

令和 3 年 4 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16330

研究課題名(和文)肝類洞閉塞症候群における脂質メディエーターの役割解明

研究課題名(英文)Role of lipid mediators in hepatic sinusoidal obstruction syndrome

研究代表者

大久保 博世(Ohkubo, Hirotoiki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50406930

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):マウス肝類洞閉塞症候群(Sinusoidal Obstruction Syndrome: SOS)モデルを用いて、トロンボキサンA2の受容体(TP)シグナルの役割について検討をおこなった。野生型マウスまたはTPノックアウトマウス(TPKOマウス)にモノクロタリンを投与するとTPKOマウスで肝障害が増悪し、肝類洞内皮障害マーカーが増加した。培養肝類洞内皮細胞をモノクロタリンで刺激すると細胞生存率はTPKOマウスで減少し、類洞障害関連マーカーは増加した。この結果からSOSではトロンボキサンA2受容体シグナルが肝類洞内皮を保護することで肝障害が軽減するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SOSの病態解明の基盤研究は大腸がん治療を安全に行うために必要である。これまでマウスではSOSモデルが確立されていなかったことから、申請者らのモデルは研究発展のために極めて有用なツールとなる。SOS発症には肝類洞内皮細胞のTP受容体シグナル発現が重要であることが示唆された。肝修復・肝再生の有効な治療方法の開発につながる可能性のほか、化学療法施行期間、肝切除までの休薬期間、肝予備能に応じた肝切除術式の選択などの判断基準を再考する契機となりうる。

研究成果の概要(英文):Sinusoidal obstruction syndrome (SOS) is a major complication of chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. In this study, we explored the role of TP signaling in a monocrotaline (MCT)-induced mouse model of SOS. Relative to wild-type (WT) mice, TP-deficient (TP-/-) mice exhibited more severe MCT-liver injury, as indicated by elevated levels of alanine aminotransferase (ALT) and coagulative necrosis. TP expression co-localized with CD31-positive LSECs. MCT treatment caused LSEC destruction, concomitant with elevated expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and adhesion molecules in WT mice, and LSEC damage was further exacerbated in TP-/- mice. Viability of isolated LSECs was lower in cells from TP-/- mice, whereas mRNA levels of MMPs and adhesion molecules were higher; U46619, a TxA2 agonist, reduced these levels in WT mice. These data suggest that TP signaling prevents injury by suppressing LSEC damage.

研究分野：血管外科

キーワード：肝類洞閉塞症候群 トロンボキサン

1. 研究開始当初の背景

肝類洞閉塞症候群 (Sinusoidal Obstruction Syndrome, SOS) は、造血幹細胞移植のための化学療法や放射線療法後、大腸癌の化学療法後、またクロタリア属の植物に由来する有毒なピロリジジンアルカロイドの過剰摂取などにより生じる進行性の致命的な合併症である。重症化すると劇症肝不全や多臓器不全となり、80%以上の死亡率がみられる。SOSの原因は不明であり、有効な治療法もない。これまでの検討で肝類洞内皮細胞 (Liver Sinusoidal Endothelial Cell, LSEC) は、SOSの主要な初期標的であると考えられており、LSECの破壊により肝類洞の灌流障害が起き、続いて肝類洞外出血、肝類洞内皮細胞障害、中心静脈周囲の肝細胞壊死、および肝線維症が引き起こされる。またSOSでは血小板数減少ならびに、肝障害部における著明な血小板集積が報告されているが、その病的意義は不明である。

トロンボキサン A2 (Thromboxane A2, TxA2) はその受容体である T-プロスタノイド (T-prostanoid, TP) 受容体を介して強力な血小板の活性化と凝集作用を示す。従って、SOSにみられる血小板集積や出血に TP 受容体シグナルが関与する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、SOSにおける TP 受容体シグナルの役割とその制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ピロリジジンアルカロイドであるモノクロタリン (Monocrotaline, MCT) をげっ歯類に投与することで、ヒト SOS に類似した肝障害を作成することができる。そこで、本研究ではマウス MCT 誘導肝障害モデルを SOS モデルとした。

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 TP ノックアウトマウス (TPKO マウス) と雄性 C57BL/6 マウス (野生型マウス) を用いた。野生型マウスは日本クレアから購入した。

