

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390322

研究課題名(和文)免疫応答修飾による肝移植後線維化の制御戦略

研究課題名(英文)Control of liver fibrosis after transplantation by immunomodulation

研究代表者

田浦 康二郎 (Kojiro, Taura)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80378629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：BALB/cマウスに四塩化炭素及びチオアセトアミドで肝線維化を誘導し、脾臓摘出群と温存群で比較を行った。その結果、脾摘による肝線維化抑制効果が示された。免疫不全マウスでは脾摘による肝線維化抑制効果は認めなかった。

そのメカニズムを解明するため肝内のTh1/Th2バランスの変化を調査した。その結果、脾摘群でTh1が優位に変化していた。また脾臓では肝傷害時にCD4陽性細胞数が減少し、反対に肝臓では増加を認めた。GFP陽性脾細胞の移植実験により、脾臓から肝臓へのTリンパ球の遊走が確認され、その大部分がTh2リンパ球であった。脾摘がTh1/Th2バランスの修飾により肝線維化抑制に関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of splenectomy on liver fibrosis, BALB/c mice underwent splenectomy or sham operation and subjected to carbon tetrachloride (CCl4) or thioacetamide (TAA) treatments. Splenectomy significantly suppressed liver fibrosis in the CCl4 and TAA models. The inhibitory effect of splenectomy on liver fibrosis was not observed in SCID mice.

To investigate the mechanisms underlying these effects, we investigated the change of liver Th1/Th2 balance. As a result, splenectomy shifted Th1/Th2 balance toward Th1-dominance. In addition, the number of CD4+ lymphocytes in the spleen was decreased. In contrast, that in the liver was increased. GFP+ splenic lymphocytes were transplanted into the spleen of wild type mice. GFP+CD4+ lymphocytes appeared in the liver after induction of fibrosis and the vast majority of them were Th2 lymphocytes by flow cytometry. We conclude that splenectomy suppresses progression of liver fibrosis at least partly through restoring the Th1/Th2 balance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 消化器外科学

キーワード：肝線維化 肝移植 脾臓 免疫

1. 研究開始当初の背景

持続的な肝傷害は肝線維化を引き起こし肝硬変に至る。肝線維化の病態生理学的メカニズムを理解し、その進行を抑制することは慢性肝疾患患者の予後を改善する上で極めて重要である。これまでにいくつかの基礎実験及び臨床研究で脾摘が肝線維化に対して抑制的に作用することは示されている。しかしながら、そのメカニズムについてはまだ不明な点が多い。脾臓は免疫系に関与する臓器の一つでもあり、免疫系は肝線維化の進行に影響を及ぼすことができる。肝線維化のヘルパーTリンパ球の関係がよく知られている。IFN γ などのTh1系サイトカインは肝線維化に対して抑制的に作用し、一方でIL-4などのTh2系サイトカインは肝線維化を促進する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫学的なメカニズムに着目して肝線維化における脾臓の役割を解明することとした。

3. 研究の方法

BALB/c および SCID マウスに脾摘術または sham 手術を施行後、四塩化炭素(CCl₄)やチオアセトアミド(TAA)の反復的な腹腔内投与により肝線維化を誘導した。

4. 研究成果

①脾臓摘出により肝線維化の進行は抑制される。

マウスを脾臓摘出群、温存群の2群に分け、四塩化炭素(CCl₄)、チオアセトアミド(TAA)による一般的な肝線維化モデルで肝線維化を誘導し、脾摘が肝線維化に与える効果をシリウスレッド染色、ハイドロキシプロリン定量などで検討した。その結果、CCl₄及びTAA誘導肝線維化モデルでは、脾臓摘出群において有意な肝線維化の抑制効果を認めた(図1, 図2)。

②脾臓により肝内のヘルパーTリンパ球サブセットはTh1優位に変化する

脾臓が肝線維化に与える機序を解明するため、肝内のTh1、Th2サイトカインの測定によるTh1/Th2バランスの変化を調査した。サイトカインの計測はRT-PCTにてmRNAを検出して施行し、Th1群としてIFN γ 、IL-2、IL-12をTh2群としてIL-4、IL-10、IL-13を測定した。その結果、CCl₄及びTAA誘導肝線維化モデルでは、脾摘群でTh1が優位にTh1/Th2サイトカインバランスが変化していた(図3, 4)。flow cytometryで肝内のリンパ球のCD4及びCD45RCの発現を調べた結果、CCl₄誘導肝傷害モデルでは、脾臓によりCD4、CD45RC二

