

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790260

研究課題名（和文）肝修復過程における u-PA/プラスミン系による新規なマクロファージ機能制御機構

研究課題名（英文）Novel mechanisms of macrophage regulation by u-PA/plasmin system during liver repair

研究代表者

河尾 直之（KAWAO NAOYUKI）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70388510

研究成果の概要（和文）：本研究では肝修復過程における u-PA/プラスミン系によるマクロファージの機能制御機構を検討した。その結果、肝修復過程において u-PA/プラスミン系が障害部位へマクロファージを集積させ、肝修復に必須であることが明らかになった。さらに、u-PA/プラスミン系は肝障害部位周囲の微小環境中のサイトカイン発現を介して集積したマクロファージにおいて多様な表現型と細胞極性を誘導し、壊死組織の貪食に寄与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We investigated novel mechanisms of macrophage regulation by u-PA/plasmin system during liver repair. Our study indicates that u-PA/plasmin system is essential for liver repair through triggering macrophage accumulation at the border region of damaged site. Moreover, u-PA/plasmin system mediates the induction of phenotypic heterogeneity, cell polarity, and phagocytosis of necrotic tissue in the accumulated macrophages by its influence of the surrounding microenvironment at the edge of damaged tissue during liver repair.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：肝修復、マクロファージ、組織線溶系

## 1. 研究開始当初の背景

線溶系因子であるプラスミンは、前駆体であるプラスミノゲンとして肝細胞で産生され、組織性プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（u-PA）によって活性化されるセリンプロテアーゼであり、血管内に形成したフィブリン血栓を溶解する主要分子である。また、プラスミノゲンは細胞膜表面に存在するプラスミノゲン受容体に結合して活性化され、細胞周囲に限局した酵素活性を発揮することで、細胞外基質の分解、マトリックスメタロプロテアーゼ系および成

長因子の活性化、細胞内シグナル活性化などを惹起することが知られている（Miles LA et al., 2005, *Front Biosci.* 10:1754-62., Kawao N et al., 2007, *Biochim Biophys Acta.* 1773:718-27.）。これまでに、プラスミノゲンの受容体として数種の分子が報告されている（Laumonier Y et al., 2006, *Blood.* 107:3342-9., Andronics NM et al., 2010, *Blood.* 115: 1319-30.）。

組織修復反応は様々な組織で惹起される生理的・病態生理的反応であり、損傷後から、急性炎症期、増殖期（肉芽組織形成）、再構築期、の大きく3つのフェーズに分類される。

肝臓において、一連の修復反応の破綻は、肝線維化や肝硬変などの慢性疾患を来たす一因である。

肝修復過程において、プラスミノゲンアクチベーター/プラスミン系が主に再構築期での細胞外基質の分解に中心的な役割を果たすことが知られているが (Pohl JF et al., 2001, *Am J Pathol.* 159:2179-86.), その他の役割については未だ不明な点が多い。最近、申請者らは、肝障害部位周囲におけるマクロファージの集積、血管新生およびその足場となる細胞外基質の蓄積にプラスミノゲンが寄与することを明らかにし、肝修復過程の増殖期での肉芽組織形成にプラスミノゲンが必須の分子であることを報告した (Kawao N et al., 2010, *J Thromb Haemost.*, 8:1555-66., Kawao N et al., 2010, *Thromb Res.*, 125:e214-21.)。ごく最近、申請者らは u-PA が障害部位周囲に集積したマクロファージの活性化に寄与し、マクロファージによる炎症反応や食食作用の制御に重要な役割を果たす可能性を示唆する予備的知見を得た。

## 2. 研究の目的

肝修復過程における u-PA/プラスミン系の役割に関して、再構築期での細胞外基質の分解以外にも、増殖期でのマクロファージの活性化に寄与することが明らかになりつつあるが、そのメカニズムは不明である。さらに、u-PA/プラスミン系はマクロファージの細胞機能を制御し、炎症反応、壊死組織除去、肝細胞増殖などの肝修復反応に影響をおよぼす可能性が考えられる。そこで本研究課題では、u-PA/プラスミン系による肝障害部位周囲に集積したマクロファージの動的作用を明らかにし、一連の肝修復反応における u-PA/プラスミン系の新しい生理的・病態生理的役割の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

7-9 週齢のプラスミノゲン、u-PA、t-PA、u-PAR 欠損マウスとそれらの野生型マウスを使用した。実験動物は近畿大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て使用し、実験は近畿大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