2) 実験プロトコール

モノクロタリン (MCT) 600 mg/kg を腹腔内に単回投与して肝障害を誘導した。MCT 投与後に規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。

3) 免疫組織染色

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。画像は Biozero BZ-9000 Series microscope (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察し、撮像した。

4) トロンボキサン A2 測定

トロンボキサン A2 の安定化代謝産物トロンボキサン B2 と VEGF-A とは ELISA キットを用いて測定した。

5) 肝類洞内皮細胞培養

肝類洞内皮細胞 (LSEC) を灌流肝から、magnetic cell separation system beads (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) ならびに CD146 (LSEC) を用いて分離培養した。培養 LSEC に MCT を TPO または ROM 存在下に投与して内皮細胞の生存率を Cell Counting Kit-8 で測定した。また分離 PRP 存在下に MCT を投与したときの生存率を評価した。

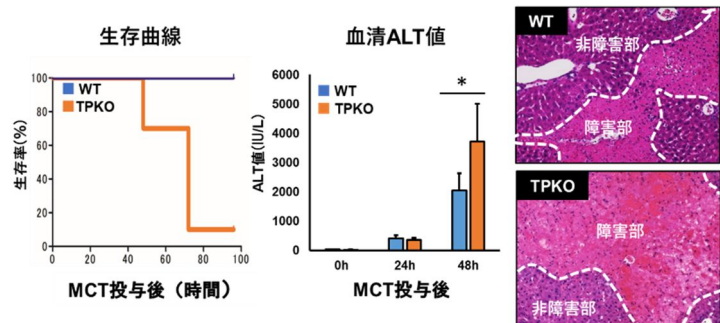
6) Real-time PCR 法

PCR 解析をおこなった。TP, TXS (トロンボキサン合成酵素), MMP-2, MMP-9, MMP-13, PAI-1 のプライマーを用いて mRNA レベルを測定した。

4. 研究成果

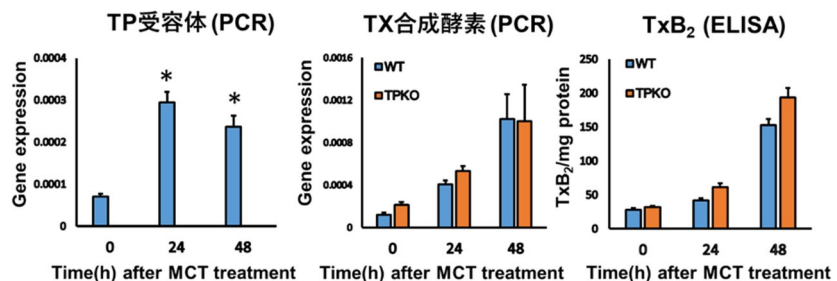
MCT 誘導肝障害は TPKO マウスにおいて増悪した

TP シグナルの MCT 誘導肝障害における役割を調べるために TPKO マウスと WT (野生型マウス) について比較した。生存率は MCT 投与 96 時間後時点まで WT で 100% であったのに対し、TPKO マウスでは投与 48 時間後時点で 70%、投与 72 時間後には 10% まで低下した。よって、それ以降の検討は MCT 投与 48 時間後までとした。血清 ALT 値を測定すると両群共に経時的に増加し、MCT 投与 24 時間後まで両群に有意差はみられなかったが、MCT 投与 48 時間後に TPKO マウスにおいて有意な上昇が認められた。また、MCT 投与 48 時間後の肝障害部の壊死面積も TPKO マウスで増大傾向がみられた。



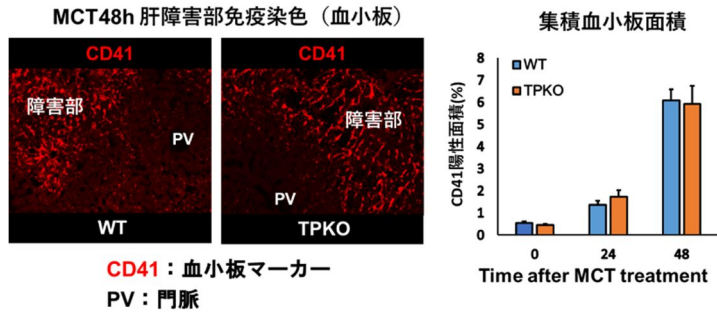
MCT 誘導肝障害により TP 受容体発現は亢進した

MCT 投与後、WT では肝臓内の TP 受容体、TxA2 合成酵素の mRNA 発現量は有意に上昇した。また ELISA で TxB2 (TxA2 の代謝産物) 産生量を調べると、MCT 投与 48 時間後まで経時的に増加がみられた。また、MCT 障害肝における TP 受容体発現の局在について蛍光免疫 2 重染色で検討した。その結果、LSEC および血小板、マクロファージに TP 受容体の発現がみられることが分かった。TPKO マウスでは WT でみられた TP 発現が認められなかった以外は、同様の結果であり、また WT と差はなかった。MCT 誘導肝障害部に集積するマクロファージ数は TPKO マウス、WT 両群で差がみられなかったことから、血小板もしくは LSEC に発現する TP 受容体のどちらかが MCT 誘導肝障害の抑制に関与していると考えられた。



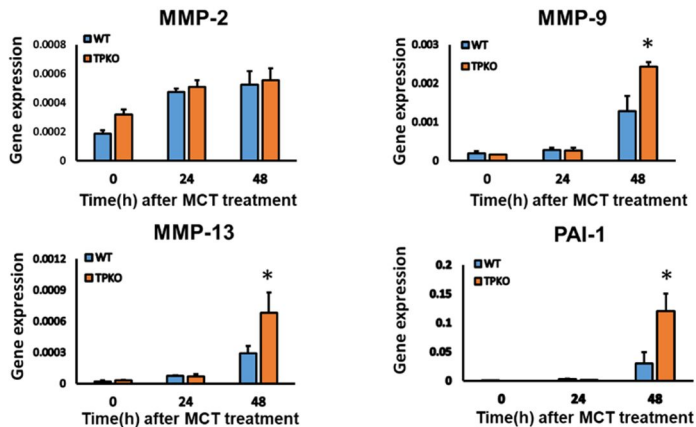
TP シグナルは MCT 誘導肝障害部の血小板集積に影響しない

血中血小板数は両群共に MCT 投与 48 時間後に著明に減少したが、TPKO マウス, WT の両群間で有意差はみられなかった。また、MCT 投与 48 時間後までの肝障害部に集積する血小板を抗 CD41 抗体で染色し、その占有面積を免疫染色で評価したところ、両群共に経時的に血小板面積は増加した。また MCT 投与 48 時間後に著明な増加がみられたが、両群間で有意差は認められなかった。従って、血小板に発現する TP 受容体は MCT 誘導肝障害における血小板集積には影響せず、MCT 誘導肝障害に影響しないことが示唆された。



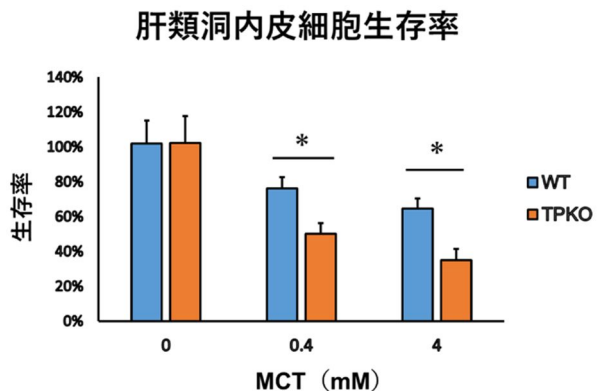
MCT 誘導肝障害において、TPKO マウスで類洞内皮細胞障害がより増悪した

MCT 誘導肝障害時の LSEC 障害について WT, TP-/- 両群で差がみられるのかについて LSEC のマーカーである CD31 と LYVE-1 を用いて蛍光免疫染色で検討した。その結果、MCT 投与 0 時間後の時点では両群で類洞の染色性に差は見られなかったが、MCT 投与 48 時間後、TPKO マウスにおいて肝障害部の LSEC の染色性がより消失し、LSEC 構造が不明瞭となり LSEC 障害が増悪した。また、MCT 投与 48 時間後において、類洞障害関連マーカーである MMP-9、PAI-1、ICAM-1 などの mRNA 発現量は TPKO マウスで有意に上昇した。これらの結果から、MCT 誘導肝障害において、TP シグナルは類洞内皮障害を抑制することが示唆された。



類洞内皮細胞に発現する TP 受容体シグナルが類洞内皮細胞障害を抑制した

LSEC の TP 受容体シグナルの役割を調べるために WT と TPKO マウスの肝臓から LSEC を単離培養し、MCT を添加したときの LSEC 生存率や類洞障害マーカー発現を比較検討した。その結果、TPKO マウス由来の LSEC の生存率は、WT の生存率より有意に低下した。また TP 受容体の mRNA 発現量は WT で増強し、MMP2、MMP9、PAI-1、ICAM1 などの類洞障害関連マーカーの mRNA 発現は TPKO マウスで増加した。また、WT 由来 LSEC に TP 受容体アゴニストである U-46619 で刺激すると、非投与群に比べ有意に上記の類洞障害関連マーカー発現は抑制された。つまり、LSEC に発現する TP 受容体が類洞障害マーカーの発現を抑制し MCT 誘導肝障害を抑制していると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujioka Shunichiro, Ohkubo Hirotochi, Kitamura Tadashi, Mishima Toshiaki, Onishi Yoshihiko, Tadokoro Yuki, Araki Haruna, Matsushiro Takuya, Yakuwa Kazuki, Miyamoto Takashi, Torii Shinzo, Miyaji Kagami	4. 巻 84
2. 論文標題 Risk Factors for Progression of Distal Deep Vein Thrombosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1862 ~ 1865
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-20-0270	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 -
1. 著者名 Sakaki Kenjiro, Kitamura Tadashi, Kohira Satoshi, Torii Shinzo, Mishima Toshiaki, Hanayama Naoji, Kobayashi Kensuke, Ohkubo Hirotochi, Miyaji Kagami	4. 巻 23
2. 論文標題 Regional thigh tissue oxygen saturation during cardiopulmonary bypass predicts acute kidney injury after cardiac surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 315 ~ 320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-020-01175-y	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 -
1. 著者名 Kobayashi Kensuke, Kitamura Tadashi, Kohira Satoshi, Torii Shinzo, Mishima Toshiaki, Ohkubo Hirotochi, Tanaka Yuki, Sasahara Akihiro, Fukunishi Takuma, Ohtomo Yuki, Horikoshi Rihito, Murai Yuta, Miyaji Kagami	4. 巻 21
2. 論文標題 Cerebral oximetry for cardiac surgery: a preoperative comparison of device characteristics and pitfalls in interpretation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Artificial Organs	6. 最初と最後の頁 412 ~ 418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10047-018-1052-3	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 -
1. 著者名 Otaka F, Ito Y, Inoue T, Ohkubo H, Nishizawa N, Kojo K, Betto T, Yamane S, Narumiya S, Koizumi W, Majima M	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 -

1. 著者名 Nishizawa N, Ito Y, Eshima K, Ohkubo H, Kojo K, Inoue T, Raouf J, Jakobsson P, Uematsu S, Akira S, Narumiya S, Watanabe M2, Majima M.	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 2018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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大高史聖、伊藤義也、井上 智仁、大久保博世、津留 世里、細野 加奈子、小泉 和二郎、馬嶋 正隆
2. 発表標題 肝類洞閉塞症候群におけるトロンボキサンA2受容体の役割について
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤義也、井上智仁、大高史聖、美島利昭、大久保博世、馬嶋正隆
2. 発表標題 RAMP1 signaling in hepatic macrophages plays a critical role in immune-mediated hepatitis
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤義也、大高史聖、大久保博世、馬嶋正隆
2. 発表標題 トロンボキサンA2受容体シグナルの肝類洞閉塞症候群における役割
3. 学会等名 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiya Ito, Nobuyuki Nishizawa, Koji Eshima, Hirotohi Ohkubo, Tomoyoshi Inoue, Hideki Amano, Masataka Majima.
2. 発表標題 Role of endogenous PGE2 in liver repair after hepatic ischemia/reperfusion
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S Nakamoto, Y Ito, N Nishizawa, H Ohkubo, M Watanabe, M Majima.
2. 発表標題 Prostaglandin E receptor subtype EP3 promotes liver repair after acute liver injury
3. 学会等名 第44回日本微小循環学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------