

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591984

研究課題名(和文)肝臓機能重視した新しい視点に基づく人工肝臓補助システムの開発

研究課題名(英文)Development of artificial liver support system combining with liver cells and Kupffer cells.

研究代表者

藤井 秀樹 (FUJII, Hideki)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30181316

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)：肝実質細胞とクッパー細胞が共存する人工肝補助装置の開発には、クッパー細胞の多様な機能を解明することが重要である。IL-17Aノックアウトマウス(IL-17AKO)の検討からIL-17Aは肝細胞障害を防御するkey cytokineであった。またIL-17AKOとワイルドタイプマウス(WT)に肝切除を施行し、IL-17AKOでは肝再生が遅延することを明らかにした。またクッパー細胞を中心としたサイトカインカスケードに脾臓が関与していることを脾臓摘出モデルから検討した。その結果WTの脾臓摘出モデルでは肝再生が遅延した。肝再生には脾臓由来のCD4陽性リンパ球が産生するIL-17Aがきわめて重要である。

研究成果の概要(英文)：IL-17A regulates neutrophil-dependent organ injury. The purpose of this study was to determine the role of IL-17A in neutrophil recruitment after ischemia-reperfusion (I/R). Wild-type (WT) and IL-17A knockout (KO) mice were evaluated. In another experiments, recombinant (rm) IL-17A or rmIL-17A/F were administered before I/R. Isolated Kupffer cells were incubated with rmIL-17A and production of TNF-alpha was measured. The extent of liver injury demonstrated similar levels in the acute phase (6 h) in these two models. In contrast, in the subacute phase (20 h), liver injury were significantly reduced in the KO compared with the WT. This reduction in liver injury was associated with suppression of chemokine, adhesion molecule expression and reduction in infiltration of neutrophils into the liver. TNF-alpha production by isolated Kupffer cells increased significantly with rmIL-17A. IL-17A is a key regulator in initiating neutrophil-induced inflammatory responses and hepatic injury.

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：肝不全 人工肝補助装置 肝Kupffer細胞 GCSF M-CSF 新生血管 IL-17 脾臓摘出

### 1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患を背景にした外科手術後、あるいは大量肝切除を余儀なくされる悪性腫瘍手術後の急性肝不全は、いまだ頻度の高い致命的な病態であり、早急な治療法の確立が望まれる。血漿交換療法、近年では生体肝移植などが施行されるが、その有効性、ドナー不足などの問題は解決されていない。海外では分離肝細胞を工学装置に組み込んだハイブリッド型人工肝臓が開発され臨床応用されているが、いまだ充分には普及していない。これは、肝細胞の生体外培養における分化機能の維持、複雑多岐にわたる機能を有する肝臓組織の再構築の困難さによるものと考えられる。これらを背景に真の人工肝臓システムは種々の肝細胞機能を肝細胞そのものにより代替するのみではなく、肝類洞細胞の機能をも代替するものでなければならぬと考えた。すなわち、肝局所の免疫中枢として中心的な役割を有する肝 Kupffer 細胞を適切に制御する新たな視点からの人工肝臓システムが必要とされる。したがって、様々な病態での肝マクロファージの動態を検索する必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) 肝 Kupffer 細胞の抑制が high mobility group box 1(HMGB1)ならびに敗血症性腹膜炎に影響するかを検討し、さらに敗血症性腹膜炎への脾臓の関与を検討する。

(2) 制御すべきマクロファージが肝細胞に癌化刺激を与えるか否かを、肝発癌の initiation、progression に macrophage colony stimulating factor (M-CSF)が関与しているかを、M-CSF 欠損マウス (osteopetrotic : op/op) マウスを使用し検討する。

(3) 血清 interleukin(IL)-17A が肝臓の線維化に関与しているとの報告があるその機序は未だ不明である。そこで胆汁うったい肝線維化モデルを用いその機序を明らかにする。

