

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19350

研究課題名(和文) 肝線維化に伴う脾腫は単なるうっ血なのか？：肝線維化進展と脾臓の免疫調節機能の関連

研究課題名(英文) Is congestion only the reason for splenomegaly in liver cirrhosis? -What are the splenic immunological effects on liver fibrosis development?-

研究代表者

青山 友則 (AOYAMA, TOMONORI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10622673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝線維化に伴う脾腫はうっ血が主因とされているが、免疫機構については不明である。本研究では、線維肝の脾臓で抗菌蛋白リポカイン2 (Lcn2)の強発現を認めた。また、このLcn2は肝在住マクロファージであるKupffer細胞の活性抑制作用がある上に、線維化誘導前の脾摘で門脈血中のLcn2が減少し、肝線維化の増悪を認めた。一方、この脾摘による変化は腸管滅菌で認めなくなった。以上より、肝線維化進展における脾臓はLcn2を分泌し門脈を介して腸内細菌によるKupffer細胞の過剰活性を抑制し肝線維化進展を阻止する役割を有することが考えられた。進化の過程で温存されているが、未知である脾臓の一端が分かった。

研究成果の概要(英文)：The splenic immunological effects on liver fibrosis development are unclear. Increased Lipocalin-2 (Lcn2), an anti-microbial protein, was detected on the spleen with fibrotic liver in mice. Lcn2 suppressed excessive Kupffer cells activation, that lead inhibiting hepatic stellate cells activation. Splenectomized mice showed enhanced liver fibrosis and inflammation accompanied by significantly decreased Lcn2 levels in portal vein (PV). Interestingly, gut sterilization blocked the effect of splenectomy on liver fibrosis development. Thus, the splenic Lcn2, that enter the liver through PV, might have an important role in regulating Kupffer cells activation which relates to gut-derived products in liver fibrosis development.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝線維化 脾臓 マクロファージ 肝星細胞 リポカイン2 腸内細菌 Kupffer細胞 腸肝関連

1. 研究開始当初の背景

様々な肝疾患の原因として肝における免疫機構の異常が考えられている。これまで申請者は肝マクロファージに着目し研究を進め、肝マクロファージの活性異常が肝線維化の増悪や肝再生不全を惹起することを明らかにしてきた。(Aoyama et al. Hepatology, 2010. Aoyama et al, Hepatology, 2009)。一方、肝マクロファージは門脈血が直接流入する類洞に存在するが、この門脈は脾静脈からの血流を受ける。したがって、門脈血には脾臓から分泌される分子が多数存在することが考えられ、類洞にある肝マクロファージの活性異常に影響することが推測される。

脾臓には網内系細胞やリンパ球などが存在し、脾臓はこれらの免疫細胞による血球貪食や抗体産生により生体防御をはじめとした免疫調節の役割を担っている。感染症や炎症性疾患および造血器腫瘍で認められる脾腫は、これらの免疫反応によるものと考えられている。一方、肝線維化に伴っても脾腫が認められるものの、脾腫の原因については門脈圧亢進に伴ううっ血が主因であると考えられている。しかし、脾臓の本来の役割から推測される脾臓内の免疫調節機構の変化と肝線維化進展との関連については不明である。本研究では肝線維化に伴い脾臓内で発現するサイトカインに着目し、これらの分子の門脈を介した肝マクロファージの活性化制御と肝線維化との関連を明らかにする。申請者は研究を進めていく上で以下の予備的研究結果を得た。

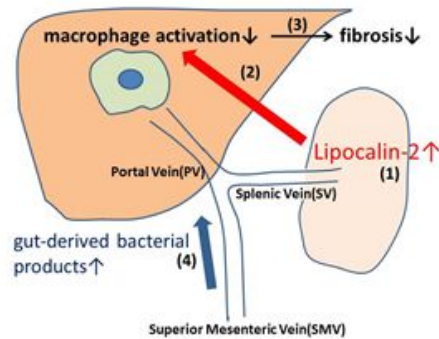
- (1)四塩化炭素 (CCl4) 慢性投与による肝線維化モデルにおいて、脾臓内のサイトカインの発現を RT-PCR にて測定した。CCl4 投与群の脾臓で Vehicle 投与群と比較し、Lipocalin-2(以下 Lcn2)mRNA の発現が約 35 倍増強した。一方、他のサイトカインについてはほとんど差を認めなかった。
- (2)あらかじめ脾摘を行った脾臓欠損マウスと偽手術を行ったマウス (sham マウス) に対し、CCl4 慢性投与を行うと脾臓欠損マウスで肝線維化の増強を認めた。
- (3)CCl4 投与後の脾臓欠損マウスと sham マウスの門脈血中の Lcn2 値は、脾臓欠損マウスで有意な低下を認めた。(sham マウス: 465.9 ± 30.6ng/mL, 脾臓欠損マウス: 327.5 ± 35.0ng/mL, p<0.05)

Lcn2 は細菌感染で誘導され、抗菌作用を有する分泌蛋白の一つである (Flo TH et al, Nature, 2004)。さらに、Lcn2 は脂肪細胞やマクロファージの細胞株に対して活性化の制御をはじめとする調節作用を有する報告がある (Zhang J et al, Mol Endocrinol, 2008)。一方、肝障害に伴い腸管透過性が亢進し、腸内細菌由来の流入抗原の増加が起こり肝マクロファージの活性異常を呈するこ

とが知られている (Schwabe R et al, Gastroenterology, 2006)。したがって、予備的研究結果で得られた脾臓内の Lcn2 高発現は Lcn2 の作用を考慮すると、腸内細菌由来の流入抗原に対する脾臓の免疫反応であることが推測された。以上より、この脾臓から分泌された Lcn2 が肝マクロファージの活性化制御に関与し、肝線維化進展を抑制する方向に働く可能性が考えられた。

2. 研究の目的

上記の研究背景および予備的研究結果より申請者は、肝障害に伴って増加した腸内細菌由来の流入抗原に対して脾臓はその防御機構として Lcn2 を分泌することにより、門脈を介して肝マクロファージの活性異常を是正し、肝線維化進展を抑制する仮説を立てた (下図)。本研究ではこの仮説のもと以下の項目について明らかにする。



- (1)脾臓における Lcn2 発現細胞の同定を行う。また障害肝における脾臓内の Lcn2 発現細胞の数や局在を調べ、肝線維化進展に伴う脾腫のメカニズムの一端を明らかにする (図の(1))
- (2)recombinant Lcn2 (以下 rLcn2) による肝マクロファージにおけるケモカインやサイトカインの発現変化を調べる。また、これらの発現調節に関連する細胞内シグナルを解析する (図の(2))
- (3)肝マクロファージと肝線維化のエフェクター細胞である肝星細胞の共培養を行い、rLcn2 による肝マクロファージの活性変化と肝星細胞活性化との関連を明らかにする (図の(3))。
- (4)脾臓における Lcn2 の発現が腸内細菌由来の流入抗原に対する防御機構として働いている可能性があることから、腸管滅菌をあらかじめ行った上で脾臓を摘出する。その後、肝線維化を誘導し、腸管滅菌を行わず脾摘をした群と比べ、肝線維化が軽減するかどうか調べる。肝線維化進展における腸-脾-肝の相関を明らかにする (図の(4))。

(5)Lcn2 ノックアウトマウス(以下 Lcn2KO マウス)を用い、同様なモデルを作成する。脾摘による肝線維化増強効果の有無を調べる。また Lcn2KO 肝マクロファージの活性化機序を解析し、野生型肝マクロファージとの比較を行う。肝マクロファージにおける Lcn2 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)脾臓における Lcn2 発現細胞の同定

CCI4 投与群および Vehicle 投与群より摘出した脾臓における Lcn2 発現細胞の同定を行う。モデルは異なるもののこれまでに Gr1 陽性細胞での Lcn2 の発現が報告されており(Zhao et al, Cell, 2012)、本研究においても Gr1 および Lcn2 による二重蛍光免疫染色を行う。また、Lcn2 陽性細胞の数や赤脾髄・白脾髄および marginal zone における脾臓内の局在を明らかにする。計画通り進まなかった場合はフローサイトメトリー(FACS)を使用し解析する。

