

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590970

研究課題名(和文)炎症・ウイルス感染環境下での肝構成細胞の免疫・代謝応答の解析

研究課題名(英文) Analysis of immune and metabolic responses of liver cells under inflammatory circumstances or viral infection

研究代表者

石川 哲也 (ISHIKAWA, TETSUYA)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10288508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝実質細胞による炎症応答が肝炎の病態に与える影響を明らかにするため、in vitro擬似肝炎環境下での肝癌細胞株の炎症応答について解析した。用いた3種の肝癌細胞株のいずれにおいても、炎症刺激後の炎症性サイトカイン/ケモカイン発現は増強していた。肝実質細胞の肝炎の病態形成への関与は明らかであり、その役割の解明のため、in vitro肝炎モデルは有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of hepatic parenchymal cells on the pathogenesis of hepatitis, the expression patterns of cytokines and chemokines by hepatoma cell lines under inflammatory circumstance were analyzed. In three hepatoma cell lines used, the expressions of inflammatory cytokines and chemokines were up-regulated after various inflammatory stimuli. The pathogenetic importance of hepatic parenchymal cells in the formation of hepatic inflammation is confirmed, and in vitro hepatitis model used in the current study is thought to be useful for the detailed analysis of the pathogenesis of hepatitis.

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：肝細胞 サイトカイン ケモカイン 炎症応答

1. 研究開始当初の背景

臓器としての肝臓は、肝細胞、胆管細胞などの実質細胞、類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞などの非実質細胞から構成され、構成細胞の70%弱が肝実質細胞で、30%弱が類洞内皮細胞や星細胞で占められている。

肝炎は、肝全体に炎症を呈するびまん性肝疾患の代表的疾患であるが、肝構成細胞の大部分を占める肝細胞自身が、そのサイトカイン/ケモカイン産生により、肝臓における炎症・免疫応答の方向性、炎症の程度および転帰に大きな影響を与えていることが示唆されている。

肝細胞などの個々の肝構成細胞が病態形成に果たす役割については、まだ十分に解明されていない。これらの詳細の解明が、肝炎における効果的な抗炎症療法、効率のよい抗ウイルス療法などの治療開発に繋がるものと考えられる。

2. 研究の目的

肝構成細胞(主に肝細胞の代替としての肝癌細胞)を炎症性サイトカインによって刺激することで、*in vitro*で擬似的な肝炎環境を構築し、その環境下での肝構成細胞自身の免疫応答を解析する。これにより肝炎という病態の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肝癌細胞株における炎症刺激に対する免疫の解析

3種の肝癌細胞株(HepG2、Huh7、Hep3B)を用い、炎症性サイトカイン刺激下での、ケモカイン/サイトカイン発現パターンを解析する。

細胞刺激に用いるサイトカインは、肝障害モデルマウスの肝組織中で最も強く発現のみられるIL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ を単独あるいは組み合わせて用いる。

解析項目は下記の通りとする。

ケモカイン: Mig、IP-10、I-TAC、TARC、MDC、IL-8、MCP-1、RANTES、サイトカイン: TNF- α 、IL-6、IFN- γ 。

いずれも細胞内 mRNA 発現を real-time PCR 法で解析する。

(2) 抗炎症性サイトカインが肝癌細胞株の炎症刺激への反応に与える影響の解析

抗炎症性サイトカインである IL-4、IL-10 を添加し、上記と同様の解析を行う。さらに炎症性サイトカインとの同時添加時のケモカイン/サイトカイン発現パターンについて解析する。

4. 研究成果

(1) 無刺激状態での肝癌細胞株のサイトカイン/ケモカイン産生

無刺激状態では、HepG2 に比較し、Huh7、Hep3B において炎症性サイトカイン/ケモカインが高発現していた。HepG2 では p53 遺伝

子は野生型であるのに対し、Huh7 では p53 遺伝子は突然変異型、Hep3B では欠損型を示す。p53 は炎症性サイトカイン/ケモカイン発現に関与する NF- κ B に対して抑制的に作用することがわかっており、p53 機能の欠損する Huh7、Hep3B では NF- κ B への抑制がかからず、これにより NF- κ B の活性化が亢進し、NF- κ B が転写因子として作用する炎症性サイトカイン/ケモカインが高発現していたと考えられる。

(2) 肝癌細胞株の炎症刺激に対する免疫応答

IL-1 刺激

Mig は、HepG2 では発現自体が認められなかったが、Huh-7 と Hep3B では同程度の発現量の増加がみられた。IP-10、I-TAC はすべての細胞株で同程度の発現増強がみられた。MCP-1 は Huh-7 では発現量の増加がみられなかったが、HepG2、Hep3B で発現増強を認め、特に Hep3B において顕著であった。IL-1 刺激による MDC、TARC の発現増強は Huh7 でのみ認められた。

IFN- γ 刺激

Mig は、HepG2 では発現自体が確認されなかったが、Huh-7、Hep3B では同程度の発現量の増加を認めた。IP-10 は、いずれの細胞株においても発現量が増加する傾向を認めたものの、その程度は軽度に留まった。I-TAC は、全ての細胞株で発現量の増加が認められ、特に HepG2 では顕著であった。MCP-1 は全ての細胞株で発現量の増加を認めなかった。

