

第 1 回池田模範堂賞

博士論文要旨

論文題目：メタボリックシンドロームおよび脂肪性肝炎の病態形成における自然免疫と腸内細菌叢の研究

所属・氏名：富山県立大学大学院工学研究科総合工学専攻・可児晃大

I. 背景・目的

メタボリックシンドローム (metabolic syndrome: MetS) は内臓脂肪の蓄積に加え、高血糖および高血圧、脂質代謝異常を併発する生活習慣病である。MetS の発症は動脈硬化を促進し、心筋梗塞や脳梗塞など死に繋がる血管疾患の発症リスクを高める。MetS の肝病態として、代謝機能障害関連脂肪性肝疾患 (metabolic dysfunction associated steatotic liver disease: MASLD) および代謝機能障害関連脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction associated steatohepatitis: MASH) がある。MASLD は肝臓への脂肪蓄積を特徴とし、炎症反応および代謝異常、さらに進行性の線維化を引き起こし、MASH へと進展する。これらの疾患は、生活様式や環境、遺伝的要因、運動不足、不健康な食生活などの様々な要因によって発症すると考えられている。MetS および MASLD は有病率が増加しており、世界的な健康問題であるが、その発症機序は複雑であるため、治療標的分子の絞込みが難しく、アンメットメディカルニーズが高い疾患である。また、MetS の基本病態は内臓脂肪組織における慢性炎症に起因すると考えられており、その発症には原始的な免疫系である自然免疫の活性化が重要な役割を果たす。さらに、ヒトの消化管に共生する腸内細菌は宿主の代謝に密接に関連しており、その異常が MetS および MASH の発症に影響を与える。以上から、自然免疫および腸内細菌叢を制御する予防法・治療法の開発は、MetS および MASH に対する有望なアプローチである。

本研究では、MetS および MASH の発症・進展に重要な役割を果たす自然免疫および腸内細菌叢の機能に焦点を当てて、遺伝子改変マウスおよび病態モデルマウスを用いて、それらの発症機序を解析した。

II. 結果

1. 自然免疫受容体 RP105 は腸内細菌叢の構成と腸管バリア機能の変容を介して、メタボリックシンドロームを促進する

自然免疫受容体 Radioprotective 105 (RP105) は B 細胞やマクロファージに発現し、グラム陰性菌のエンドトキシンの認識・応答に重要な役割を果たす。一方で、RP105 は内因性の脂肪酸を認識し、MetS の発症・進展に深く関与することが我々の研究より明らかとなっている。そこで本研究では、RP105 遺伝子欠損マウス (*Rp105*^{-/-}マウス) を用いて、RP105 の活性化が MetS の発症を誘導する機構における腸内細菌叢の寄与について解析した。既報通り、野生型 (wild-type: WT) マウスに比べて *Rp105*^{-/-}マウスでは、高脂肪食 (high-fat diet: HFD) 摂餌による MetS 病態が改善することを確認した。*Rp105*^{-/-}マウスの腸内細菌を移植された WT マウスでは、HFD 摂餌による肥満、インスリン抵抗性、脂肪肝および内臓脂肪組織の炎症など、様々な MetS 病態が改善した。脂肪肝および内臓脂肪組織の慢性炎症には、組織に集積したマクロファージが重要な役割を果たすことが知られている。

Rp105^{-/-}マウスの腸内細菌を移植された WT マウスでは、HFD 摂餌による内臓脂肪組織へのマクロファージ集積が顕著に抑制されていた。また、*Rp105*^{-/-}マウスの腸内細菌を移植された WT マウスでは、HFD 摂餌による腸管バリア機能不全が改善していた。さらに、*Rp105*^{-/-}マウスおよび *Rp105*^{-/-}マウスの腸内細菌を移植された WT マウスでは、短鎖脂肪酸産生菌が増加していた。酪酸とその産生菌は claudin-1 などの腸管バリア関連タンパク質の発現を増加させ、腸管における炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている。したがって、*Rp105*^{-/-}マウスおよび *Rp105*^{-/-}マウスの腸内細菌を移植された WT マウスでは、増加した短鎖脂肪酸産生菌がバリア機能不全を改善した可能性が考えられた。したがって、RP105 は腸内細菌叢に影響を与えることにより腸管バリア機能不全を促進し、MetS の発症に寄与することを示した。以上から、RP105 を治療標的とした新たな MetS 治療薬の開発に繋がる可能性を示した。

2. C57BL/6 マウスまたは *Rp105*^{-/-}マウスを用いた新規 MASH マウスモデルにおけるマクロファージサブセットの動態解析

これまでに我々は、新たに作製した MASH 誘導食 (iHFC 食) を ddY 系統の TSNO マウスに摂餌させることで、ヒト MASH の病理学的変化に類似したモデルマウスを確立した。一方で、遺伝子の関与を解析するために用いられる遺伝子欠損マウスのほとんどは、C57BL/6 マウスである。そこで本研究では、C57BL/6 マウスを用いた iHFC 食誘導性 MASH モデルを確立することを目指し、iHFC 食のコール酸配合量を減量した iHFC 食 (iHFC#2) を C57BL/6 マウスに摂餌させ、iHFC 食摂餌 TSNO マウスの病態と比較解析した。iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウスでは、体重増加および血漿 ALT 値の増加、肝臓の炎症および線維化が観察された。したがって、iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウスは MASH 病態を示すことを明らかにした。一方、これらの病態は iHFC 食摂餌 TSNO マウスよりも軽度であったため、MASH 病態の進展には餌のコール酸配合量またはマウスの遺伝的背景が影響を与えることを示した。iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウスでは、iHFC 食摂餌 TSNO マウスと同様に、肝臓に CD11c⁺/Ly6C⁻マクロファージが集積し、ヒト MASH に観察される肝王冠様構造 (hCLS) を形成した。一方、CD11c⁻/Ly6C⁺マクロファージは、iHFC 食摂餌 TSNO マウスの肝臓に集積し、C57BL/6 マウスでは普通食および iHFC#2 食摂餌の両方において肝臓に集積していた。以上から、C57BL/6 マウスでは炎症抑制性である CD11c⁻/Ly6C⁺マクロファージが定常状態の肝臓に多数集積しているため、TSNO マウスに比べて MASH 病態が軽度となることを示した。また、iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウスの肝臓では、TSNO マウスとは異なり CD11c⁺/Ly6C⁺マクロファージの集積が観察された。

また、iHFC#2 食摂餌により、*Rp105*^{-/-}マウスは WT マウスと同程度かむしろ強い肝臓の炎症や線維性変化を示した。また、HFC#2 食摂餌による肝臓への白血球およびマクロファージの集積は、WT マウスと比べて *Rp105*^{-/-}マウスにおいて増加していた。したがって、RP105 は iHFC#2 食誘導性 MASH の発症・進展を抑制する可能性を示した。以上から、iHFC#2 食誘導性 MASH モデルは、ヒトに類似した線維化を示す C57BL/6 マウス系統の MASH モデルであり、iHFC 食摂餌 TSNO マウスとは異なる肝臓マクロファージ動態を示すことを明らかにした。遺伝子欠損マウスの多くは C57BL/6 マウスであるため、iHFC#2 食誘導性 MASH モデルは、様々な分子の機能解析に有効な手段となることが期待される。今後、肝臓における RP105 発現細胞やそのシグナル伝達経路、および *Rp105*^{-/-}マウスの腸内細菌叢を解析することにより、MASH の発症・進展における RP105 の作用解明が進むことが期待される。

3. 抗生剤による腸内細菌叢の変化が、C57BL/6 マウスにおける MASH の発症・進展を調節する

さらに、抗生剤投与による腸内細菌叢の変化が、iHFC#2 摂餌 C57BL/6 マウスの MASH 病態に及ぼす影響について解析した。iHFC 食摂餌 TSNO マウスと同様に、iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウスの肝障害、脂肪変性および線維化は vancomycin (VCM) 投与により増悪した。しかし、これらの MASH 病態は TSNO マウスと比べて軽度であった。また VCM 投与により、C57BL/6 マウスの腸内細菌叢の多様性は大幅に減少し、グラム陽性菌は検出されなかった。したがって、iHFC#2 食による MASH の発症・進展に特定のグラム陽性菌が関与することを示した。また、C57BL/6 マウスにおいても、VCM 投与により MASH が増悪したことから、MASH の発症・進展に関与するグラム陽性菌は TSNO マウスと C57BL/6 マウスに共通して存在する腸内細菌種であることを示した。さらに VCM 投与により、iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウスでは deoxycholic acid が減少し、taurocholic acid (TCA) が増加した。TCA は小腸の腸管透過性を亢進させることが報告されていることから、VCM 投与は TCA の増加を介してマウスの腸管透過性を亢進させ、腸肝循環により肝臓の炎症を増悪させることを示した。また、VCM 投与は iHFC#2 食摂餌 C57BL/6 マウス肝臓におけるクッパー細胞を減少させ、単球由来 recruited マクロファージを増加させた。したがって、腸内細菌叢の変化が肝臓マクロファージの動態を変化させ、C57BL/6 マウスにおける iHFC#2 食誘導 MASH の発症・進展に影響を与えることを示した。

Ⅲ. 総括・今後の展望

本研究は、自然免疫および腸内細菌叢が MetS および MASH の発症に密接に関与することを示した（下図：本論文のまとめ参照）。本論文の独創的な点は、単一の自然免疫受容体の活性化が腸内細菌叢の構成に影響を与え、腸管バリア機能不全を促進し、MetS の発症・進展に寄与することを示したことである。また、ヒト病態を模倣する新規 MASH モデルマウスを確立し、その発症・進展における自然免疫受容体および腸内細菌の寄与を示した点である。今後、MetS または MASH の発症・進展に関与する自然免疫受容体の作用機序や特定の腸内細菌種を解明し、マクロファージおよび腸内細菌、胆汁酸を標的とした予防薬・治療薬の開発や、プロバイオティクスおよびプレバイオティクスの開発に貢献することが期待できる。