### (2) 光化学反応誘起肝細胞障害モデル

マウスをイソフルランによって麻酔し、開腹して露出させた肝臓外側左葉の表面に光線照射用プローブを設置した。次に頸静脈に挿入したポリエチレンチューブから光感受性色素である Rose Bengal を持続注入し、先に設置したプローブを介して 540nm の緑色光

線を 10 分間照射した。照射後、切開部を無菌的に縫合した。

### (3) 肝障害部位の定量

マウスをペントバルビタールによって麻酔し、心臓から生理食塩水 20 ml を灌流した後、4%パラホルムアルデヒド溶液 30 ml を灌流して肝臓を固定し採取した。採取した肝臓をパラフィンに包埋し、4  $\mu$ m の切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した後、顕微鏡下で撮影し、障害部位の面積を画像解析ソフトを用いて測定した。

### (4) 免疫染色法

上記の方法によって作製した切片を、抗 F4/80 (マクロファージのマーカー) 抗体、抗 u-PA 抗体、抗 CD206 抗体、抗 iNOS 抗体、抗 GM130 (ゴルジ体のマーカー) 抗体と反応させ、TSA 法によって可視化した後、蛍光顕微鏡下で観察した。

### (5) フィブリンザイモグラフィ法

肝障害部位を採取し、組織溶解液中でホモジナイズ後、遠心分離し上清を回収した。タンパク定量後、等量のサンプルをプラスミノゲンおよびフィブリン含有 10%アクリルアミドゲルで電気泳動し、分離した。次にゲルを 2.5% Triton-100 溶液中で 1 時間インキュベートした後、0.1M グリシン溶液中で 18 時間インキュベートした。プラスミノゲンアクチベーター活性を検出するためにゲルを CBB 染色した後、5%酢酸 30%メタノール溶液中で脱色した。

### (6) 透過型電子顕微鏡法

マウスをペントバルビタールによって麻酔し、心臓から生理食塩水 50 ml を灌流した後、2.5%グルタルアルデヒド溶液 50 ml を灌流して肝臓を固定し採取した。採取した肝臓を既報に従って 70 nm の切片を作製し、透過型電子顕微鏡下で観察した。

### (7) マクロファージにおけるゴルジ体の局在とその偏りの検討

ゴルジマトリックスタンパク質 (GM130) と F4/80 の二重染色を行った。障害部位境界に存在する F4/80 陽性細胞における GM130 免疫陽性反応の局在を画像解析ソフト (ImageJ plug-in Azimuthal Average) を用いて解析し、核の中心から各角度における GM130 の傾向強度を測定した。核の中心から障害部位の方向を 180 度とした時に GM130 免疫陽性反応のピークが 90-270 度にある細胞数の割合を算出した。

### (8) レーザーマイクロダイセクション法

肝障害部位の 10  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し、レーザーマイクロディセクション用スライドガラス上に貼付した。切片を酢酸/エタノール溶液(1:19)で固定した後、トリジンブルー染色を行った。肝障害部位境界から 50  $\mu\text{m}$  以内の領域をレーザーキャプチャーマイクロディセクションを用いて回収した後、既報に従って定量リアルタイム PCR 解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) u-PA 欠損による肝修復の遅延

u-PA の欠損によって肝障害部位の減少が野生型マウスと比較して遅延した (図 1)。一方、t-PA の欠損は肝障害部位の減少に影響を与えなかった (図 1)。これより、肝修復過程に t-PA ではなく u-PA が寄与することが明らかになった。

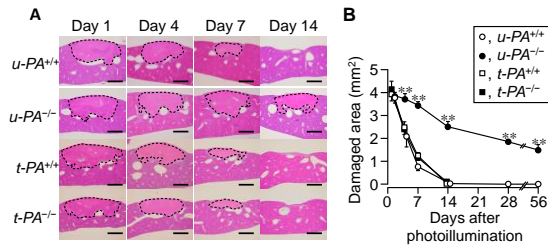


図1 u-PA欠損マウスにおける肝修復の遅延

(A)肝障害部位の中心部位から作成した切片のHE染色像。点線で囲まれた領域は障害部位を示す。(B)肝障害部位面積の定量。\*\* $p < 0.01$

##### (2) u-PA 欠損による肝障害部位周囲におけるマクロファージ集積の抑制

u-PA 欠損によって肝障害部位周囲への F4/80 陽性細胞の集積が有意に減少した (図 2)。一方、t-PA 欠損は肝障害部位周囲への F4/80 陽性細胞の集積に影響を与えなかった。さらに、u-PAR 欠損は肝障害部位の減少および肝障害部位周囲への F4/80 陽性細胞の集積に影響を与えなかった (図 3)。これより、肝修復過程において u-PA は u-PAR 非依存性に肝障害部位へのマクロファージの集積に寄与することが明らかになった。