(2)rLcn2 による肝マクロファージにおけるケモカインやサイトカインの発現変化および細胞内シグナルの解析

野生型マウスよりコラゲナーゼ灌流法により肝マクロファージを単離する。単離した肝マクロファージを1日間培養した上で、その後 control 群、lipopolysaccharide(LPS)単独投与群、LPS + rLcn2 投与群に分ける。投与6時間後に細胞を採取する。CCL2、TNF- α 、IL-6、IL-10 などのケモカインやサイトカインの発現を RT-PCR を用いて調べる。また、最近になり Lcn2 のシグナル伝達には NF- κ B および STAT3 の関与が報告されているため(Guo et al, Mol Endocrinol, 2014)、NF- κ B 阻害剤や STAT3 阻害剤を用いて rLcn2 による肝マクロファージの変化が認められないかどうか調べ、Lcn2 の細胞内シグナルを明らかにする。rLcn2 の投与量は予備的研究結果において sham マウスと脾臓欠損マウスの門脈血中 Lcn2 濃度が約 150ng/mL 異なることから、rLcn2 の濃度を 150ng/mL に設定する。計画通り進まなかった場合は、rLcn2 の濃度や細胞を採取する時間を変える。また、肝マクロファージの単離をコラゲナーゼ灌流法ではなく、FACS による sorting にて肝マクロファージを単離することも考慮する。

(3)rLcn2 を投与した肝マクロファージによる肝星細胞活性化制御の共培養を用いた解析

CCI4 または Vehicle を投与したマウスよりそれぞれコラゲナーゼ灌流法で肝マクロファージを採取し、1日間培養する。これらの肝マクロファージと、カリフォルニア州サンディエゴ校医学部 デービットブレナー研究室より供与して頂く collagen promoter-driven GFP トランスジェニックマウス(Krempen K et al, Gene Expr 1999: collagen-GFP マウス)

からコラゲナーゼ/プロナーゼ灌流法にて単離した肝星細胞を共培養する。このマウスから単離した細胞は collagen のプロモータが活性化すると GFP 陽性となる。共培養時に肝マクロファージに対して rLcn2 (150 ng/mL) を投与する群と投与しない群に分け、肝星細胞の活性化を GFP 陽性細胞数にて測定する。rLcn2 を投与した肝マクロファージと共培養した肝星細胞では活性化が抑制され、GFP 陽性細胞が減少することを仮説とする。計画通り進まなかった場合は、肝星細胞のコラーゲン発現を RT-PCR にて測定する。また、肝星細胞を採取する時期(静止期・活性期)を変更する。

(4)脾臓欠損マウスの肝線維化増悪に対する腸管滅菌の効果の検証

野生型マウスに対しアンピシリン(1 g/L)、ネオマイシン(1 g/L)、バンコマイシン(500 mg/L)、メトロニダゾール(1 g/L)を添加した飲水摂取により腸管滅菌を行う(Rakoff-Nahoum et al, Cell, 2004)。腸管滅菌開始3週後に脾摘を行い、その後肝線維化モデルを作成する。腸管滅菌は肝線維化モデル作成中も継続する。作成方法としては CCI4 (0.5 μ l/g) を週2回合計12回腹腔内投与を行い最終投与48時間後に屠殺し作成する。肝線維化は Sirius red 染色および肝内ハイドロキシプロリンの測定により評価する。また、in vivo における肝星細胞活性化を α -smooth muscle actin の免疫組織染色および western blot 法により評価する。さらに、線維化関連因子である collagen 1(α 1), TGF- β , TIMP-1 などの肝組織中 mRNA レベルを RT-PCR 法により測定し、上記結果と合わせて肝線維化の評価を行う。一方、肝組織中の炎症性変化を調べるため、血清 ALT 値の測定を行い、TNF- α 、IL-6、IL-10 などの炎症性/抗炎症性サイトカインの肝組織中 mRNA レベルを RT-PCR 法により測定する。また、肝マクロファージ数および活性化を F4/80 および CD68 の免疫染色により評価する。さらに、門脈血中の Lcn2 値を ELISA 法により測定し、予備的研究にて得られた腸管滅菌を行わなかった群と比較する。腸管滅菌の Lcn2 分泌への影響を明らかにする。計画通り進まなかった場合は、抗生剤および投与期間の変更を行い腸管滅菌の効果を検証する。

(5)Lcn2KO マウスにおける脾摘後の肝線維化および Lcn2KO 肝マクロファージ活性化機序の解析

Lcn2KO マウスに対して、予備的研究にて野生型マウスに対して施行した方法と同様に脾摘を行い肝線維化を誘導する。雄性7週齢の Lcn2KO マウスに対して脾摘または偽手術(sham マウス)を行い、8週より CCI4 (0.5 μ l/g) または Vehicle を週2回合計12回腹腔内投与を行い最終投与48時間後に屠殺し肝線維化モデル作成する。D)と同様に肝組織中

の線維化および炎症性変化を評価する。また、CC14 投与および Vehicle 投与 sham マウスから脾臓を摘出し、脾臓の重量および HE 染色にて組織学的変化を調べる。さらに Lcn2KO マウスからコラゲナーゼ灌流法により肝マクロファージを単離し、LPS 刺激後の CCL2、TNF- α 、IL-6、IL-10 などのケモカインやサイトカインの発現を RT-PCR を用いて調べ、野生型マウスより単離した肝マクロファージと比較する。また B)と同様に NF- κ B 阻害剤や STAT3 阻害剤により細胞内シグナルを同定する。計画通り進まなかった場合、例えば Lcn2KO マウスが脾摘後や CC14 投与中に死亡した場合は、むしろ Lcn2 の生体防衛的役割が明らかとなるため野生型マウスとの生存率を検証する。

4. 研究成果

(1)脾臓における Lcn2 発現細胞の同定
Gr1 および Lcn2 による二重蛍光免疫染色を行ったところ、Gr1 陽性細胞のほとんどで Lcn2 の発現を認めた。また、これら Gr1 + Lcn2 + 細胞は主に赤脾髄で認められた。さらに、Gr1 + Lcn2 + 細胞は CC14 により肝線維化を誘導したマウスの脾臓において CC14 非投与マウスの脾臓と比べ約 3 倍に増加した。以上のことから、線維肝における脾臓は、単にうっ血だけではなく、赤脾髄において Gr1 陽性細胞の増加を認め、これらが脾腫を形成する一因となっていることが考えられた。さらに、Gr1 陽性細胞は Lcn2 を分泌し、前述した予備実験の Lcn2 門脈血中濃度が脾摘群で低下していることを踏まえ、Gr1 陽性細胞から分泌された Lcn2 が脾静脈 門脈を介して肝に影響することが推察された。

(2)rLcn2 による肝マクロファージにおけるケモカインやサイトカインの発現変化および細胞内シグナルの解析

上記 (1) の結果より、Lcn2 の肝への影響を *in vitro* で調べた。解剖学的に門脈から肝に流入する血液はまず類洞に入る。類洞には肝在住マクロファージである Kupffer 細胞を含めた肝マクロファージが存在することからまず rLcn2 の肝マクロファージに対する影響を調べた。野生型マウスよりコラゲナーゼ灌流法にて肝マクロファージを採取し LPS 添加群と LPS + rLcn2 (150ng/mL) 添加群でサイトカイン発現を qPCR で測定した。LPS + rLcn2 群では LPS 単独群と比べ、炎症性サイトカインである TNF- α および CCL2 mRNA 発現が有意に低下した。IL-10 mRNA は変化を認めなかった。これらの発現調節に関わる因子については今回の研究では同定できず更なる解析が必要であった。

(3)rLcn2 を投与した肝マクロファージによる肝星細胞活性化制御の共培養を用いた解析

(2)の結果により rLcn2 は LPS による肝マク

ロファージの活性を抑制することが明らかとなった。一方、rLcn2 の肝星細胞への影響を調べるため、collagen-GFP マウスよりコラゲナーゼ/プロナーゼ灌流法により肝星細胞を採取し、rLcn2 を添加した。GFP 陽性細胞数は rLcn2 添加群と非添加群で差を認めなかった。以上のことから、rLcn2 は肝星細胞の活性には直接影響しないことが考えられた。次に、単離した肝星細胞と rLcn2 を添加した肝マクロファージ、または非添加群の肝マクロファージとを共培養し、肝星細胞の GFP 陽性細胞数を調べた。GFP 陽性細胞数は rLcn2 添加肝マクロファージとの共培養群で有意に減少した。以上のことから、rLcn2 は肝マクロファージの活性抑制を介して肝星細胞の活性化を抑制することが考えられた。したがって、脾臓由来の Lcn2 は類洞にある Kupffer 細胞の過剰活性を制御し、肝星細胞の活性を抑制し、肝線維化進展を阻止することが推察された。

