

奨励金No.1498

脂質ストレスを制御する超分子ポリロタキサンを用いた NASH 治療戦略の開発

伊藤 美智子

東海国立大学機構名古屋大学環境医学研究所 メタボ栄養科学寄附研究部門 特任准教授

Development of therapeutic strategy for NASH using supramolecular polyrotaxane to regulate lipid stress

Michiko Itoh,

Department of Metabolic Syndrome and Nutritional Science, Research Institute of Environmental
Medicine, Nagoya University, Nagoya, Japan, Specially appointed associate professor



非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は炎症・線維化を特徴とし、肝硬変・肝細胞癌の主要な原因疾患として注目を集めている。NASHの病態形成にはコレステロールをはじめとする細胞障害性を有する脂質の蓄積増加が指摘されているが、コレステロール代謝を標的とする治療戦略は確立していない。本研究ではリソソームのコレステロール蓄積を制御する超分子ポリロタキサンのNASHに対する有効性を検討した。

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a chronic liver disease characterized by inflammation and fibrosis, and has emerged as a leading cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The concept of lipotoxicity has pointed out that cytotoxic lipids, such as cholesterol, may cause liver injury and promote the development of NASH. However, therapeutic approaches targeting cholesterol metabolism in NASH have not been established. In this study, we investigated the effectiveness of a supramolecular polyrotaxane designed to regulate cholesterol accumulation in lysosomes. Our findings offer promising insights into a potential therapeutic strategy for NASH by controlling lipid stress.

1. 研究内容

1.1 背景

メタボリックシンドロームの肝臓における表現型と言われる非アルコール性脂肪性肝疾患の中で、単純性脂肪肝は一般的に予後良好と言われるが、NASHは炎症・線維化と特徴とし、高率に肝硬変・肝細胞癌に進展する重症型として注目されている。単純性脂肪肝では中性脂肪が中心となって蓄積するが、NASHではコレステロールをはじめとする細胞障害性を有する脂質の蓄積が増加する（脂肪毒性）。コレステロールは肝細胞死を誘導し、慢性炎症の起点となるが、コレステロール合成酵素阻害剤であるスタチンのNASHに対する効果は

限定的である。本研究では肝細胞に蓄積したコレステロールの質的变化とその貪食処理にあたるマクロファージの機能変化に注目し、脂質ストレスによるNASH発症機構の解明および新規治療標的としての可能性を検証した。

1.2 研究手法と結果

1.2.1 NASHにおけるコレステロールの質的变化

著者らが独自に開発したNASHモデルマウス（Am. J. Pathol. 179: 2454-2463, 2011）の肝臓を電子顕微鏡で観察したところ、細胞死に陥った肝細胞の残余脂質内部にコレステロール結晶化が認められ、死細胞を取り囲んで貪食処理をするマクロ

ファージ内部に脂肪滴形成が認められた(図1)。このような死細胞を取り囲むマクロファージはCD11c陽性であることから(JCI Insight 2: e92902, 2017)、NASHの肝臓を分散し、CD11c発現レベルに応じてマクロファージを採取し、GC-MSにてコレステロール含量を測定した。野生型マウスやNASHのCD11c陰性マクロファージと比較して、CD11c陽性マクロファージではコレステロール含量の増加が認められた。

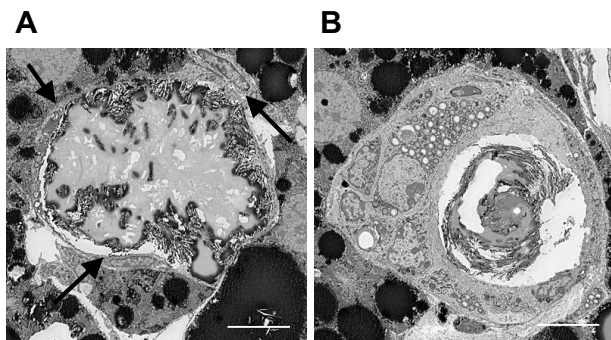


図1. NASH肝の電子顕微鏡像

A. 細胞死に陥った肝細胞の周囲をマクロファージが取り込み(矢印)、残余脂質内部に針状のコレステロール結晶が認められる。

B. 内部の脂質が減少すると、マクロファージ側に脂肪が蓄積する。

Scale bars, 10 μm (論文1より引用、改変)

1.2.2 NASHモデルマウスに対する超分子ポリロタキサンの投与

β -cyclodextrin (β CD)はコレステロールを捕捉して細胞外に排出する効果を有するが、細胞膜透過性が低く、細胞膜のコレステロール含量に変化を与えるため細胞毒性が大きな問題となる。共同研究者の東京医科歯科大学・田村博士は β CDと線状高分子を組み合わせて超分子 β CDポリロタキサンを構築し、酸分解性の修飾を行うことによりリソソームへの指向性を付加した(J. Control Release 269: 148-158, 2018)。 β CDポリロタキサンの体内動態を検討するため、蛍光標識 β CDポリロタキサンをマウスに投与し、血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓を採取して各臓器への分布を検討

したところ、肝臓に最も多く分布していた。さらに、肝臓を分散してFACS解析を行ったところ、肝細胞、類洞内皮細胞、マクロファージへの取り込みが多いことが明らかとなった。NASHモデルマウスに対して病態発症後に6週間持続皮下投与を行ったところ(30 mg/kg/day)、体重には変化はないものの、肝重量の低下と肝機能改善が認められ、組織学的に線維化が改善した。このとき肝コレステロール含量には変化がなく、CD11c陽性マクロファージのコレステロール含量が低下したことから、 β CDポリロタキサンはマクロファージに作用して肝線維化を改善することが示唆された。

1.2.3 培養マクロファージに対するコレステロール結晶添加

β CDポリロタキサンによる肝線維化改善効果の分子機構を検討するため、野生型マウスの正常肝および脂肪肝から肝マクロファージを採取し、それぞれにコレステロール結晶の添加実験を行った(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。正常肝・脂肪肝マクロファージともにリソソームへのコレステロール蓄積が認められ、リソソーム生合成を制御するMiT/TFE転写因子ファミリーの1つであるtranscription factor E3 (TFE3)の核内移行が認められたことから、リソソームストレスが加わっていると考えられた。 β CDポリロタキサンを同時添加すると(1 mM)、コレステロール蓄積およびTFE3の核内移行を抑制した。RNAシーケンス解析によって遺伝子発現プロファイルを比較したところ、正常肝・脂肪肝ともに発現誘導される遺伝子群(図2、クラスターE)と脂肪肝マクロファージのみに発現が誘導される遺伝子群(図2、クラスターB、C)が認められた。クラスターEにはリソソームストレスに関与する遺伝子が含まれ、クラスターB、CにはCD11cの他、線維化を促進する遺伝子が複数認められた。Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN)にて、脂肪肝マクロファージ特異的に発現が誘導された遺伝子群を制御する転写因子としてearly

growth response 1 (Egr1) が抽出された。死細胞を取り囲む CD11c 陽性マクロファージは他の散在性マクロファージとは異なる遺伝子発現プロファイルを有し、疾患特異的マクロファージ亜集団であることを提唱してきた (JCI Insight 2: e92902, 2017)。本研究により、死細胞に由来するコレステロールが TFE3、Egr1 を介して疾患特異的活性化を誘導することが示唆された。

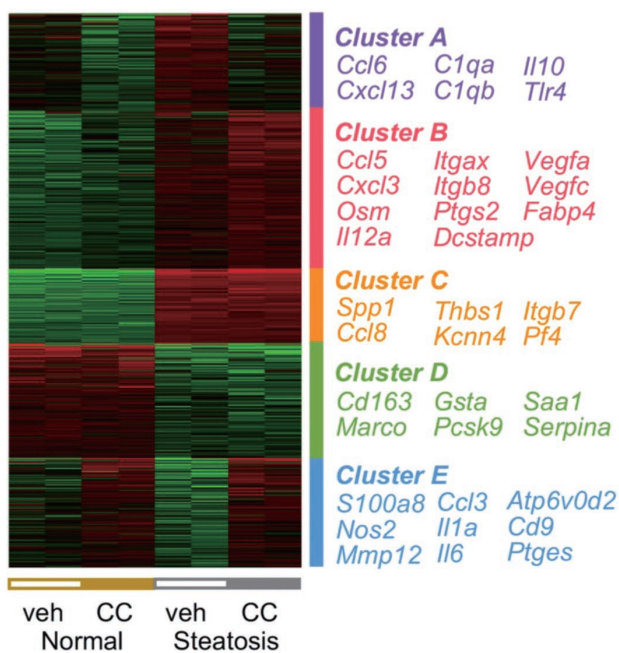


図2. 肝マクロファージに対するコレステロール結晶添加と遺伝子発現変化

正常肝 (Normal) および脂肪肝 (Steatosis) から単離した肝マクロファージに対してコレステロール結晶 (CC) を添加した (500 μ g/ml, 24 時間)。RNA シークエンスデータのクラスタリング解析 ($k=5$)、各クラスターに含まれる遺伝子を右側に記載。(論文1より引用)

2. 発表（研究成果の発表）

【論文】

- Itoh M, Tamura A, Kanai S, Tanaka M, Kanamori Y, Shirakawa I, Ito A, Oka Y, Hidaka I, Takami T, Honda Y, Maeda M, Saito S, Murata Y, Matozaki T, Nakajima A, Kataoka Y, Ogi T, Ogawa Y, Suganami T. Lysosomal cholesterol overload triggers macrophage

phenotypic changes and promotes liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *J. Exp. Med.* *In press.*

【学会発表】

- 伊藤美智子、菅波孝祥：NASH 病態形成における脂肪毒性の理解と医学応用。第9回肝臓と糖尿病・代謝研究会、鹿児島、2023/5/13
- Itoh M, Tanaka M, Suganami T. Lysosomal cholesterol overload triggers macrophage phenotypic changes and promotes liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. Keystone Symposia for the meeting on Metabolic Syndrome and Diabetes as Drivers of NAFLD/NASH, Banff, Canada, 2023/3/21
- 伊藤美智子、菅波孝祥：The role of cholesterol overload in macrophages as a novel molecular mechanism of non-alcoholic steatohepatitis. 第100回日本生理学会大会、京都、2023/3/15
- 伊藤美智子、金井紗綾香、白川伊吹、田中都、小川佳宏、菅波孝祥：NASH 発症におけるマクロファージのリソソーム機能障害と病態生理的意義の解明。第43回日本肥満学会学術集会、那覇、2022/12/1
- 伊藤美智子、田村篤志、金井紗綾香、白川伊吹、田中都、金森耀平、小川佳宏、菅波孝祥：マクロファージの脂質代謝障害に着目した NASH 発症機構の解明。第95回日本生化学会大会、名古屋、2022/11/09