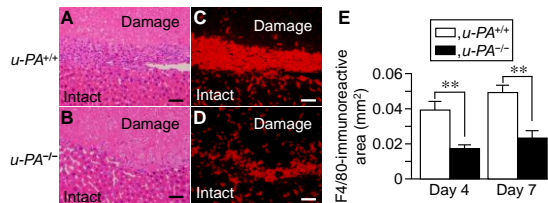


図2 u-PA欠損マウスにおける肝障害部位へのマクロファージ集積の抑制

(A-D)障害4日後の肝障害部位と正常部位との境界部位のHE染色 (A, B) と F4/80の免疫染色 (C, D)の写真。(E)障害部位周囲に集積したF4/80陽性細胞の数値化。\*\* $p < 0.01$

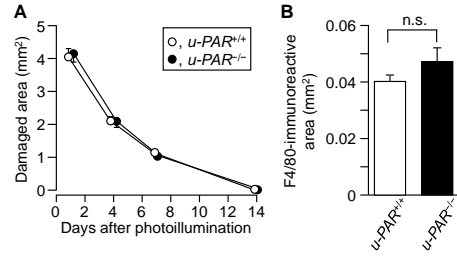


図3 u-PAR欠損マウスにおける肝障害部位の減少とマクロファージの集積

(A)肝障害部位面積の定量。(B)障害部位周囲に集積したF4/80陽性細胞の数値化。

##### (3) 肝障害部位における u-PA の発現

肝障害 7 日後において、野生型マウスでは u-PA 免疫陽性反応が障害部位周囲に強くみられ (図 4A, B)、一部の F4/80 陽性細胞に u-PA 発現が観察された (図 4C)。障害部位における u-PA 活性は経時的に増加したが、t-PA 活性に変化は見られなかった (図 4D, E)。これより、肝障害部位周囲に集積したマクロファージが u-PA を産生することが示唆された。

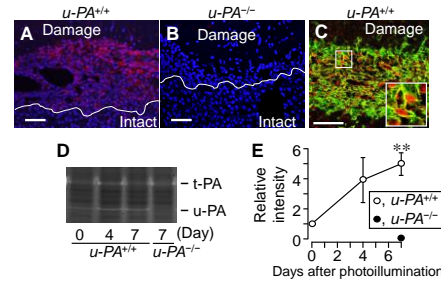


図4 肝障害部位におけるu-PAの発現

(A, B)肝障害部位周囲におけるu-PAの免疫染色像。赤色がu-PA陽性、青色が核を示す。実線は正常部位との境界を示す。(C)肝障害部位周囲に集積したマクロファージとu-PAの二重染色像。緑色がマクロファージのマーカーであるF4/80陽性、赤色がu-PA陽性を示す。(D, E)フィブリンゼイモグラフィによる肝障害部位におけるu-PAおよびt-PA活性の検討。\*\* $p < 0.01$

##### (4) 肝障害部位周囲に集積したマクロファージの表現型における u-PA の役割

マクロファージは様々な表現型を示すことが示唆されている。そこで、肝障害部位周囲に集積したマクロファージに発現する表現マーカーを検討した。野生型マウスでは障害部位境界に CD206 陽性マクロファージが観察され、さらに CD206 陽性マクロファージが観察された部位よりも正常部位側に iNOS 陽性マクロファージが観察された (図 5A, C)、u-PA 欠損マウスでは CD206 陽性および iNOS 陽性マクロファージは見られなかった (図 5B, D)。これより、肝障害部位周囲に集積したマクロファージは少なくとも CD206 陽性、iNOS 陽性、CD206 および iNOS 陰性の表現型を示すことが示唆された。さらに、u-PA が肝障害部位周囲に集積したマクロファージにおいてそれらの多様な表現型の誘導に寄与することが明らかになった。