(4) 脾臓欠損マウスの肝線維化増悪に対する腸管滅菌の効果の検証

上述の実験結果より、抗生剤により腸管由来の外来抗原を除去し腸管滅菌を行った場合、肝線維化進展における脾臓の役割がどのように変化するか調べた。上述の抗生剤を投与したうえで、脾摘群および非脾摘群に分け、CC14 による肝線維化モデルを作製した。この結果、あらかじめ抗生剤を投与すると抗生剤非投与状態と比べ肝線維化は減弱した上で、脾摘群および非脾摘群で肝線維化の程度に差を認めなかった。

これらは、肝組織中線維化関連因子の発現、F4/80 免疫染色による肝組織中マクロファージ数、肝組織中炎症性/抗炎症性サイトカインの発現も両群で差を認めなかった。さらに、抗生剤投与 CC14 肝線維化モデルの門脈血中の Lcn2 濃度は、抗生剤非投与状態と比較し低下した一方で、抗生剤投与下では脾摘群と非脾摘群で Lcn2 濃度に差は認めなかった。以上のことから、腸管滅菌を行うと肝線維化進展における脾臓の影響は認めなくなることが明らかとなった。

腸管由来の外来抗原に対して肝は免疫調節機構を有しているが、何らかの原因によりその免疫調節機構が破綻し Kupffer 細胞過剰活性化 肝星細胞活性化 肝線維化進展と至ることが知られている。

本研究によって、この過程において脾臓の Gr1 陽性細胞から分泌される Lcn2 が門脈を介して肝臓へ流入し、Kupffer 細胞の過剰活性の抑制を経て肝星細胞の活性化を抑制し、肝線維化進展阻止することが明らかとなった。

脾臓は未知なる臓器であるが人類の進化の過程の中で温存され続けている。そして、脾臓と腸管の静脈系のみが門脈を介して肝臓へ流入する。この肝-腸-脾相関を介して生体

は肝線維化阻止を行っている可能性があるものと考えられた。肝線維化進展のメカニズムにおいて肝-腸-脾相関は重要な役割を担っていることが推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1) Spleen-derived lipocalin-2 in the portal vein regulates Kupffer cells activation and attenuates the development of liver fibrosis in mice. Aoyama T, Kuwahara-Arai K, Uchiyama A, Kon K, Okubo H, Yamashina S, Ikejima K, Kokubu S, Miyazaki A, Watanabe S. Lab Invest. 97:890-902.2017 査読あり

2) 肝硬変に伴う脾腫は本当にうっ血だけなのか? - 脾臓の免疫調節機構と肝線維化進展 - 青山友則. 月刊 細胞. 特集 脾臓研究の最前線 2017年4月 査読あり

[学会発表](計4件)

1) 2016年 アメリカ消化器病週間

Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Hironao Okubo, Shunhei Yamashina, Kenichi Ikejima, Shigehiro Kokubu, Akihisa Miyazaki, Sumio Watanabe 「Spleen-derived lipocalin-2 in the portal vein, the production of which is triggered by gut-derived products, regulates Kupffer cells activation and attenuates the development of liver fibrosis in mice.」

2) 2016年 肝細胞研究会

青山友則、内山明、今一義、山科俊平、池嶋健一、渡辺純夫

「肝線維化進展と脾臓の免疫調節機構：腸-肝相関に対する脾臓の関与」

3) 2016年 日本肝臓学会総会

青山友則、宮崎招久、渡辺純夫

「肝線維化進展における腸-肝相関に対する脾臓の役割」

4) 2016年 アジア太平洋消化器病週間

Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Shunhei Yamashina, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe

「Splenic Lipocalin-2 regulates not iron metabolism but Kupffer cells activation during the development of liver fibrosis in mice.」

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

肝細胞研究会 研究交流

青山友則

「肝疾患において脾臓は本当に邪魔な存在なのか? -脾臓のリポカリン2が門脈を介し Kupffer 細胞の過剰活性を抑制し肝線維化進展を阻止する」

2017年6月

<http://hepato.umin.jp/kouryu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

青山友則 (AOYAMA, Tomonori)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10622673

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし