

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 28 年 3 月 25 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 東京医科歯科大学医学部附属病院
職 名 助教
研 究 代 表 者 土屋 恭一郎

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。
記

(課題番号:15001)

1. 共同研究課題名	NASH における マクロファージのフォークヘッド転写因子の病態生理的意義の解明			
2. 共同研究目的	研究資材提供および学術的助言			
3. 共同研究期間	平成 27 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 土屋 恭一郎	東京医科歯科大学 医学部附属病院 糖尿病・内分泌・代謝内科	助教	研究計画作成、実験施行、 論文作成	
(分担研究者) 小川 佳宏 柴 久美子	東京医科歯科大学大学院 分子内分代謝学分野 同上	教授 大学院生	研究計画作成、学術的助言 実験施行	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	代謝シグナル解析分野	氏 名	北村 忠弘 教授

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:)

6. 共同研究計画

脂肪肝は、内臓脂肪型肥満を基盤にインスリン抵抗性をきたして発症する、メタボリックシンドロームの肝病変である。従来可逆性と考えられていた脂肪肝の中に、炎症や線維化を伴い肝硬変や肝細胞癌まで進行する病態 (Nonalcoholic steatohepatitis, NASH: 非アルコール性脂肪性肝炎) が存在することが明らかとなってきた。これまで当研究室では、NASH モデルマウス (Am J Pathol 179: 2454-2463, 2011) において、過剰な脂肪蓄積により細胞死に陥った肝実質細胞をマクロファージ (Mφ) が取り囲んで貪食・処理する構造 (hepatic crown-like structure: hCLS) が出現することを見出し、hCLS が肝臓の炎症と線維化の起点となることを明らかにした (PLoS ONE 8: e82163, 2014)。フォークヘッド転写因子 (forkhead transcription factors: FoxO) は 1, 3a, 4 のサブファミリーを有し、主にインスリンによるリン酸化で不活化されるが、hCLS の形成や NASH の発症・進展における Mφ のインスリン抵抗性および FoxO の役割は明らかでない。本研究では、申請者が作成した Mφ 特異的に全ての FoxO サブファミリーを欠損するマウス (Mφ 特異的 FoxO 欠損マウス、Circ Res 112: 992-1003, 2013) を用いて、NASH における Mφ の FoxO の病態生理的意義を明らかにする。

申請者が作成・所有する Mφ 特異的 FoxO 欠損マウス (Lysozyme M-Cre; FoxO1^{fl}O3a^{fl}O4^{fl} マウス; MYFKO マウス) と対照マウスにメチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) による NASH、および四塩化炭素による肝線維化を誘導し、シリウスレッド染色による肝線維化を定量比較する。加えて、NASH 誘導後の肝組織 F4/80 免疫染色により hCLS 数を定量比較し、肝 Mφ のインスリンシグナルおよび FoxO が hCLS の形成に影響するか否かを明らかにする。また、FACS により、MCD 食負荷 MYFKO および対照マウスの肝非実質細胞から Mφ を単離する。NASH における肝 Mφ の FoxO 活性を評価するとともに、炎症性サイトカイン、線溶因子など、Mφ における NASH の病態に関連する既知の因子の発現を解析する。また、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を施行し、FoxO 関連プラスミドを用いたレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降アッセイ (共同研究担当教員・北村忠弘教授から研究資材を分与予定) 等を組み合わせることで、Mφ における新たな FoxO 標的遺伝子の同定を試みる。

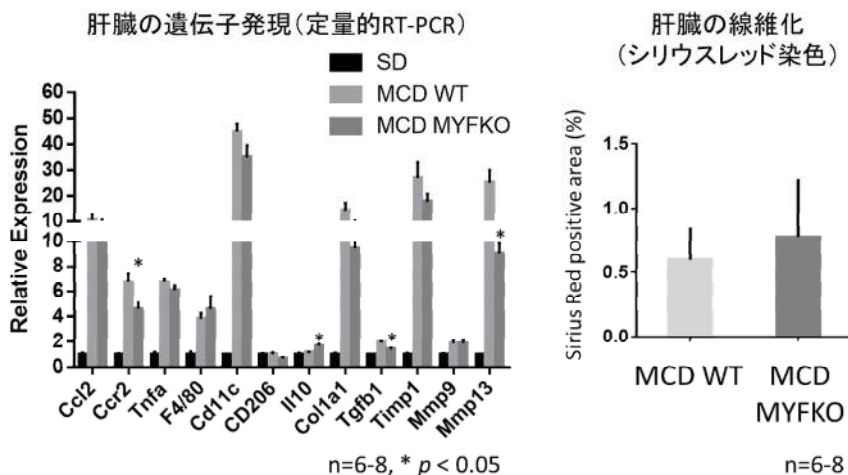
7. 共同研究の成果

12 週齢の野生型 (WT) および MYFKO マウスに通常食 (SD 食) または MCD 食 (Research Diet 社 #518810) を 8 週間給餌し、肝臓の遺伝子発現 (図左) およびシリウスレッド染色による線維化 (図右) を評価した。

MCD 食給餌 MYFKO マウスの肝臓では *Ccr2* および *Tgfb1* の遺伝子発現が MCD 食給餌 WT マウスより有意に減少していた。しかし、シリウスレッド染色による線維化面積

は両群間で差を認めなかった。これより、マウスの肝線維化において、マクロファージにおける FoxO の病態生理的意義は小さいと考えられた。

MYFKOマウスを用いた MCD食誘導性肝障害モデル



8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

なし