重陽性細胞数(Th1リンパ球)の増加を認め、免疫染色でも同様な結果を認めた。

図1 脾摘はCCl₄誘導肝線維化を抑制

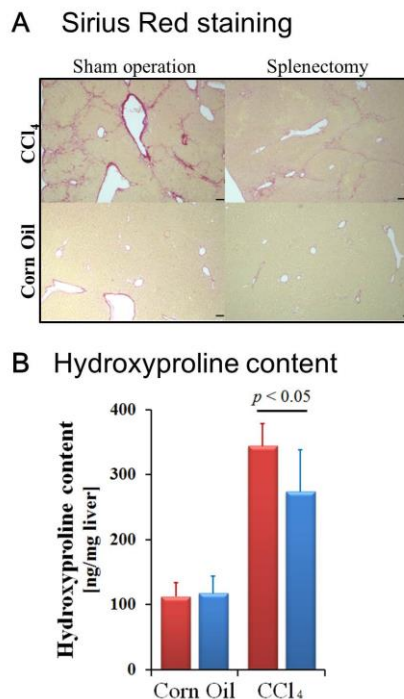
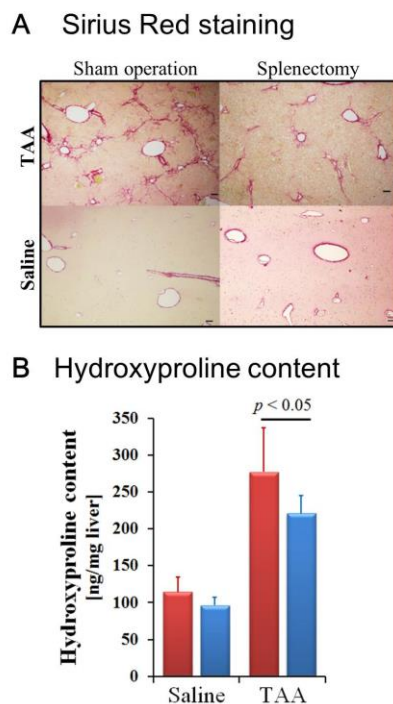


図2 脾摘はTAA誘導肝線維化を抑制



③免疫不全マウスは脾臓による肝線維化抑制効果は消失する。

免疫不全マウスで肝線維化に対する脾臓の影響を調査した。肝線維化はCCl₄で誘導した。その結果、脾摘群と温存群で肝線維化の程度に有意差を認めなかった(図5)。また、Thサイトカインバランスの変化も認めなかった。これらの結果から、免疫学的なメカニズムが

脾摘術による肝線維化抑制効果に関与していることが示唆された。特に肝線維化におけるヘルパーT リンパ球の果たす役割の重要性が確認された。

図3 脾摘はTh1/Th2バランスを変化(CCl₄)

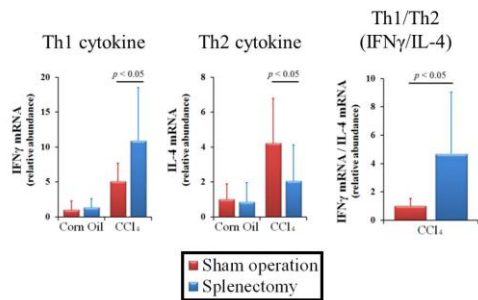


図4 脾摘はTh1/Th2バランスを変化(TAA)

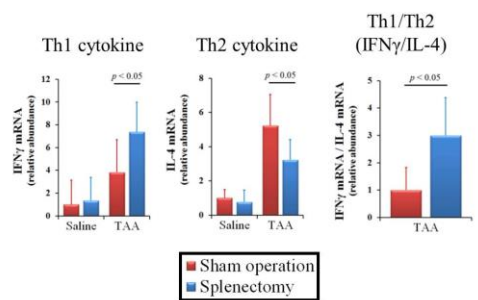
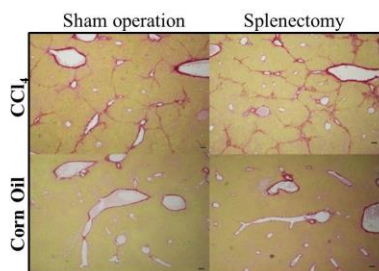
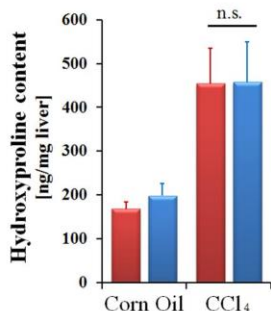