(2) 肝癌細胞株の抗炎症刺激に対する免疫応答

IL-4 刺激

Mig は、HepG2 では発現自体が認められず、Huh-7 では発現量の増加がみられなかったのに対し、Hep3B で軽度の発現量の増加を認めた。IP-10 は全ての細胞株で発現量の増加を認めなかった。I-TAC は Huh-7 でのみ発現量の増加を認めた。MCP-1 は Huh-7、Hep3B では発現誘導はあっても軽度に留まったのに対し、HepG2 では顕著な発現誘導を認めた。

HepG2、Huh7、Hep3B とも、IL-1 刺激による IP-10 発現の増強、IFN- γ 刺激による Mig 発現の増強、TNF- α 刺激による IP-10、RANTES 発現の増強など、共通の反応パターンが確認された。一方、IL-1 刺激による MDC、TARC の発現増強が Huh7 でのみ認められるなど、細胞間の反応パターンの違いも確認された。また、無刺激状態では、Hep3B がサイトカイン/ケモカインを高発現しているのに対し、HepG2 は発現量が低く、Huh-7 はその中間のパターンを呈していた。Hep3B においては、種々のサイトカイン刺激に対する反応性が低い傾向にあり、これは定常状態(無刺激)におけるサイトカイン/ケモカインの高発現

が影響していることが示唆された。

肝構成細胞に対し種々の炎症性刺激を加えることにより、*in vitro*での炎症環境を構築することが可能である。ただし、肝癌細胞株を代替として用いる場合には、細胞株間の反応性の違いも考慮する必要がある。初代肝細胞、あるいは不死化肝細胞を用いた実験、その他の肝構成細胞を用いた実験により、実際の病態を反映した、肝炎病態の解析に有用な実験系の構築が可能と考えられる。

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 7件)

Komori Y, Arisawa A, Takai M, Yokoyama K, Honda M, Hayashi K, Ishigami M, Katano Y, Goto H, Ueyama J, Ishikawa T, Wakusawa Y. Ursodeoxycholic acid inhibits overexpression of P-glycoprotein induced by doxorubicin in HepG2 cells. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 2014; 724: 161-167. Doi:10.1016/j.ejphar.2013.12.023

Hayashi K, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Ito Y, Kimura H, Katano Y, Goto H. A pediatric case of hepatitis B virus subgenotype A2 in Japan. *Clin J Gastroenterol*, 査読有, 2013; 6:383-385. Doi: 10.1007/s12328-013-0402-1

Hayashi K, Katano Y, Masuda H, Ishizu I, Kuzuya T, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Pegylated interferon monotherapy in patients with chronic hepatitis C with low viremia and its relationship to mutations in the NS5A region and the single nucleotide polymorphism of interleukin-28B. *Hepatol Res*, 査読有, 2013; 43: 580-588. DOI: 10.1111/hepr.12005

Honda T, Katano Y, Kuzuya T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Ishikawa T, Toyoda H, Kumada T, Yamamoto K, Matsushita T, Kojima T, Takamatsu J, Goto H. Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. *J Med Virol*, 査読有, 2013; 85:228-234. doi: 10.1002/jmv.23444

Ishikawa T. Immunoregulation of hepatitis B virus infection -rationale and

clinical application-. *Nagoya J Med Sci*, 査読無, 2012; 74: 217-232.

Hayashi K, Katano Y, Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. *J Med Virol*, 査読有, 2012; 84: 438-444.

Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Yoshioka Y, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Association of interleukin 28B and mutation in the core and NS5A region of hepatitis C virus with response to peg-interferon and ribavirin therapy. *Liver Int*, 査読有, 2011; 31: 1359-1361.

〔学会発表〕(計 4件)

伊藤弘康、大瀧博文、安藤達也、安藤量基、石川哲也、森脇久隆、清島満
マウスB型急性肝炎モデルにおけるインドールアミン酸素添加酵素の解析
第49回日本肝臓学会総会
2013.6.6-7 東京

伊藤弘康、安藤達也、石川哲也、清島満
インドールアミン酸素添加酵素の発現抑制を用いたHBV特異的細胞障害性T細胞誘導効果の検討
第60回日本臨床検査医学会学術集会
2013.10.31-11.03 神戸

山田達也、中川伸吾、吉住寧真、加納由貴、加納綾乃、石川哲也
ヒト肝癌細胞株間での各種炎症刺激に対するケモカイン産生能の比較
第60回日本臨床検査医学会学術集会
2013.10.31-11.03 神戸

加納由貴、中川伸吾、吉住寧真、加納綾乃、山田達也、松浦俊博、石川哲也
グレリン、レプチンによる炎症応答制御について
第60回日本臨床検査医学会学術集会
2013.10.31-11.03 神戸

〔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

石川 哲也 (ISHIKAWA, Tetsuya)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10288508

(2)研究分担者

石上 雅敏 (ISHIGAMI, Masatoshi)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90378042

上山 純 (UEYAMA, Jun)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00397645