

研究・調査報告書

分類番号	報告書番号	担当
B-540	22-280	元高崎健康福祉大学 八田慎一
題名(原題/訳)		
Macrophage-derived MLKL in alcohol-associated liver disease: Regulation of phagocytosis. アルコール関連肝疾患のマクロファージ誘導性 MLKL: 食作用の調節		
執筆者		
Wu X, Fan X, McMullen MR, Miyata T, Kim A, Pathak V, Wu J, Day LZ, Hardesty JE, Welch N, Dasarathy J, Allende DS, McCullough AJ, Jacobs JM, Rotroff DM, Dasarathy S, Nagy LE.		
掲載誌		
Hepatology. 2023; 77(3):902-919. doi: 10.1002/hep.32612.		
キーワード		PMID:
アルコール、肝臓炎症、MLKL、マクロファージ、免疫細胞、ネクローシス		35689613
要旨		
<p>目的:ネクローシス(Necpt)はネクローシス様の表現型を示す制御されたプログラム細胞死で、古典的な Necpt 経路は RIP3 仲介性の MLKL (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase) のリン酸化に依存し、リン酸化された MLKL は細胞膜と結合し、オリゴマーを形成して Necpt を仲介する穴を形成する。MLKL はアルコール関連肝疾患 (ALD) の肝臓炎症や肝障害の調節で重要な細胞内小胞の輸送で役割を果たしていることが示唆されている。しかし、Necpt とは独立した MLKL の機能の ALD に対する影響は分かっていない。我々は、RIP3 欠損マウスはエタノール (EtOH) による肝障害を防御するが、MLKL 欠損マウスでは肝障害の部分的な防御しか示さないことを報告した。このことから、MLKL の細胞特異的な機能が EtOH による障害に関与していることが考えられる。本研究はこの点について検討を加えた。</p> <p>方法:MLKL 欠損マウス (<i>Mkl1</i>^{-/-})、RIP3 欠損マウス (<i>Rip3</i>^{-/-})、C57BL/6J マウス (WT) を使用した。In vitro の実験にはマウス肝臓から調製したクッパー細胞 (KC)、マウス骨髄から調製したマクロファージ ($M\Phi$)、RAW264.7 細胞を使用した。一部の実験にはアルコール性肝炎 (AH) 患者血液を使用した。マウスへは Gao-binge 投与法で EtOH を投与した。肝臓と免疫細胞での MLKL の機能的役割の確認のために、マウスは放射線照射後[骨髄細胞の除去]、<i>Mkl1</i>^{-/-}と WT の間で骨髄移植 (BMT) 実験を行った。食作用は pHrodo™-labeled E.coli Bioparticles® を使用して解析した。組織は免疫組織化学法と免疫蛍光組織化学法で評価した。肝臓遺伝子変化は RNA-seq 法で解析した。mRNA は qRT-PCR 法で、タンパク質はウエスタンブロット法で測定した。</p> <p>結果:EtOH による肝障害や脂肪症、炎症は <i>Mkl1</i>^{-/-}→WT (骨髄細胞での <i>Mkl1</i> 欠損) への BMT で悪化したが、非骨髄細胞の <i>Mkl1</i> 欠損 (WT→<i>Mkl1</i>^{-/-}) は EtOH による障害に影響しなかった。さらに、骨髄細胞での <i>Mkl1</i> 欠損で EtOH による肝臓での細菌負荷と免疫細胞の蓄積が悪化した。LPS 曝露した RAW264.7 細胞あるいは骨髄由来 $M\Phi$ で、MLKL の mRNA とタンパク質の発現増加、リン酸化 MLKL の増加、STAT1 仲介性の MLKL 発現誘導、ファゴソームやリソソームなどの細胞内区画への MLKL の移行とオリゴマー形成が誘導された。MLKL の薬理的 (GW806742X) あるいは遺伝的阻害 (<i>Mkl1</i>^{-/-}) は KC の食食能を抑制し、これは EtOH 処置の有無の関わらず LPS 曝露した KC でも同様の抑制が見られた。さらに、AH 患者と健常対照者の末梢血単球の食作用は GW806742X 処置で抑制された。In vivo 食作用の実験から、<i>Mkl1</i>^{-/-} の KC は WT の KC よりも Bioparticles の食食が少ない (食作用の低下) ことが示された。</p> <p>結論:本研究は、初めて、肝臓自然免疫恒常性における $M\Phi$ MLKL の役割を同定し、$M\Phi$ 食作用の調節における Necpt とは独立した MLKL 機能を明らかにした。本研究の結果は、骨髄 MLKL は肝臓免疫細胞恒常性と $M\Phi$ 食作用を調節することで EtOH による肝臓炎症と肝障害を制限していることを示している。</p>		