(4) 肝切除後の肝再生には肝クッパー細胞が産生する TNF- $\alpha$  が制御している。さらにわれわれは、IL-17A が肝クッパー細胞からの TNF- $\alpha$  産生を増強していることを明らかにしており、IL-17A が肝再生に寄与していることが推測される。そこで肝切除後の肝再生における、脾臓の役割と、IL-17A の作用を検討する。

(5) 最近の研究により、IL-17A が好中球依存性の臓器障害に関与していることが明らかになった。そこで、温肝虚血再還流(I/R)における好中球の浸潤とそれに引き続いて生じる肝障害に、IL-17A がどのように働いているかを検討する。

### 3. 研究の方法

(1) ラットで盲腸結紮穿孔 (CLP) による敗血症性腹膜炎を作成するため煮の前に肝 Kupffer 細胞を消去するために liposome-entrapped dichloromethylate diphosphonate (liposome-MDP) あるいは non entrapped liposome (lipo) を投与し血清肝 high mobility group box 1(HMGB1)の血清レベルならびに致死率を検討する。さらに肝 Kupffer 細胞を単離しその HMGB1 の産生を検討するとともに、脾臓摘出の血清 HMGB レベルならびに致死率を検討する。

(2) op/op マウスに diethylnitrosoamine(DEN)を腹腔内投与し肝癌を誘発した。DEN 投与後 28 週で肝癌発癌率と血清 M-CSF レベルを測定する。さらに活性化マクロファージの分布と、CD163 と CD204 の mRNA 発現を検索する。また、腫瘍の血管新生を解析する。さらに、別の実験系として DEN 投与後の急性期の肝細胞のアポトーシスと増殖阻害を検討。単離した肝マクロファージを M-CSF を添加して培養し血管内皮成長因子(VEGF)の産生を E-LISA で検討した。

(3) IL-17A ノックアウトマウス(KO)ワイルドタイプマウス(WT)を用い胆管結紮モデルを作成する。経時的に犠牲死させ血清、肝組織を採取。肝線維化マーカーの mRNA 発現を測定し、免疫染色により活性化肝星細胞の分布を検討する。肝クッパー細胞ならびに肝星細胞を単離し、in vitro で肝クッパー細胞を IL-17A あるいは IL-17F 添加培地で培養し、tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ )産生能ならびに transforming growth factor 1(TGF- $\beta$ 1)を測定する。同時に肝星細胞も IL-17A あるいは IL-17F 添加培地で培養し、その形態的变化を免疫染色にて検討する。

(4) ワイルドタイプ(WT)マウスと IL-17A ノックアウトマウス(KO)に肝部分切除を施行、経時敵に犠牲死させ肝組織を採取。肝細胞増殖を評価し、さらに肝組織の TNF- $\alpha$ 、IL-6 を測定する。別の実験系として、WT マウス、KO マウスに肝切除前に脾臓を摘出する。in vitro で、脾臓内の CD4 陽性リンパ球を単離し、IL-17A 陽性細胞の数を検討する。

(5) ワイルドタイプ(WT)マウスと IL-17A ノックアウトマウス(KO)に、温肝虚血再還流(I/R)を施行する。具体的には内側の最大葉を 90 分間クランプし、その後解放する。別系統の実験として、I/R 施行前に KO マウスに recombinant mouse (rm) IL-17A homodimer あるいは rmIL-17A/F heterodimer を投与し肝障害度を評価する。さらに、単離した肝クッパー細胞を rmIL-17A あるいは rmIL-17A/F を添加して培養し、TNF- $\alpha$  産生能を評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 肝 Kupffer 細胞の lipo-MDP による消去により血清 HMGB1 レベルは上昇し敗血症性腹膜炎の致死率は上昇した。また HMGB1 のレベルは肝門脈領域ならびに脾臓で lipo より lipo-MDP で有意に上昇した。一方、脾臓摘出により HMGB1 の産生は抑制され致死率は改善された。CLP の後に HMGB1 の発現は肝臓よりも脾臓で高発現していた。さらに in vitro では HMGB1 の発現は脾臓のマクロファージで最も高値であった。また、ED3 陽性細胞は脾臓を摘出しない CPL で増加していたが脾臓を摘出した CPL では増加は認められなかった。さらに、lipo-MDP 処理群では CLP の後肝臓での ED も増加していたが、脾臓を摘出すると増加は認められなかった。肝臓ならびに脾臓は敗血症性腹膜炎で重要な働きをしていることが明らかになった。CLP での肝臓への遊走マクロファージの一部は脾臓由来であることが明らかになった。

(2) コントロールのマウスと比較して、op/op マウスでの肝発癌率は抑制されていた。また、血清 M-CSF 濃度はコントロールマウスで上昇していた。肝マクロファージは op/op マウスでは、腫瘍内のみ認められたが、コントロールマウスでは腫瘍内のみならず周囲の正常肝実質にも認められた。また op/op マウスでは炎症性サイトカインの mRNA 発現はコントロールマウスと比較して著しく抑制されていた。さらに op/op マウスでは著しいアポトーシスの像が認められた。さらに血管新生は op/op マウスと比較してコントロールマウスで著明で、VEGF の産生も、M-CSF を添加して培養した肝マクロファージが、M-CSF を添加しなかった場合より増加していた (図 1)。このように、M-CSF は化学発癌における progression に大きく関与していた。

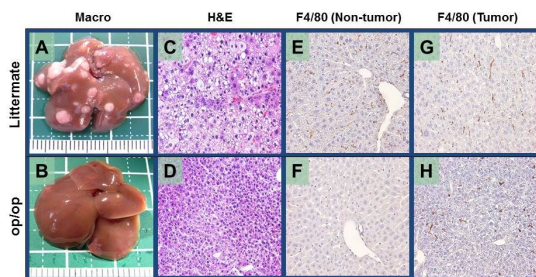


図 1 op/op マウスとコントロールの発癌率とマクロファージ浸潤の比較

(3) ワイルドタイプ (WT) で認められた肝障害はノックアウトマウス (KO) では著明に改善されていた。また血清 TNF- $\alpha$  ならびに TGF- $\beta$  1 は WT マウスと比較して KO マウス有意に抑制されていた。WT マウスで発現されている TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  1 ならびに collagen 1 は KO マウスでは有意に抑制されていた。さ

らに WT マウスで著明であった肝線維化は KO マウスでは有意に改善していた。クッパー細胞では IL-17A で処理するとサイトカイン産生が増強しており、また肝星細胞は myofibroblast 様に強く形態変化を生じていた。IL-17A は肝クッパー細胞ならびに肝星細胞を活性化することにより、胆汁うっ滞による肝線維化に強く関与していることが明らかになった (図 2)。

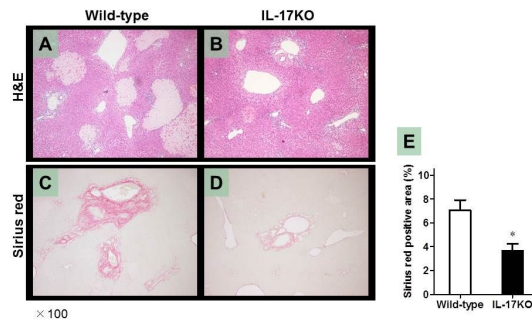


図 2 IL-17AKO マウスとコントロールの線維化の程度の比較

(4) 肝再生は WT マウスと比較して KO マウスでは有意に肝再生が抑制されていた。これは細胞増殖マーカーの検討で肝細胞の増殖抑制によるものであることが明らかになった。WT マウスでは脾臓を摘出することにより、脾臓非摘出群と比較して肝再生は有意に遅延した。一方で、KO マウスにおいては脾臓の摘出の有無は肝再生には影響を与えなかった。また、肝切除後の IL-17A 陽性細胞は WT マウスの脾臓に有意に増加していた。これらの結果から脾臓内の CD4 陽性リンパ球に由来する IL-17A 細胞は肝切除後の肝再生に重要な役割を担っていることが明らかになった。

(5) I/R 6 時間後の急性期では血清トランスアミナーゼで表現される肝障害の程度は WT マウスも KO マウスも同程度であったが、20 時間後の亜急性期では血清トランスアミナーゼの値も、肝の壊死の程度も、WT マウスと比較して KO マウスでは有意に軽度であった。この現象はケモカインならびに接着分子発現の抑制ならびに肝臓への好中球浸潤の抑制によるものであった。一方、rmIL-17A、rmIL-17A/F のうち rmIL-17A の投与のみが亜急性期の肝障害を増悪させた。また、単離した肝クッパー細胞からの TNF- $\alpha$  産生能も、rmIL-17A、rmIL-17A/F のうち rmIL-17A の投与のみで著明に増加した。これらの結果から、I/R の亜急性期に引き起こされる浸潤好中球誘導性の炎症反応とともに肝障害は IL-17A が惹起することが明らかになった。

#### 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 17 件)

Matsuda M, Amemiya H, Kawaida H, Okamoto H, Hosomura N, Asakawa M, Sano K, Motosugi U, Ichikawa T, Nakazawa T, Fujii H. Typical fibrolamellar hepatocellular carcinoma in a Japanese boy: report of a case. *Surg Today*. 2013 (査読有)(DOI:10.1007/s00595-013-0653-y)

Kamisawa T, Ando H, Hamada Y, Fujii H, Koshinaga T, Urushihara N, Itoi T, Shimada H; Diagnostic criteria for pancreaticobiliary maljunction 2013. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013 (査読有)(DOI:10.1002/jhbp.57)

Ichikawa S, Ichikawa T, Motosugi U, Sano K, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H, Araki T. Presence of a hypovascular hepatic nodule showing hypointensity on hepatocyte-phase image is a risk factor for hypervascular hepatocellular carcinoma. *J Magn Reson Imaging*. 2013 (査読有)(DOI:10.1002/jmri.24164)

Hara M, Kono H, Furuya S, Hirayama K, Tsuchiya M, Fujii H. Macrophage colony-stimulating factor plays a pivotal role in chemically induced hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatol Res*. 2013 (査読有)(DOI:10.1111/hepr.12174)

Itoi T, Kamisawa T, Fujii H, Inui K, Maguchi H, Hamada Y, Nakano T, Ando H, Koshinaga T, Shibagaki K, Obayashi T, Miyazawa Y. Extrahepatic bile duct measurement by using transabdominal ultrasound in Japanese adults: multi-center prospective study. *J Gastroenterol*. 48(9):1045-50. 2013 (査読有)(DOI:10.1007/s00535-012-0702-0)

Mimura K, Shiraishi K, Mueller A, Izawa S, Kua LF, So J, Yong WP, Fujii H, Seliger B, Kiessling R, Kono K. The MAPK Pathway Is a Predominant Regulator of HLA-A Expression in Esophageal and Gastric Cancer. *J Immunol*. 191(12):6261-72. 2013 (査読有)(DOI:10.4049/jimmunol.1301597)

Kosugi S, Kawaguchi Y, Kanda T, Ishikawa T, Sakamoto K, Akaike H, Fujii H, Wakai T. Cervical lymph node dissection for clinically submucosal carcinoma of the thoracic esophagus.

*Ann Surg Oncol*. 20(12):4016-21. 2013 (査読有)(DOI:10.1245/s10434-013-3141-0)

Motosugi U, Ichikawa T, Araki T, Matsuda M, Fujii H, Enomoto N. Bayesian prediction for liver fibrosis staging: combined use of elastography and serum fibrosis markers. *Hepatology*. 58(1):450-1. 2013 (査読有)(DOI:10.1002/hep.26144)

Horaguchi J, Fujita N, Kamisawa T, Honda G, Chijiwa K, Maguchi H, Tanaka M, Shimada M, Igarashi Y, Inui K, Hanada K, Itoi T, Hamada Y, Koshinaga T, Fujii H, Urushihara N, Ando H; The committee of Diagnostic Criteria of The Japanese Study Group on Pancreaticobiliary Maljunction. Pancreatobiliary reflux in individuals with a normal pancreaticobiliary junction: a prospective multicenter study. *J Gastroenterol*. 2013 (査読有)(DOI:10.1007/s00535-013-0837-7)

Chen N, Motosugi U, Sano K, Ichikawa T, Nakano M, Morisaka H, Ichikawa S, Matsuda M, Fujii H, Enomoto N, Araki T. Early hepatocellular carcinomas showing isointensity or hyperintensity in gadoxetic acid-enhanced, hepatocyte-phase magnetic resonance images. *J Comput Assist Tomogr*. 37(3):466-9. 2013 (査読有)(DOI:10.1097/RCT.0b013e3182873799)

Yoshimura K, Mandal MK, Hara M, Fujii H, Chen LC, Tanabe K, Hiraoka K, Takeda S. Real-time diagnosis of chemically induced hepatocellular carcinoma using a novel mass spectrometry-based technique. *Anal Biochem*. 441(1):32-7. 2013 (査読有)(DOI:10.1016/j.ab.2013.06.017)

Kawasaki T, Bussolati G, Castellano I, Marchiò C, Daniele L, Molinaro L, Kondo T, Katoh R, Inoue S, Fujii H, Sugai T, Sapino A. Small-cell carcinoma of the breast with squamous differentiation. *Histopathology*. 63(5):739-741. 2013 (査読有)(DOI:10.1111/his.12201)

Furuya S, Kono H, Hara M, Hirayama K, Tsuchiya M, Fujii H. Interleukin-17A plays a pivotal role after partial hepatectomy in mice. *J Surg Res*

s. 184(2):838-46. 2013 (査読有)(DOI:10.1016/j.jss.2013.03.033)

Hara M, Kono H, Furuya S, Hirayama K, Tsuchiya M, Fujii H. Interleukin-17A plays a pivotal role in cholestatic liver fibrosis in mice. J Surg Res. 183(2):574-82. 2013(査読有)(DOI:10.1016/j.jss.2013.03.025)

Shiraishi K, Mimura K, Izawa S, Inoue A, Shiba S, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Inoue M, Fujii H, Kono K. Lapatinib acts on gastric cancer through both antiproliferative function and augmentation of trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. Gastric Cancer. 16(4):571-580. 2013(査読有)(DOI:10.1007/s10120-012-0219-5)

Izawa S, Mimura K, Watanabe M, Maruyama T, Kawaguchi Y, Fujii H, Kono K. Increased prevalence of tumor-infiltrating regulatory T cells is closely related to their lower sensitivity to H2O2-induced apoptosis in gastric and esophageal cancer. Cancer Immunol Immunother. 62(1):161-70. 2013(査読有)(DOI: 10.1007/s00262-012-1327-0)

Motosugi U, Ichikawa T, Koshiishi T, Sano K, Morisaka H, Ichikawa S, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H, Araki T. Liver stiffness measured by magnetic resonance elastography as a risk factor for hepatocellular carcinoma: a preliminary case-control study. Eur Radiol. 23(1):156-62. 2013(査読有)(DOI: 10.1007/s00330-012-2571-6)

〔その他〕

ホームページ等

[http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A\\_Index.Main](http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Index.Main)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤井 秀樹 (FUJII, Hideki)  
山梨大学・医学工学総合研究部  
・教授  
研究者番号：30181316

### (2) 研究分担者

河野 寛 (KONO, Hiroshi)  
山梨大学・医学工学総合研究部  
・助教  
研究者番号：40322127