図5 SCIDマウスでは脾摘の肝線維化抑制効果は消失

A Sirius Red staining



B Hydroxyproline content



④肝傷害時に CD4 陽性細胞数は脾臓内では減少し、肝臓内では増加する。脾摘が肝内の Th1/Th2 サイトカインバランスの変化に影響を及ぼすメカニズムを解明するため、肝傷害時の脾臓内での変化を調査した。HE 染色では肝傷害による明らかな構造的変化を認めなかったが、ヘルパーT リンパ球

のマーカーである CD4 の免疫染色にて CD4 陽性細胞数の有意な減少を認めた(図 6)。RT-PCR にて CD4 発現も低下し、flow cytometry でも同様な CD4 陽性リンパ球の減少を認めた。一方、肝臓では肝傷害時に CD4 陽性細胞数の増加と CD4 発現の増強を認めた(図 7)。解剖学的に脾臓は門脈系を介して肝臓と直接つながっており、脾臓から肝臓へのリンパ球の遊走が推測された。

図6 肝傷害時に脾内のCD4⁺細胞数は減少

A Immunohistochemical staining: CD4

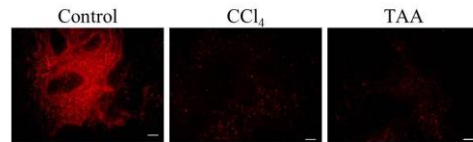
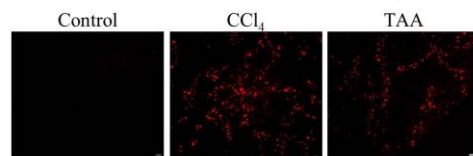


図7 肝傷害時に肝内のCD4⁺細胞数は増加

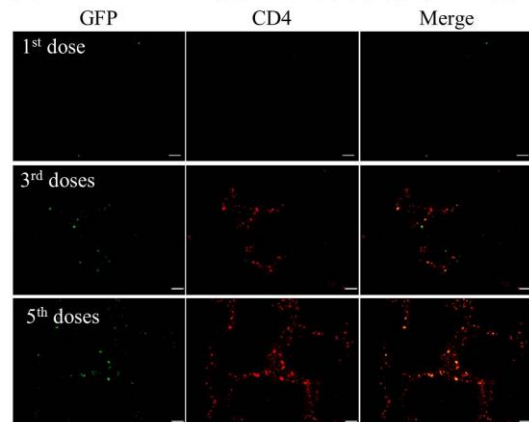
A Immunohistochemical staining: CD4



⑤肝傷害時に脾臓から肝臓へのヘルパーT リンパ球が遊走する。

上記の脾臓から肝臓へのリンパ球の遊走を検証するため、全身 GFP マウスの脾臓から脾細胞を分離し、同系の野生型マウスの脾臓内に移植し CCl₄ で肝傷害を誘導した。GFP と CD4 による肝臓の二重免疫染色の結果、肝臓内での GFP、CD4 二重陽性細胞数は肝傷害誘導後時間依存性に増加を認めた(図 8)。

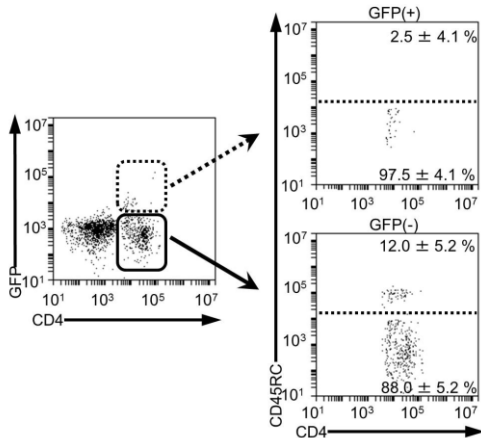
図8 GFP⁺CD4⁺細胞は時間依存性に増加



⑥脾臓由来ヘルパーT リンパ球は Th2 が優位である。

上記実験で認めた脾臓由来の GFP、CD4 二重陽性細胞のプロファイルを flow cytometry を用いて調査した。その結果、脾臓由来の CD4⁺ リンパ球は CD45RC が低発現であった。この結果から、Th2 リンパ球が有意であることが確認された(図 9)。

