

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15760

研究課題名(和文) 自然免疫細胞による肝修復とBLT1 シグナルの新たな役割

研究課題名(英文) Role of BLT1 signaling in innate immune cells in liver repair

研究代表者

古城 憲 (Kojo, Ken)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：20525414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝修復における自然免疫細胞の役割をアセトアミノフェン肝障害モデルを用いて検討した。BLT1欠損好中球を野生型マウスに投与すると肝修復が遅延し、炎症性マクロファージが修復性マクロファージよりも増加した。BLT1欠損マウス好中球ではアポトーシスが抑制された。またBLT1シグナルに依存してマクロファージ貪食能が亢進した。骨髄マクロファージをレゾルビンで刺激するとBLT1シグナルに依存してマクロファージ形質転換が促進された。以上から肝障害後には集積した好中球がアポトーシスをきたしBLT1シグナルを介してマクロファージを修復性に分化誘導することで肝修復が促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は好中球BLT1シグナルが急性炎症の進行にだけでなく、炎症収束や組織修復にも関与するという従来とは異なるBLT1シグナルの役割を解明するものである。炎症組織が修復する過程には浸潤好中球から発信されるメッセージをマクロファージが受容することが重要である。本研究は、BLT1シグナルがレゾルビンRvE1を介して好中球とマクロファージによる一連の肝修復過程を連結させる作用があることを明らかにした。生体反応カスケードを連動させるBLT1シグナル伝達作用の機序の一端が解明されたことによって、今後、生理活性脂質による肝再生治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The aims of the present study were to examine the roles of leukotriene B4 receptor (BLT1) in innate immune cells in liver repair after acetaminophen (APAP)-induced liver injury. We examined the role of BLT1 by comparing the responses of BLT1 knockout (BLT1^{-/-}) mice and wild type (WT) mice in liver repair following APAP hepatotoxicity. Deletion of neutrophils delayed liver repair in APAP-treated WT mice. BLT1 deficiency delayed liver repair, associated with reduction in apoptotic neutrophils and restorative macrophages. Transfer of BLT1 deficient neutrophils impaired liver repair. Efferocytosis of apoptotic neutrophils was suppressed BLT1^{-/-} mice. The stimulation of resolvin E1 promoted differentiation of macrophages to a restorative type in a BLT1 signaling dependent manner. These results indicate that BLT1 facilitates liver repair via resolvin E1-mediated efferocytosis of apoptotic neutrophils by reparative macrophages.

研究分野：消化器

キーワード：BLT1 肝修復 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

急性肝障害後の炎症収束や肝修復の制御機構については不明な点が多い。炎症組織に浸潤した好中球はアポトーシスを惹起しマクロファージにより貪食除去され、炎症は収束し組織は修復する。近年、好中球アポトーシスに伴うシグナルが修復の起点になっていることが明らかになりつつある。しかしながら、障害肝の肝修復については、これまでマクロファージの機能解明が主であり、集積好中球の役割やマクロファージとの相互作用による肝修復促進作用とそのメカニズムについては未解明である。生理活性脂質であるロイコトリエン(LT)B4 は高親和性受容体 BLT1 を介して炎症を誘導するが、申請者らは急性肝障害においては BLT1 シグナルには抗炎症作用や修復作用があることを見いだした。また最近発見された生理活性脂質、レゾルビン E1(Resolvin E1; RvE1)は BLT1 のリガンドであり、炎症収束作用があることが報告された。

2. 研究の目的

本研究では、

- 1)肝修復過程には組織損傷部位における LTB4 の炎症誘導作用とこれに引き続く RvE1 の炎症収束および肝修復促進作用が関与していること、
- 2)BLT1 シグナルによる肝修復制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

肝組織修復における自然免疫細胞の関与と BLT1 シグナルの機能的役割を解明するために実験動物を用いて研究期間内に次の研究項目を検討した。

- 1) 肝修復における BLT1 シグナルの役割検証
- 2) 好中球の肝修復トリガーとしての役割解明
- 3) マクロファージの肝修復制御機構の解明

具体的な研究方法は以下の通りである。

実験材料と実験方法

1) 実験動物

8週令の雄性 BLT1 ノックアウトマウス(BLT1^{-/-})と雄性 C57BL/6 マウス(野生型)を用いた。野生型マウスは日本クレアから購入し、BLT1 ノックアウトマウス(BLT1^{-/-})は野生型マウスと交配したものを使用した。

