎症性マクロファージである Ly6C 陽性マクロファージが認められる。よって本 NASH モデルで誘導されるマクロファージは炎症性マクロファージが主体であると推定される。これら炎症性マクロファージは CCR2 KO マウスで誘導が抑制され、その結果 NASH が軽減したことから、MCP-1 および CCR2 を介するマクロファージの誘導が NASH 病態に関わっていることは明らかである。治療を考慮した場合、CCR2 阻害剤が有用であると考えられるが、実際 CCR2 阻害剤により炎症や肝線維化が改善した。CCR2 阻害剤は海外で糖尿病治療の臨床治験も始まっており、今後治療薬として期待される。一方、肝臓には組織マクロファージである Kupffer 細胞が存在するが、あらかじめ clodronate で Kupffer 細胞を除去しておく、その後の NASH 誘導において炎症が軽減する<sup>3)</sup>。我々の検討では Kupffer 細胞は炎症性サイトカイン産生に加え、MCP-1 産生源であると考えられ

た。よって組織マクロファージである Kupffer 細胞も炎症性マクロファージの誘導に関与し、NASH 発症において重要な役割を果たしていると考えられた。これら CCR2KO マウス、CCR2 阻害剤、さらには Kupffer 細胞を除去した場合、脂肪肝の程度も軽減する所見がいくつかの実験で認められた。すなわちマクロファージの変化により直接関係ないと思われた脂肪肝の程度も改善している。よって脂肪性肝炎でみられる脂肪肝は炎症に付随する所見であることを示唆する。これらの所見を合わせると脂肪性肝炎ではマクロファージをコントロールすることが治療においても重要であると考えられた。

今後は骨髄移植によるキメラマウス作製により、マクロファージに発現する TLR や CCR2 が「病的マクロファージ」を生み出す原因となり得るのかを検討する。また、TLR ligand の供給源は腸内細菌叢にあると推定される。よって抗生剤やプロバイオティクス投与により腸内細菌叢をコントロールも治療もオプションと考えられ、今後研究を展開していく予定である。

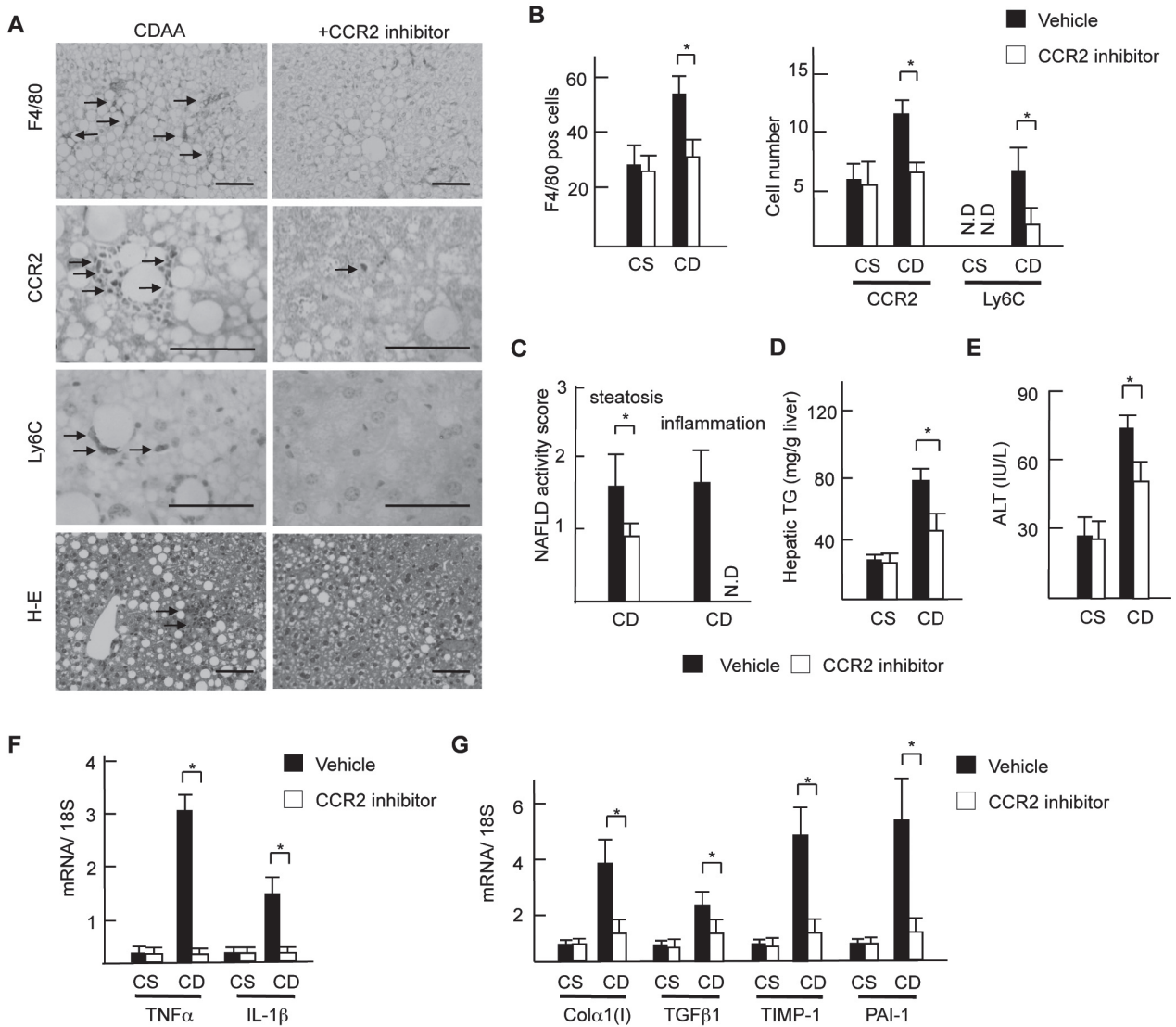


図5 CCR2 阻害剤早期投与は NASH を著明に改善する

WT マウスに CDAA 食を負荷し、CCR2 阻害剤を 2 週間同時投与した所見。(A) 上段より F4/80 免疫染色、CCR2 免疫染色、Ly6C 免疫染色、HE 染色 (B) F4/80 陽性細胞数、CCR2 陽性細胞数および Ly6C 陽性細胞数。(C) NAFLD activity score. (D) 肝組織中性脂肪量. (E) 血清 ALT. (F,G) Real-time PCR による肝組織中遺伝子発現比較.

要 約

NASH の発症原因は不明な点が多く、その解明が有効な治療法の開発につながると考えられる。我々は NASH の発症原因としてマクロファージにフォーカスをあて、研究を行った。WT マウスにコリン欠乏食を与えると典型的 NASH が誘導され、肝臓に多数の炎症性マクロファージが浸潤した。CCR2KO マウスでは炎症性マクロファージ誘導抑制と伴に NASH が軽減した。また MCP-1-CCR2 の上流に位置する TLR4 や TLR9 の各 KO マウスでは NASH が軽減し、MCP-1 および CCR2 発現が低下し、炎症性マクロファージの誘

導が抑制された。また CCR2 阻害剤を用いて炎症性マクロファージの誘導を抑制すると NASH が軽減した。よって本研究では NASH の発症や進展においてマクロファージの重要と考えられた。

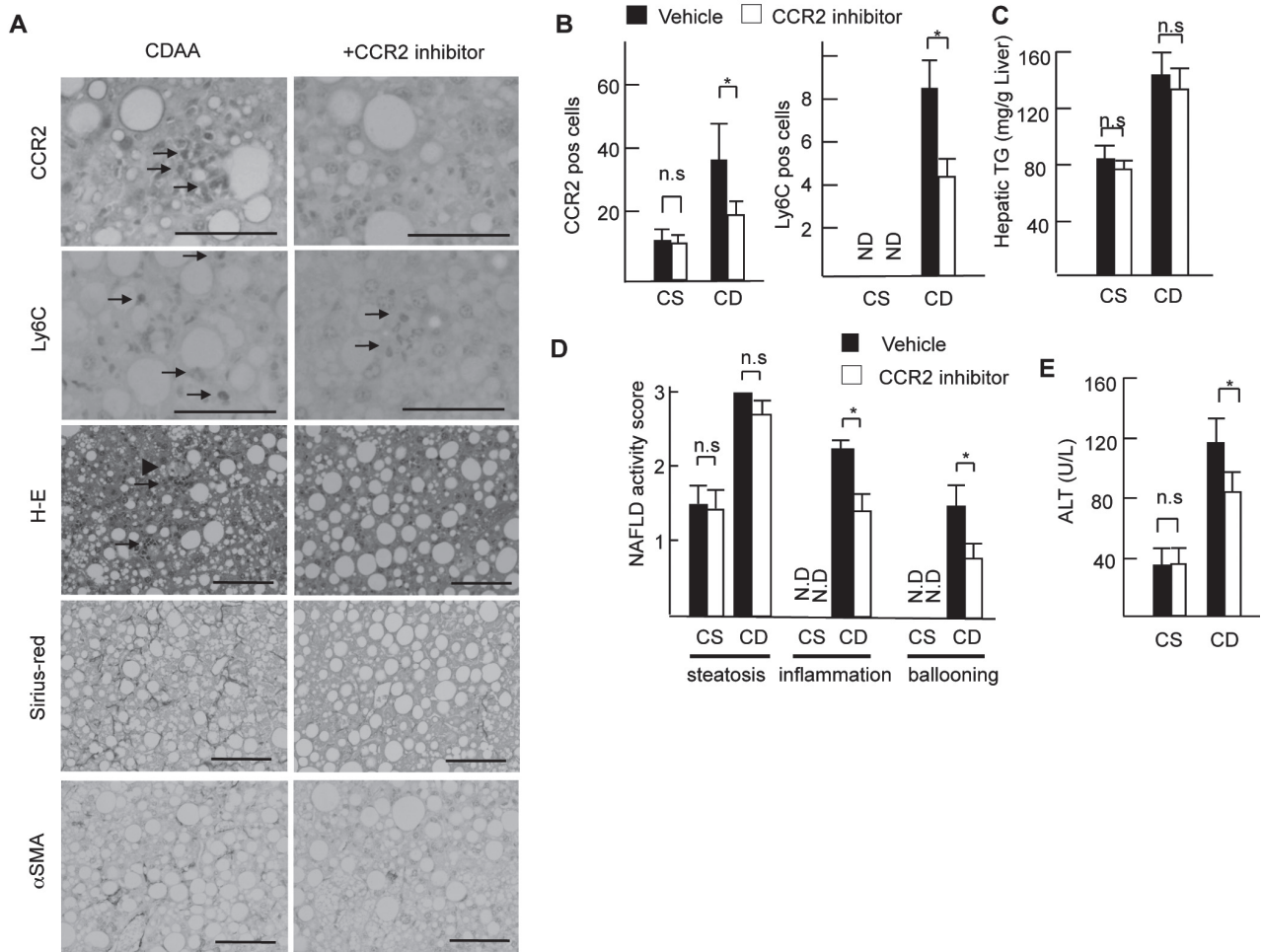


図6 CCR2 阻害剤後期投与は炎症および線維化を改善する

WT マウスに CDAA 食を 18 週負荷後に、CCR2 阻害剤を 4 週間同時投与した所見。(A) 上段より CCR2 免疫染色、Ly6C 免疫染色、HE 染色、Sirius red 染色、α SMA 免疫染色。(B) CCR2 陽性細胞数および Ly6C 陽性細胞数。(C) 肝組織中性脂肪量。(D) NAFLD activity score.(E) 血清 ALT

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Day CP and James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998 ;114:842-5.
- 2) Miura K, et al. Toll-Like Receptor 9 Promotes Steatohepatitis by Induction of Interleukin-1beta in Mice. *Gastroenterology*. 2010;139:323-334.
- 3) Miura K, et al. Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302:G1310-21.