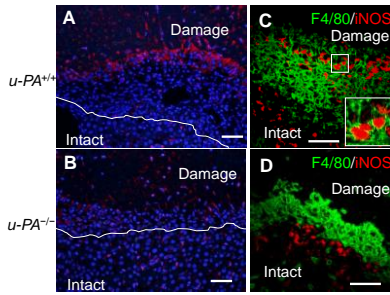


図5 肝障害部位周囲に集積したマクロファージの表現型

(A, B) 肝障害部位周囲に集積したマクロファージのCD206の免疫染色像。赤色がCD206陽性、青色が核を示す。(C, D) 肝障害部位に集積したマクロファージにおけるiNOSの発現。緑色がF4/80陽性、赤色がiNOS陽性を示す。

### (5) マクロファージによる肝壊死組織の食食における u-PA の役割

障害部位境界に存在するマクロファージを透過型電子顕微鏡によって観察した。野生型マウスではマクロファージは障害部位境界に整列し、偽足を伸展して壊死組織を食食する様子が観察された(図 6A-C)。一方、u-PA 欠損マウスでは障害部位境界におけるマクロファージの大きさは野生型マウスと比較して小さく、偽足を伸展して壊死組織を食食する様子もほとんど観察されなかった(図 6D-F)。これより、マクロファージによる肝壊死組織の食食に u-PA が寄与することが明らかになった。

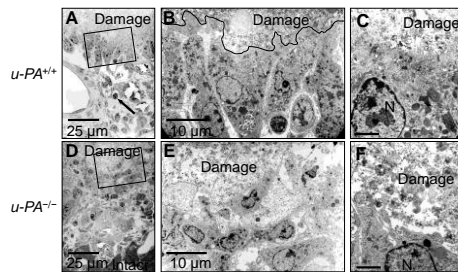


図6 肝障害部位境界の透過型電子顕微鏡像

### (6) 肝障害部位周囲に集積したマクロファージの細胞内小器官発達における u-PA の役割

活性化マクロファージでは発達した細胞内小器官が観察される。そこで、肝障害部位周囲に集積したマクロファージにおける核の大きさとゴルジ体の形態を検討した。障害部位に集積したマクロファージの核の大きさは u-PA 欠損によって有意に減少した(図 7A)。u-PA 欠損マウスにおいて、障害部位周囲に集積したマクロファージの核の大きさは u-PA の局所投与によって有意に増加した(図 7B)。さらに、野生型マウスにおいて、u-PA 阻害薬である uPA-STOP の局所投与によって障害部位周囲に集積したマクロファージの核の大きさは減少した(図 7C)。また、肝障害部位周囲に集積したマクロファージ

における核の大きさはプラスミノゲン欠損およびプラスミン阻害薬であるアプロチニン投与によって有意に減少した(図 7D, E)。障害部位境界に存在するマクロファージにおける細胞質に対する核の大きさは、u-PA およびプラスミノゲンの欠損によって増加した。

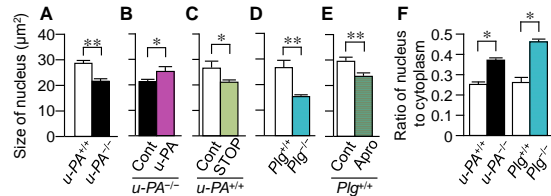


図7 肝障害部位周囲に集積したマクロファージの核の大きさ

(A) u-PA欠損マウスおよび野生型マウスの肝障害部位周囲に集積したマクロファージの核の大きさ。(B) u-PA欠損マウスの肝障害部位へのu-PAの局所投与の効果。(C) 野生型マウスの肝障害部位へのuPA-STOPの局所投与の効果。(D) プラスミノゲン欠損マウスおよび野生型マウスの肝障害部位周囲に集積したマクロファージの核の大きさ。(E) 野生型マウスの肝障害部位周囲に集積したマクロファージの核の大きさに対するアプロチニンの効果。(F) 肝障害部位周囲に集積したマクロファージにおける細胞質に対する核の割合。\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$

障害部位境界に存在するマクロファージにおいて、野生型マウスでは発達したゴルジ体が観察されたが(図 8A, C)、u-PA およびプラスミノゲン欠損マウスでは、発達したゴルジ体は観察されなかった(図 8B, D)。また、透過型電子顕微鏡下でゴルジ体が観察されるマクロファージも u-PA およびプラスミノゲン欠損によって減少した(図 8E)。

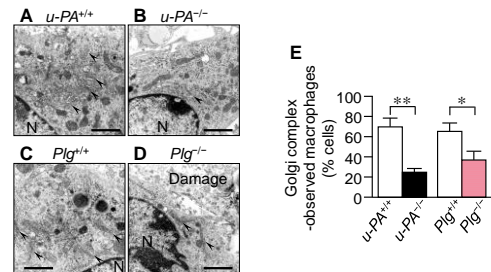


図8 u-PAおよびプラスミノゲン欠損が肝障害部位周囲に集積したマクロファージのゴルジ体の形態におよぼす影響

(A-D) 肝障害部位周囲に集積したマクロファージのゴルジ体の透過型電子顕微鏡像。(E) 透過型電子顕微鏡下でゴルジ体が観察されたマクロファージの割合。

以上より、肝障害部位周囲に集積したマクロファージにおける細胞内小器官の発達に u-PA/プラスミン系が寄与することが示唆された。

### (7) 肝障害部位周囲に集積したマクロファージの細胞極性における u-PA の役割

細胞が偽足を伸展する際に、細胞質のゴルジ体が偽足の伸展方向に移動して細胞に極性が生じることが知られている。次に、肝障害部位周囲に集積したマクロファージにおける細胞質のゴルジ体の局在を検討した。野生型マウスでは障害部位境界に存在するマ



クローファージのゴルジ体の局在は核よりも障害部位側に偏っていた (図 9A, 図 10A)。一方、u-PA 欠損マウスではクローファージのゴルジ体の局在に偏りは見られず、ゴルジ体の局在が障害部位側へ偏りを示すクローファージの割合は減少した (図 9B, 図 10A, B)。u-PA 欠損マウスの肝障害部位への u-PA の局所投与によってゴルジ体局在に偏りを示すクローファージが増加し (図 10C)、野生型マウスにおけるクローファージのゴルジ体局在の偏りは uPA-STOP の局所投与によって減少した (図 10D)。

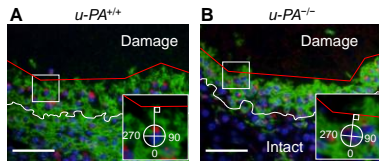


図9 肝障害部位周囲に集積したクローファージにおけるゴルジ体の局在

(A, B) 緑色がF4/80陽性、赤色がゴルジ体、青色が核を示す。赤色実線は障害部位境界を、白色実線は障害部位から40  $\mu\text{m}$ を示す。

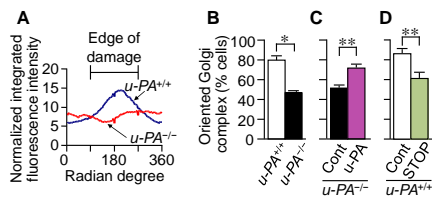


図10 肝障害部位境界に集積したクローファージの細胞極性

(A) 核を中心として障害部位の方向を180度とした時のゴルジ体の細胞質における分布。(B) 障害部位の方向へゴルジ体の局在に偏りがあるクローファージの割合。(C) u-PA欠損マウスにおいて障害部位境界に集積したクローファージのゴルジ体分布に対するu-PA局所投与の効果。(D) クローファージのゴルジ体分布に対するuPA-STOP局所投与の効果。

障害部位境界に存在するクローファージのゴルジ体の大きさは u-PA 欠損によって減少した (図 11)。

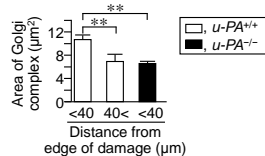


図11 障害部位周囲に集積したクローファージにおけるゴルジ体の大きさにおよぼすu-PA欠損の影響

以上より、障害部位境界に存在するクローファージの細胞極性の誘導および障害組織への偽足の伸展に u-PA が寄与することが示唆された。

#### (8) 肝障害部位周囲におけるサイトカイン

およびクローファージ表現マーカーの発現

レーザーマイクロダイセクション法によって、肝障害部位から 50  $\mu\text{m}$  以内の組織を回収し、サイトカインおよびクローファージ表現マーカーの遺伝子発現を検討した。クローファージの表現型の誘導に寄与する IFN- $\gamma$  および IL-4 の mRNA レベルは u-PA 欠損によって減少した (図 12A, B)。また、u-PA 欠損によってクローファージの表現マーカーである TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  の mRNA レベルは有意に減少した (図 12C, D) が、Ym1/2 および MGL-1 の mRNA レベルに変化は見られなかった (図 12E, F)。これより、u-PA は肝障害部位周囲における IFN- $\gamma$  および IL-4 の発現を介してクローファージの機能を制御することが示唆された。

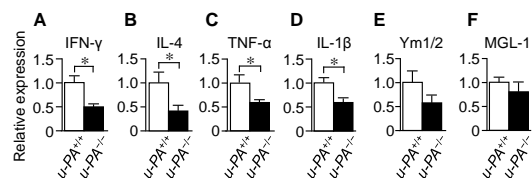


図12 レーザーマイクロダイセクション法によって回収した肝障害部位周囲の組織におけるサイトカインおよびクローファージ表現マーカーの発現

#### 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 6 件)

(1) Hayasaka N, Nagai N, Kawao N, Niwa A, Yoshioka Y, Mori Y, Shigeta H, Kashiwagi N, Miyazawa M, Satou T, Higashino H, Matsuo O, Murakami T. In vivo diagnostic imaging using micro-CT: sequential and comparative evaluation of rodent models for hepatic/brain ischemia and stroke. PLoS One. 2012;7:e32342. 査読有. doi:10.1371/journal.pone.0032342.

(2) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Okada K, Suzuki Y, Umemura K, Yano M, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen mediate activation of macrophage phagocytosis during liver repair in vivo. Thromb Haemost. 2012;107:749-59. 査読有. doi: 10.1160/TH11-08-0567.

(3) Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Ueshima S, Nagai N, Matsuo O. Spatiotemporal differences in vascular

permeability after ischaemic brain damage. Neuroreport. 2011;22:424-7. 査読有.  
doi: 10.1097/WNR.0b013e3283462dd9.

(4) Okada K, Ueshima S, Matsuno H, Nagai N, Kawao N, Tanaka M, Matsuo O. A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. J Thromb Haemost. 2011;9:997-1006. 査読有.  
doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04257.x.

(5) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator contributes to heterogeneity of macrophages at the border of damaged site during liver repair in mice. Thromb Haemost. 2011;105:892-900. 査読有.  
doi: 10.1160/TH10-08-0516.

(6) Tamura Y, Okada K, Kawao N, Yano M, Ueshima S, Nagai N, Matsuo O. Profibrinolytic effect of Enzamin, an extract of metabolic products from Bacillus subtilis AK and Lactobacillus. J Thromb Thrombolysis. 2011;32:195-200. 査読有.  
doi: 10.1007/s11239-011-0552-2.

[学会発表] (計 12 件)

(1) Kawao N, Nagai N, Matsuo O. u-PA plays a critical role in the induction of macrophage polarity during liver repair. 21st International Congress on Fibrinolysis & Proteolysis, Brighton UK, 2012 年 7 月 1-5 日.

(2) 河尾直之, 永井信夫, 田村行識, 堀内喜高, 奥本勝美, 岡田清孝, 矢野昌人, 鈴木康裕, 梅村和夫, 梶 博史, 松尾 理. 肝修復過程における u-PA によるマクロファージの機能制御. 第 34 回日本血栓止血学会. 東京都新宿区. 2012 年 6 月 7-9 日.

(3) 河尾直之, 永井信夫, 田村行識, 奥本勝美, 岡田清孝, 矢野昌人, 鈴木康裕, 梅村和夫, 梶 博史, 松尾 理. Roles of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen in both accumulation of macrophages and induction of their phenotype heterogeneity during liver repair. 第 89 回日本生理学会大会. 長野県松本市. 2012 年 3 月 29-31 日.

(4) 河尾直之, 永井信夫, 田村行識, 奥本勝

美, 鈴木康裕, 梅村和夫, 岡田清孝, 矢野昌人, 梶 博史, 松尾 理. Macrophages are regulated by urokinase-type plasminogen activator during liver repair. 第 85 回日本薬理学会年会. 京都府京都市. 2012 年 3 月 14-16 日.

(5) 河尾直之, 永井信夫, 田村行識, 奥本勝美, 岡田清孝, 矢野昌人, 鈴木康裕, 梅村和夫, 梶 博史, 松尾 理. 肝障害部位へのマクロファージの集積および活性化における u-PA の役割. 第 61 回日本薬学会近畿支部大会. 兵庫県神戸市. 2011 年 10 月 22 日.

(6) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O. Impaired accumulation of macrophages and absence of their phenotype heterogeneity during liver repair in urokinase-deficient mice. XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. 京都府京都市. 2011 年 7 月 23-28 日.

(7) Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Urokinase-type plasminogen activator and plasminogen mediate accumulation of macrophages and their phenotype heterogeneity at the border region of damaged site during liver repair. The 76th Japanese Society of Interferon & Cytokine Research The 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. 大阪府泉佐野市. 2011 年 5 月 25-27 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/physio2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河尾 直之 (KAWAO NAOYUKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70388510

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：