2)実験プロトコール

アセトアミノフェン(APAP)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 mg/kg を腹腔内に単回投与して肝障害を誘導した。APAP 投与後の指定した時間にペントバルビタール麻酔下に検体(血液、肝臓)を採取し、その後安楽死させた。血液は血清分離し ALT 値を Dri-Chem 7000 Chemistry Analyzer System を用いて測定した。

好中球除去目的で抗 Gr1 抗体(BioLegend)または isotype-matched IgG を APAP 投与 2.5 時間後に腹腔内に投与した。

3)組織染色

摘出肝をパラフィン包埋または凍結切片として保存した。既報に従いヘマトキシリン染色または免疫染色をおこなった。

4)フローサイトメトリー

摘出肝を抗 Ly6G 抗体、抗 CD11b 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Ly6C 抗体、抗 F4/80 抗体で染色した。マクロファージ表現形式解析に際しては、抗 CD45 抗体陽性区分から Ly6G 陽性かつ CD11b 陽性成分を除外して、Ly6C、F4/80 による細分化による解析をした。さらに好中球アポトーシス解析のために 7-AAD と Annexin-V を使用した。

5)Real-time PCR 法

既報に従い、PCR 解析をおこなった。BLT1, CXCL1, CXCL2, CCR2, TNF, IL-1, IL-6, iNOS, MR, Fizz1 のプライマーを用いて mRNA レベルを測定した。

6)好中球移入実験

BLT1 ノックアウトマウス(BLT1^{-/-})ならびに C57BL/6 マウス(野生型)から好中球を MACS キットを用いて採取し、マウスの尾静脈より移入した。

7) 貪食能解析

採取した好中球を 12 時間培養しアポトーシスを誘導したうえでマクロファージによる貪食能を貪食能アッセイキットにより検討した。

4. 研究成果

肝修復における BLT1 シグナルの役割

野生型マウス(WT)ではアセトアミノフェン投与後 12 時間で肝障害(ALT)はピークとなり、以後漸減し、96 時間で正常レベルに回復した。一方、BLT1 ノックアウトマウス(BLT1^{-/-})では 24 時間以後、ALT は WT より高値を示した。また WT と比較して肝壊死面積が高値であり、肝修復が BLT1^{-/-}で遅延した(図 1)。肝細胞増殖を PCNA 陽性細胞数で比較検討すると、BLT1 ノックアウトマウス(BLT1^{-/-})の PCNA 陽性細胞数は野生型マウス(WT)よりも低値であった。

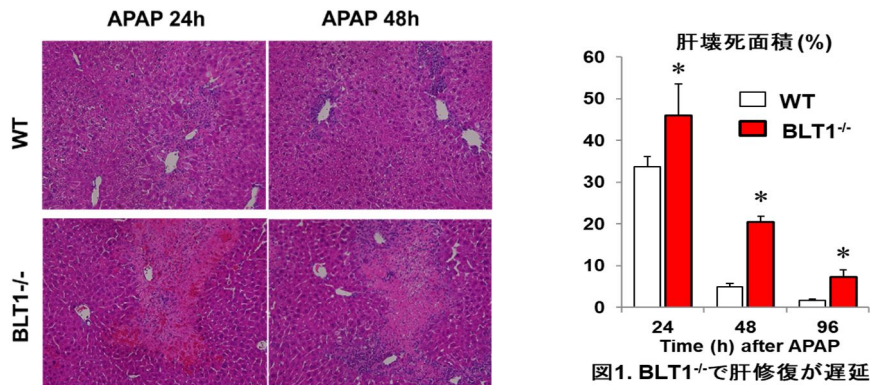


図1. BLT1^{-/-}で肝修復が遅延

好中球の肝修復トリガーとしての役割

フローサイトメトリー解析にて BLT1^{-/-}は WT に比較して肝障害部への集積好中球が減少した。(図 2)。BLT1 欠損好中球移入実験や抗 Gr1 抗体投与による好中球除去処置をおこなうと、BLT1 欠損好中球移植(図 3A)や好中球減少は肝修復を遅延させた(図 3B)。

好中球におこる変化が修復起点になるものと考えた時に好中球がアポトーシスをおこしている可能性を考え、好中球アポトーシスについて FACS で検討すると BLT1^{-/-}好中球ではアポトーシスが抑制されていた(図 4)。

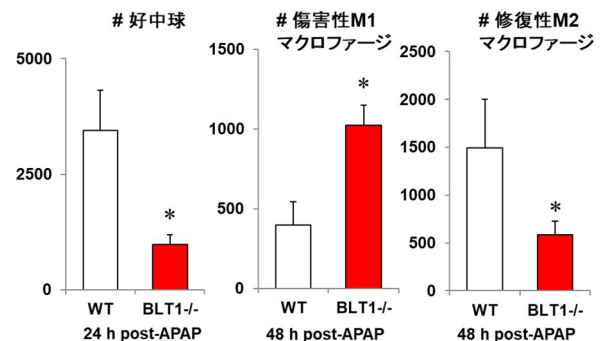


図2. WTではBLT1^{-/-}より集積好中球が増加し、M1マクロファージは減少し、M2マクロファージは増加した。

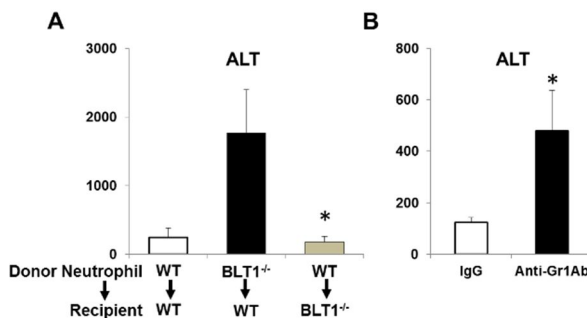


図3. (A) BLT1^{-/-}好中球をWTに移入するとALTが増加し、WT好中球をBLT1^{-/-}に移入するとALTは減少した。(B)また抗Gr1抗体を投与するとALTは増加した。

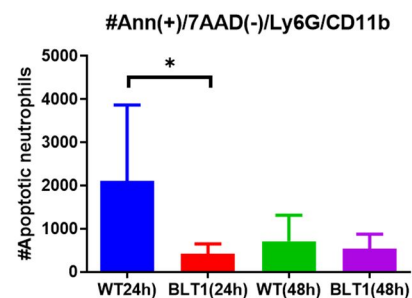


図4. アポトーシス好中球はBLT^{-/-}で減少した

マクロファージの肝修復制御機構

肝修復に関与するマクロファージの表現型(M1,M2)をフローサイトメトリーで解析すると WT で修復性マクロファージ(M2)優位、BLT1^{-/-}では傷害性マクロファージ(M1)優位であった(図 2)。そこで RvE1 が M1 から M2 への極性変換に関与するかどうかを培養骨髄マクロファージを用いて解析した。RvE1 刺激によって、マクロファージは M1 マーカー並びに M2 マーカー関連遺伝子発現が増強した。よって、RvE1 はマクロファージを少なくとも M2 に分化する機能があることが示唆された。さらにマクロファージのアポトーシス好中球貪食能を調べると、BLT1 シグナルに依存してマクロファージ貪食能が亢進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka T, Kojima K, Yokota K, Tanaka Y, Ooizumi Y, Ishii S, Kojo K, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Comprehensive Genetic Search to Clarify the Molecular Mechanism of Drug Resistance Identifies ASCL2-LEF1/TSPAN8 Axis in Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 1401-1411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-019-07172-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokoi K, Harada H, Yokota K, Ishii S, Tanaka T, Nishizawa N, Kojo K, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Epigenetic Status of CD01 Gene May Reflect Chemosensitivity in Colon Cancer with Postoperative Adjuvant Chemotherapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 406-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-018-6865-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishizawa N, Ito Y, Eshima K, Ohkubo H, Kojo K, Inoue T, Raouf J, Jakobsson	4. 巻 69
2. 論文標題 Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates liver repair after hepatic injury in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hepatol	6. 最初と最後の頁 110-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhep.2018.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Otaka F, Ito Y, Inoue T, Ohkubo H, Nishizawa N, Kojo K, Betto T, Yamane S,	4. 巻 381
2. 論文標題 Thromboxane A(2) receptor signaling in endothelial cells attenuates monocrotaline-induced liver injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicol Appl Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 114733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2019.114733.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 武郎、中村 隆俊、山梨 高広、三浦 啓壽、古城 憲、島津 将、萩原 千恵、丸山 正裕、坂本 純一、渡邊 昌彦
2. 発表標題 術前化学放射線療法施行後に行った腹腔鏡手術の治療成績
3. 学会等名 第90回大腸癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中本 修司、伊藤 義也、後藤 卓也、西澤 伸恭、古城 憲、隈元 雄介、馬嶋 正隆
2. 発表標題 樹状細胞のEP3シグナル伝達はマウスの虚血再灌流障害後の肝修復を促進する。
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----