図9 脾臓由来GFP⁺CD4⁺細胞はTh2優位



⑦まとめ

これまでに、臨床的に慢性肝疾患患者で脾摘が術後の肝機能を改善すること、また動物実験モデルにおいて脾摘が肝線維化の進行を抑制することは報告されている。しかしながら、そのメカニズムについては血小板やサイトカインの関与を示唆する報告が散見されるが、十分に解明されているといえない。本研究では、肝傷害時に脾臓由来のヘルパーTリンパ球が肝線維化の進行において重要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、慢性肝傷害時にTh2優位の脾臓のリンパ球が肝臓へ遊走し、肝臓のTh1/Th2バランスをTh2優位にシフトさせ、その結果肝線維化が促進することを示した。脾摘はこのTh1/Th2バランスをTh1優位に戻すことによって、肝線維化の進行を抑制すると考えられた。今後、更なる研究が必要であるが、我々の発見は免疫調節が肝線維化に対する有効な治療法となる可能性を示唆すると考える。

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5件)

- 1) Yamanaka K, Hatano E, Iguchi K, Yamamoto G, Sato M, Toriguchi K, Tanabe K, Takemoto K, Nakamura K, Koyama N, Narita M, Nagata H, Taura K, Uemoto S. Effect of olprinone on liver microstructure in rat partial liver transplantation. J Surg Res, 査読有, 183(1), 2013, 391-396. DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.033.
- 2) Koyama Y, Taura K, Hatano E, Tanabe K, Yamamoto G, Nakamura K, Yamanaka K, Kitamura K, Narita M, Nagata H, Yanagida A, Iida T, Iwaisako K, Fujinawa H, Uemoto S. Effects of oral intake of hydrogen water on liver fibrogenesis in mice. Hepatol Res, 査読有, 2013. doi: 10.1111/hepr.12165.

- 3) Iguchi K, Hatano E, Yamanaka K, Tanaka S, Taura K, Uemoto S. The impact of posthepatectomy liver failure on the recurrence of hepatocellular carcinoma. World J Surg, 査読有, 38(1), 2014, 150-158. doi: 10.1007/s00268-013-2247-7.
- 4) Nakao M, Oda Y, Taura K, Minato K. Direct volume manipulation for visualizing intraoperative liver resection process. Comput Methods Programs Biomed, 査読有, 113(3), 2014, 725-735. doi: 10.1016/j.cmpb.2013.12.004.
- 5) Nakamura K, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Okuno M, Koyama Y, Narita M, Seo S, Taura K, Uemoto S. Soluble thrombomodulin attenuates sinusoidal obstruction syndrome in rat through suppression of high mobility group box 1. Liver Int, 査読有, 2013. doi: 10.1111/liv.12420.

[学会発表] (計4件)

- 1) K. Tanabe, K. Taura, Y. Koyama, G. Yamamoto, T. Nishio, E. Hatano, S. Uemoto. Migration of splenic lymphocytes promotes fibrotic response in the liver through modification of T helper cytokine balance in mice. Academic Surgical Congress, 2014年2月4日~6日, Manchester Grand Hyatt (San Diego, CA)
- 2) K. Taura, Y. Koyama, K. Tanabe, G. Yamamoto, T. Nishio, E. Hatano, S. Uemoto. Liver Stiffness Measurement Predicts Posthepatectomy Liver Failure. Academic Surgical Congress, 2014年2月4日~6日, Manchester Grand Hyatt (San Diego, CA)
- 3) 田邊和孝, 田浦康二郎, 波多野悦朗, 小山幸法, 山本玄, 西尾太宏, 奥田雄紀浩, 中村公治郎, 鳥口寛, 竹本研史, 上本伸二. 脾臓摘出術は肝臓におけるTh1/Th2サイトカインバランスの変化を介して肝線維化を抑制する. 第114回日本外科学会定期学術集会, 2014年4月3日~5日, 国立京都国際会館(京都市)
- 4) 田浦康二郎, 波多野悦朗, 安近健太郎, 瀬尾智, 福光剣, 上本伸二. 肝静脈根部大型肝癌に対する肝切除術式. 第114回日本外科学会定期学術集会, 2014年4月3日~5日, 国立京都国際会館(京都市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田浦 康二郎 (TAURA KOJIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：80378629

(2) 研究分担者

上本 伸二 (UEMOTO SHINJI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：40252449

波多野 悦朗 (HATANO ETSURO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：80359801