

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業
難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究
分担研究報告書

急性肝障害におけるマクロファージを中心とした修復過程の解明

研究分担者 井戸 章雄 鹿児島大学学術研究院医歯学域医学系
消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨：急性肝不全は予後不良な疾患であり、肝移植以外に有効な治療法はない。現在我々は、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF) に着目し、臨床応用に向け準備を行っているが、HGF による治療効果をより向上させるためには急性肝不全の病態を理解する必要がある。今回我々はアセトアミノフェン (APAP) 誘導急性肝障害モデルマウスを用いて急性肝障害の修復期に着目し、その過程で重要な役割を果たしていると考えられるマクロファージを中心に解析することとした。APAP 単回投与により肝障害のピークを超えた修復期では肝細胞壊死部周囲にマクロファージは著明に浸潤し、肝再生に重要な TNF- α 、IL-6、抗炎症に作用する TGF- β 、IL-10 及び線維化に関連する分子である TIMP-1、TIMP-2、MMP-12、MMP-13 も同様に亢進していた。これらの分子はマクロファージにも発現している肝再生において重要な分子であり、今後マクロファージにおけるこれらの分子と HGF-MET シグナリングとの関わりについてさらなる解析を行う。

A. 研究目的

急性肝不全は予後不良の疾患であり、特に昏睡型は内科的治療による救命率が低く、肝移植以外に有効な治療法はない。我々は以前より急性肝不全に対する新規治療薬の開発を目指している。その中でも、HGF に着目し、臨床応用に向け準備を行っている。以前医師主導型治験において劇症肝炎症例 4 例に HGF を投与した際に HGF の安全性は確認できたが、有効性は示せなかった。HGF は肝細胞の増殖を強力に誘導するが、急性肝不全のような著明な肝細胞死を伴う病態においては再生不全の病態が主となり、HGF が効果的に作用していない可能性もあり、HGF による治療効果を最大限に発揮するためのタイムポイントは未だ不明である。

一方で、急性肝不全の病態及び修復過程を知る上で重要なキープレイヤーはマクロファージである。マクロファージは TNF- α 、IL-6 を産生し、肝細胞を G0 から G1 期に移行させ、HGF による肝細胞増殖のプライミングを行う。また我々の検討でも四塩化炭素誘導急性肝障害モデルにおいて、修復期に浸潤するマクロファージのみをクロドネートで欠損させると、肝障害が遷延し、修復が遅延することを明らかにした。またマクロファージには HGF の特異的受容体である c-Met が発現していることも報告されている。我々は骨髄細胞由来マクロファージを IFN- γ +LPS にて炎症性の M1 マクロファージに誘導すると、c-Met を発現し、炎症性のマクロファージから抗炎症性の M2 様マクロファージにリプログラミング

されることを報告した。このように HGF は肝細胞の増殖のみならず、マクロファージの表現型に影響を与える。今まで肝細胞の増殖を中心とした再生、修復過程の病態解析ではなく、免疫担当細胞であるマクロファージを中心に急性肝障害の病態、修復過程を解析することにより、より HGF 治療の効果的な投与タイミングを明らかにできると考えた。

今回我々は、アセトアミノフェン誘導急性肝障害モデルマウスを用いて、肝障害の急性期ではなく、肝障害のピークを超えた修復期に着目し、マクロファージを中心に病態を明らかにする。

B. 研究方法

C57BL6 雄マウス (10 週齢~12 週齢) を用いて、16 時間絶食後、アセトアミノフェン (APAP) 300mg/kg を単回投与し経時的 (day 0, 1, 2, 3, 4, 5) に各群 4 匹ずつ評価した。評価項目は 1) 血清 AST、ALT、総ビリルビン、アルブミン、PT%、PT-INR、2) 体重、肝重量/体重比、3) 肝病理学的検査 (H-E 染色、シリウスレッド染色、CD68)、4) 肝組織中の mRNA 発現について評価した。

(倫理面への配慮)

本実験は鹿児島大学動物実験委員会において承認され、人道的エンドポイントを設定し、使用する動物の苦痛がないように配慮した。

C. 研究結果

1) まず AST 及び ALT は APAP 投与後 day 1 にてピークを迎え、day 2 以降は徐々に改善した。総ビリルビンやアルブミンは変化なかったが、PT%や PT-INR は AST、ALT と同様に day 1 で著明に低下及び延長し、day 2 以降はベースラインまで改善した (図 1)。

2) 体重は APAP を投与しなかった群に比し、著明な減少あり、day 2 をピークに改善した。肝重量及び肝重量/体重比は差がなかった (図 2)。

図1: Blood examination_APAP mice

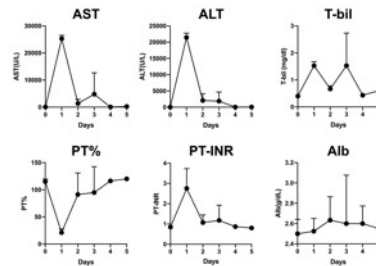
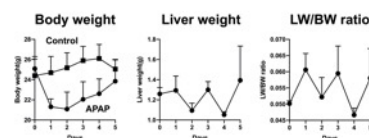


図2: Body weight_Liver weight_APAP mice



3) 肝組織は、まず H-E 染色で day 1-2 に中心静脈周囲に著明な肝細胞壊死の所見を認め、day 3 では壊死部周囲に炎症細胞浸潤及び壊死部の縮小を認めた。Day 4-5 にかけてはさらに壊死部は縮小傾向となった。シリウスレッド染色では、day 1-2 ではほとんど線維化ないが、day 3-5 にかけて壊死部に線維化を認めた。マクロファージのマーカーである CD68 は、day 1-2 に壊死部周囲に集簇し、day 3-5 にかけて徐々に増加した (図 3)。

4) 肝組織中の mRNA 発現では、day 3-5 にかけて TNF-alpha、IL-6、TGF-beta、IL-10、TIMP-1、TIMP-2、MMP-12、MMP-13 発現が亢進していた (図 4)。

図3: Pathological findings_APAP mice

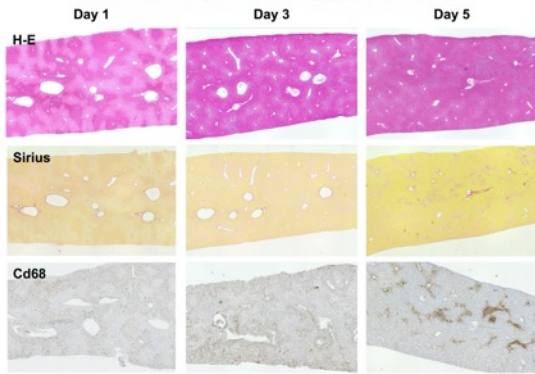
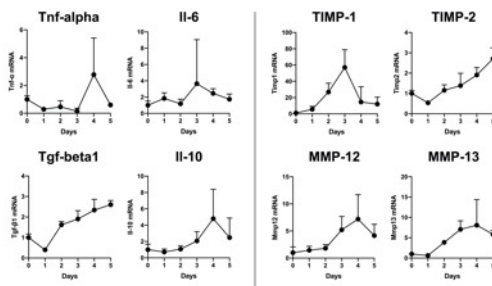


図4: mRNA expression_APAP mice



D. 考察

まず急性肝障害の急性期から修復期にかけて観察可能なモデルの作製を行った。欧米では急性肝不全の原因として多いアセトアミノフェン大量投与を反映したアセトアミノフェン大量投与による急性肝障害マウスを用いた。既報通り、day 1に肝障害のピークがあり、その後改善した。また我々が今回解析するマクロファージに関しても、肝細胞が壊死した部位の周囲に多数浸潤しており、肝障害のピークを超えた修復期において特に浸潤が著明であり、修復期において重要な役割を果たしていることが推測された。mRNA発現では、day 3以降に肝再生に重要なTNF- α 、IL-6の発現が亢進し、抗炎症に作用するTGF- β 、IL-10及び肝細胞再生の足場に重要な線維化に関連する分子であるTIMP-1、TIMP-2、一方で過剰な線維化を抑制するMMP-12、MMP-13も同様に亢進していた。本モデルにおいては急

性肝障害のピークを超えたday 3以降に肝再生に重要な分子が発現していた。

E. 結論

今回急性期から修復期にかけて観察可能な急性肝障害モデルを作製した。今後は本モデルを使用し、障害肝に浸潤するマクロファージに着目し、さらに解析を進め、HGF-METシグナリングが浸潤マクロファージに与える影響や新たな修復関連分子についても解析する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishikoba N, Kumagai K, Kanmura S, Nakamura Y, Ono M, Eguchi H, Kamibayashiyama T, Oda K, Mawatari S, Tanoue S, Hashimoto S, Tsubouchi H and Ido A (2020) HGF-MET Signaling Shifts M1 Macrophages Toward an M2-Like Phenotype Through PI3K-Mediated Induction of Arginase-1 Expression. *Front. Immunol.* 11:2135. doi: 10.3389/fimmu.2020.02135

熊谷 公太郎, 馬渡 誠一, 井戸 章雄, 急性肝不全—病態解明: 発症機序から肝再生まで—, 日本消化器病学会雑誌, 2020, 117 巻, 9 号, p. 750-755

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし