

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：
2. 研究開発課題名： 細胞間相互作用と臓器代謝ネットワークの破綻による組織線維化の制御機構の解明と医学応用
3. 研究開発代表者： 氏名 小川 佳宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
4. 研究開発の成果

本研究開発では、代表的な線維化疾患である非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病態メカニズムの解明と画期的な治療法の開発を目的とする。平成 27 年度には、研究開発代表者らが独自に確立した NASH マウスを用いて、炎症の慢性化と組織線維化の起点となる hepatic CLS（hCLS）に焦点を当てて、NASH 発症の分子機構を検討し、バイオマーカーや創薬ターゲットを探索した。

### 1) 臓器代謝ネットワークの破綻による NASH の分子機構の解明

研究開発代表者らは既に、肥満の脂肪組織の CLS において死細胞の周囲を取り囲むマクロファージに発現する自然免疫センサーの Mincle が脂肪組織における炎症の慢性化と線維化の鍵分子であることを報告した。本年度は、肥満外科手術症例を対象とした臨床研究により、日本人の肥満症例において皮下脂肪組織と内臓脂肪組織の著しい間質線維化が認められた。更に、内臓脂肪組織の線維化は Mincle、M1 マクロファージマーカーの CD11c、線維化の主要な制御分子である TGF- $\beta$  の遺伝子発現と正相関が認められることが明らかになり、ヒトにおいても脂肪組織の線維化に Mincle が関与する可能性が示唆された。

中枢神経系による末梢臓器における炎症・代謝制御機構に関しては、視床下部メラノコルチンの内因性拮抗ペプチド AgRP の脳室内投与実験により、脂肪組織と肝臓において遺伝子発現が変化することを明らかにし、DREADD 法による視床下部室傍核 CRH ニューロンあるいは腹内側核 Ad4BP/SF1 ニューロンの選択的活性化を確認した（箕越グループとの共同研究）。

### 2) NASH のバイオマーカーと創薬ターゲット候補分子の探索

研究開発代表者らが独自に確立した NASH マウスは NASH の発症に約 20 週間を要することが技術的な障壁であったが、本年度は、より短期間で NASH 病変を発症する「短期モデル」の開発に成功した（特願 2015-122913）。即ち、MC4R 欠損マウスに対して 4 週間の高脂肪食負荷後、ごく低用量の四塩化炭素を投与することにより、1 週間程度で肝細胞風船様変性、hCLS 形成、肝線維化を経時的に発症することを見出した。これにより、薬効評価などのスクリーニングのスループットが格段に向上することに加えて、より詳細な病態解析が可能となった。従来の「慢性モデル」と新たに開発した「短期モデル」を組み合わせて、抗線維化作用を有する複数の既存薬や新規化合物が確認された。

### 3) バイオマーカーと創薬ターゲット候補分子の機能的意義・臨床的意義の検証

NASH マウスの肝臓より単離した hCLS 構成マクロファージにおいて特異的に発現が増加あるいは減少する遺伝子を選別した。上述の「短期モデル」において遺伝子発現を確認し、免疫組織染色による hCLS における局在、NASH の発症過程における経時変化、血中タンパク量を検討し、バイオマーカーや創薬ターゲットの候補分子を絞り込んだ。一方、NASH マウスの肝臓より線維芽細胞を単離し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析により線維化に関連する遺伝子群を同定した。（眞鍋グループとの共同研究）。

P0-Cre マウス、FoxD1-Cre マウス、Col-CreERT2 マウスの Cre マウスを用いて肝線維化を担う細胞の系譜追跡実験を実施し、対照マウスと四塩化炭素による肝線維化マウスにおいて肝実質細胞、星細胞を含む間質細胞の標識効率を評価した（柳田グループとの共同研究）。