

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790657

研究課題名（和文） 慢性肝障害におけるクッパー細胞の役割に関する研究

研究課題名（英文） Role of Kupffer cells on chronic liver injury

## 研究代表者

大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60447787

研究成果の概要（和文）：慢性肝障害の病態は、持続的な肝細胞死と炎症、その後には生じる肝再生ならびに肝線維化によって特徴づけられる。Kupffer 細胞は種々の肝障害に対し促進および抑制的に作用するという両者の報告が存在する。部分的胆管結紮術により肝左葉に肝障害、肝再生、および肝線維化の増強と肝細胞の抗アポトーシス状態が誘導さるが、Kupffer 細胞の消去により、胆管結紮による肝障害は増強した。一方、肝再生および肝線維化は減弱した。また、肝細胞の抗アポトーシス状態は低下した。Kupffer 細胞を酸性スフィンゴミエリナーゼ欠損細胞に置き換えたマウスでは、胆管結紮術後の肝再生誘導と肝細胞の抗アポトーシス状態獲得が減弱したが、肝障害と肝線維化に差は認められなかった。非活性型 AKT の強制発現は、胆管結紮術後の肝再生と肝細胞の抗アポトーシス状態を減弱した。以上より、Kupffer 細胞は、胆管結紮による肝障害を抑制し、残存する肝細胞に対して抗アポトーシス状態を獲得させ、その後の肝再生および肝線維化を促進する働きがある。

研究成果の概要（英文）：Background and Aims: Kupffer cells, resident tissue macrophages of the liver, play a key role in the regulation of hepatic inflammation, hepatocyte death, and fibrosis that characterize liver diseases. However, it is controversial whether Kupffer cell promotes or protects from liver injury. To explore this issue, we examined the role of Kupffer cell in liver injury, cell death, regeneration, and fibrosis on cholestatic liver injury. Methods: A model of partial bile duct ligation (PBDL) was developed. The left hepatic duct of wild-type C57BL/6 male mice was ligated with 6-0 silk, and the animals were sacrificed 10 days after the surgery. Liver injury, regeneration, and fibrosis were compared between the ligated left and non-ligated right lobes. Hepatocyte apoptosis was induced by administration of D-galactosamine and TNF- $\alpha$  to the PBDL mice. The effects of Kupffer cell depletion by alendronate liposomes, or inhibition of AKT by adenovirus expressing dominant-negative AKT were investigated. Results: In the cholestatic liver injury, remaining viable cells represented tolerance for tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced hepatocyte apoptosis and regenerative features along with AKT activation. Inhibition of AKT abolished the survival and regenerative properties in hepatocytes. Moreover, Kupffer cell depletion increased hepatocyte damage and the sensitivity of TNF- $\alpha$ -induced hepatocyte apoptosis in ligated lobes. Kupffer cell depletion decreased hepatocyte regeneration and liver fibrosis with reduced AKT activation. Conclusion: Kupffer cell has a protective role for hepatocyte damage, and promotes cell survival, liver regeneration, and fibrosis in cholestatic liver disease. Kupffer cell is crucial for AKT activation of hepatocytes that is required for the survival and regenerative responses.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：慢性肝障害、アポトーシス、クッパー細胞、肝細胞、スフィンゴ脂質、糖代謝、脂質代謝、肝再生、肝線維化

### 1. 研究開始当初の背景

慢性肝炎・肝硬変は多くの患者が罹患しており、特に薬害肝炎や肝臓を含む内臓脂肪蓄積が社会的にクローズアップされたことも手伝って今後も患者数の増加が見込まれている。また慢性肝炎に対する完全な治療は存在せず、多くの患者が肝硬変へと進展する。未だ予後不良の疾患である肝硬変の中心的な病態は肝細胞死と肝再生不全による肝機能不全である。慢性肝炎では、肝炎ウイルスやアルコール、脂肪蓄積により持続的に肝細胞が破壊され、残存する肝細胞の分裂増殖による肝再生が盛んとなるが、それが間に合わなくなると線維化が進行し肝硬変となる。また、持続する炎症と繰り返される細胞分裂により、肝細胞癌が年率7%と極めて高い確率で発症する。このため、肝細胞死や肝再生・線維化のメカニズムを明らかにし、それらを制御することが、病態の理解と新たな治療法の開発に重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

申請者らは、肝再生、肝線維化の進展には肝臓内マクロファージであるクッパー細胞が重要な役割を果たしていること、さらに慢性肝障害・肝線維化状態の肝臓では肝細胞がクッパー細胞によって AKT 活性化を介

した抗アポトーシスの状態になっていることを報告してきた。これは、クッパー細胞がダメージを受け不必要となった細胞のみを排除し、健康な細胞を障害から守る役割を果たしていると考えられる。本研究の目的は、慢性肝障害時にクッパー細胞がどのようなメカニズムで上記のような効果を示すのかを動物実験モデルを用いて *in vivo* で明らかにし、新たな治療法を開発することである。さらに、研究の経過中、肝細胞に対する抗アポトーシス獲得効果と肝細胞増殖効果については、クッパー細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) が必要であることを明らかにした。スフィンゴ脂質代謝の鍵酵素である ASM は、細胞死やサイトカイン分泌、さらに糖代謝などに関与するとの報告がある。そこで、ASM のクッパー細胞ならびに肝細胞における役割について明らかにすることにより、ASM をターゲットとした新規治療の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

マウスに部分的胆管結紮術を施すことによって慢性肝障害を肝左葉にのみ誘導した。アレンドロネートの投与によりクッパー細胞を消去したマウスを作製し、胆管結

紮による肝障害、肝再生、および肝線維化についてクッパー細胞消去による影響を検討した。また、クッパー細胞消去によるアポトーシス抵抗性への影響を検討した。さらに、クッパー細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) の役割を検討するため、ASM 欠損マウス由来の骨髄を野生型マウスに移植することにより、ASM 欠損クッパー細胞に置き換えたマウスを作製し、同様の検討をおこなった。次に、ASM の肝細胞における役割を検討するため、ASM を過剰発現するアデノウイルスベクターを作製しマウスの肝臓と初代培養肝細胞に感染させた。ASM の強制発現は、糖・脂質代謝の重要なシグナル因子である AKT の活性化を誘導した。そこで、ASM の糖・脂質代謝に及ぼす影響と、肝臓の脂肪化における役割を検討した。

#### 4. 研究成果

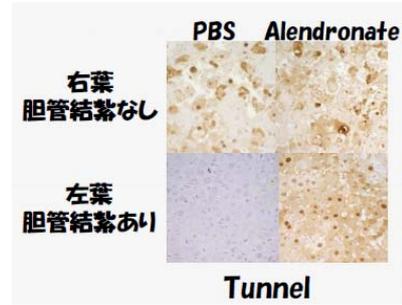
(1) 肝障害におけるクッパー細胞の役割：アレンドロネートの投与によりクッパー細胞を消去した

マウスでは、胆管結紮後の肝障害が増悪した。このことから、クッパー細胞は肝障害に対して抑制的に

作用していると考えられた。クッパー細胞の ASM 欠損細胞への置換は、肝障害に影響を及ぼさなかった。

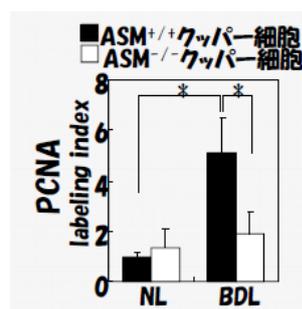
(2) 肝細胞の抗アポトーシス獲得におけるクッパー細胞の役割：部分胆管結紮後のマウスに少量のガラクトサミンを併用して TNF を投

与すると、健常肝では広範な壊死が誘導されるが、胆管が結紮された肝左葉には誘導されない (抗アポト



シス獲得)。一方、クッパー細胞を消去したマウスやクッパー細胞を ASM 欠損細胞への置換したマウスでは肝左葉にも誘導される。このことから、クッパー細胞は ASM を介して肝細胞に抗アポトーシスを獲得させていることが示唆された。

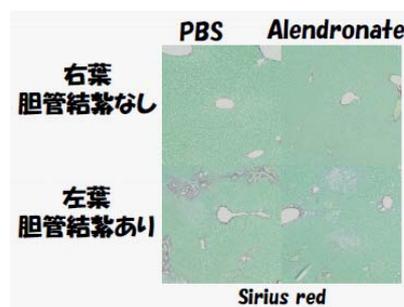
(3) 肝再生に対するクッパー細胞の役割：部分胆管結紮後の肝臓の肝再生はクッパー細胞



を消去したマウスやクッパー細胞を ASM 欠損細胞への置換したマウスでは抑制された。このことから、クッ

パー細胞は ASM を介して肝再生を誘導することが示唆された。

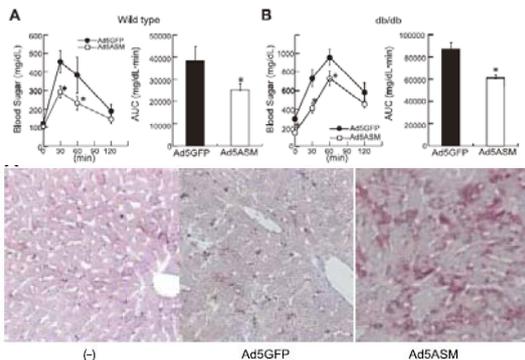
(4) 肝線維化に対するクッパー細胞の役割：クッパー細胞を消去したマウスでは、胆管結紮後の肝線維化が減弱した。このことから、クッパー細胞は肝線維化に対して促進的に



作用していると考えられた。クッパー細胞の ASM 欠損細胞への

置換は、肝線維化に影響を及ぼさなかった。

(5)肝細胞の糖・脂質代謝における ASM の役割：上述のように、ASM はクッパー細胞において種々の機能を持っている。そこで次に肝細胞における役割を検討した。アデノウイルスベクターを用いてマウスの肝臓に ASM を強制発現したところ、AKT の活性化をとともなっ



て耐糖能の改善、グリコーゲンの蓄積、中性脂肪の増加を認めた。さらに、初代培養肝細胞においても、グルコースの取り込み、グリコーゲンの蓄積、中性脂肪の増加を認めた。一方、ASM 欠損細胞では、高濃度ブドウ糖によるグリコーゲ

ンの蓄積が抑制された。このことから、肝細胞の糖・脂質代謝において ASM はインスリンと同様の作用を有し、

肝臓の脂肪化を誘導することが示唆された。

#### 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 11 件)

1. Osawa, Y., Seki, E., Kodama, Y., Suetsugu, A., Miura, K., Adachi, M., Ito, H., Shiratori, Y., Banno, Y., Olefsky, J. M., Nagaki, M., Moriwaki, H., Brenner, D. A., and Seishima, M.: Acid sphingomyelinase regulates

glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *FASEB J.* in press. 査読あり

2. Suetsugu, A., Osawa, Y., Nagaki, M., Saji, S., Moriwaki, H., Bouvet, M., Hoffman, R. M.: Imaging the recruitment of cancer-associated fibroblasts by liver-metastatic colon cancer. *J Cell Biochem.* 112, 949-53, 2011. 査読あり
3. Ito, H., Hoshi, M., Ohtaki, H., Taguchi, A., Ando, K., Ishikawa, T., Osawa, Y., Hara, A., Moriwaki, H., Saito, K., and Seishima, M.: Ability of IDO to attenuate liver injury in alpha-galactosylceramide-induced hepatitis model. *J Immunol.* 185, 4554-50, 2010. 査読あり
4. Hoshi, M., Saito, K., Hara, A., Taguchi, A., Ohtaki, H., Tanaka, R., Fujigaki, H., Osawa, Y., Takemura, M., Matsunami, H., Ito, H., and Seishima, M.: The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse. *J Immunol.* 185, 3305-12, 2010. 査読あり
5. Suetsugu, A., Osawa, Y., Nagaki, M., Moriwaki, H., Saji, S., Bouvet, M., and Hoffman, R. M.: Simultaneous color-coded imaging to distinguish cancer "stem-like" and non-stem cells in the same tumor. *J Cell Biochem.* 111, 1035-41, 2010. 査読あり
6. Osawa, Y., Seki, E., Adachi, M., Suetsugu, A., Ito, H., Moriwaki, H., Seishima, M., and Nagaki, M.: Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatology.* 51, 237-45, 2010. 査読あり
7. Yasuda, Y., Shimizu, M., Sakai, H.,

- Iwasa, J., Kubota, M., Adachi, S., Osawa, Y., Tsurumi, H., Hara, Y., and Moriwaki, H.: (-)-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFRbeta and IGF-1R. *Chem Biol Interact.* 182, 159-64, 2009. 査読あり
8. Ohtaki, H., Ito, H., Ando, K., Ishikawa, T., Hoshi, M., Tanaka, R., Osawa, Y., Yokochi, T., Moriwaki, H., Saito, K., and Seishima, M.: Interaction between LPS-induced NO production and IDO activity in mouse peritoneal cells in the presence of activated Valpha14 NKT cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 389, 229-34, 2009. 査読あり
  9. Tsukada, Y., Nagaki, M., Suetsugu, A., Osawa, Y., and Moriwaki, H.: Extracellular matrix is required for the survival and differentiation of transplanted hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 733-737, 2009. 査読あり
  10. Nemoto, S., Nakamura, M., Osawa, Y., Kono, S., Itoh, Y., Okano, Y., Murate, T., Hara, A., Ueda, H., Nozawa, Y. and Banno, Y.: Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and AKT activation. *J Biol Chem*, in print. 2009. 査読あり
  11. Kodama, Y., Taura, K., Miura, K., Schnabl, B., Osawa, Y. and Brenner, D. A.: Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*, 136, 1423-34. 2009. 査読あり
- [学会発表] (計 13 件)
1. Osawa Y., Nagaki M, Yasuda Y, Moriwaki H, Seishima M: Roles of acid sphingomyelinase on glucose and lipid metabolism in hepatocytes. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2011. Bangkok. Thailand, 2011.
  2. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H, Kubota M, Osawa Y., Moriwaki H: A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses azoxymethane-induced and obesity-related colonic premalignant lesions in male db/db mice. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2011. Bangkok. Thailand, 2011.
  3. Suetsugu A, Osawa Y., Nagaki M, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM: Color-coded imaging of tumor growth, metastasis and drug resistance of co-implanted cancer stem cells and non-cancer stem cells. American association of cancer research 101<sup>st</sup> annual meeting 2010. Washington DC USA, 2010.
  4. Suetsugu A, Osawa Y., Nagaki M, Saji S, Moriwaki H, Momiyana M, Bouvet M, Hoffman RM: Use of RFP and GFP transgenic nude mice to study the tumor microenvironment of metastasis. American association of cancer research 101<sup>st</sup> annual meeting 2010. Washington DC USA, 2010.

5. Osawa Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Seishima M: Inhibition of acid sphingomyelinase causes hepatic glucose intolerance and insulin resistance. Digestive Disease Week (DDW) 2010. New Orleans USA, 2010.
  6. Suetsugu A, Nagaki M, Osawa Y, Hoffman RM, Moriwaki H: An analysis of CD133 positive bone marrow in oval cell induced model and a role of CD133 bone marrow in mice with liver fibrosis. Digestive Disease Week (DDW) 2010. New Orleans USA, 2010.
  7. Osawa Y, Nagaki M, Yasuda Y, Tsukada Y, Moriwaki H, Seishima M: Role of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2010. Beijing, China, 2010.
  8. Tsukada Y, Nagaki M, Suetsugu A, Osawa Y, Moriwaki H: Extracellular matrix is required for the survival and differentiation of transplanted hepatic progenitor cells. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2010. Beijing, China, 2010.
  9. Yasuda Y, Shimizu M, Sakai H, Kubota M, Osawa Y, Hara Y, Moriwaki H: ( - )-Epigallocatechin gallate prevents carbon tetrachloride-induced rat hepatic fibrosis by inhibiting the expression of the PDGFR and IGF-1R. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2010. Beijing, China, 2010.
  10. 大澤陽介 永木正仁 森脇久隆: パネルディスカッション「肝臓の再生機構を考える: 今後の肝再生医療への展望」肝細胞死と肝再生・肝線維化連携機構における Kupffer 細胞の役割. 第 14 回日本肝臓学会大会. 横浜 2010.
  11. Osawa Y, Nagaki M, Ito H, Seishima M, Moriwaki H: Anti-apoptotic effects against TNF-alpha treatment in bile duct ligated mouse liver. Digestive Disease Week (DDW) 2009. Chicago USA, 2009.
  12. 大澤陽介 永木正仁 森脇久隆: ワークショップ「免疫担当細胞異常からみた肝疾患の動態」胆管結紮誘導性慢性肝障害マウスモデルにおける Kupffer 細胞の役割. 第 13 回日本肝臓学会大会. 京都 2009
  13. 石亦宏 大澤陽介 藤本治朗 パネルディスカッション「自然免疫と消化器疾患」TLR4-MyD88-NF $\kappa$ B シグナルによる肝星細胞活性化と肝線維症における役割. 第 13 回日本肝臓学会大会. 京都 2009.
- 〔図書〕 (計 1 件)
1. Osawa, Y., Seki, E., and Brenner DA. ; 2nd edition of Essentials of Apoptosis. Part III Apoptosis in mammalian physiology and pathogenesis. Chapter 24 Apoptosis in liver injury and liver diseases. 547-64, Springer, 2009. (17 ページ)
6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)  
 岐阜大学・医学系研究科・助教  
 研究者番号: 60447787
- (2) 研究分担者 ( )  
 研究者番号:
- (3) 連携研究者 ( )  
 研究者番号: