

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460991

研究課題名(和文)超音波マイクロバブルを用いた劇症肝炎の新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Exploitation of a novel therapy for fulminant hepatitis using microbubbles for contrast enhancement ultrasound

研究代表者

峯村 正実 (Minemura, Masami)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号：10313602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：劇症肝炎の発症における肝マクロファージの役割を解明し、新規治療の開発に繋げるため、P. acnes/LPSによるマウス劇症肝炎モデルを作成し、超音波造影剤(Sonazoid)を用いてKupffer相の画像化を行い、肝組織におけるマクロファージの分布と比較検討した。肝マクロファージ数はコントロール群に比べ劇症肝炎群で著しく増加していたが、Kupffer相イメージにおけるエコー輝度の上昇は比較的軽度であり、乖離が見られた。本研究により超音波造影剤が急性肝障害における非侵襲的な病態把握のツールとしての有用性が示唆されたが、肝血流の変化やマクロファージの貪食能の変化などの複合的な解釈が必要である。

研究成果の概要(英文)：To clarify the importance of liver macrophages (Kupffer cells) in pathogenesis of fulminant hepatitis and to find a new therapeutic approach, we used a mouse fulminant hepatitis model induced by Propionibacterium acnes (P. acnes) and lipopolysaccharide (LPS) and visualized dynamics of liver macrophages using contrast enhanced ultrasonography with microbubble-based contrast agent (Sonazoid). We compared the changes of Sonazoid-enhanced echogenicity with the histological distribution of macrophages. While the number of liver macrophages was extremely increased in the fulminant hepatitis group compared to the control group, the echogenicity in Kupffer-phase image was slightly increased in the fulminant hepatitis group. This study shows the possibility that the microbubble agent is a non-invasive useful tool for detecting dynamics of macrophages during acute liver injury, but the consideration is needed for changes of liver blood flow and macrophage phagocytic activity at the same time.

研究分野：消化器疾患

キーワード：劇症肝炎 肝マクロファージ 超音波造影剤

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎に代表される急性肝不全は今もなおその病態が十分に解明されておらず、致死率の非常に高い難病である。その病態において過剰な免疫反応状態(樹状細胞やマクロファージ系細胞の異常活性化)が重要と考えられている。我々は今まで劇症肝炎モデルに可溶性の免疫チェックポイント分子(CALA-4Ig)を投与し、肝障害の抑制の可能性を報告してきたが(Nakayama *et al.* Hepatology 2005;42:915-924)、病態の解明に繋がるリアルタイムでの画像化や新規治療法の開発は遅れている。

一方、臨床応用されている超音波造影剤(マイクロバブル製剤)はリアルタイムの肝臓の画像診断に有用であるだけでなく、外殻の組成の工夫により肝臓のマクロファージ(Kupffer細胞)に特異的に薬剤をデリバリーできる可能性があり、肝臓の画像化だけでなく、新たな治療戦略のツールになることが期待されている。

2. 研究の目的

劇症肝炎の発症と病態における肝マクロファージの役割を明らかにすることを目的とし、*Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) / lipopolysaccharide (LPS) 投与によるマウス劇症肝炎モデルを用い、超音波造影剤によるハーモニックイメージング法により、肝障害における肝血流および肝マクロファージの動態をリアルタイムで画像化する。

それに加え、マウス劇症肝炎モデルに使用される細菌(*P. acnes*)およびLPSによるマクロファージの活性化に関連する遺伝子群の変化を網羅的に解析することにより、肝障害におけるマクロファージの機能を明らかにし、新たな治療に繋がるストラテジーを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ活性化における遺伝子発現の検討

肝障害の発症機序にはパターン認識受容体(PRRs)を介した腸内細菌由来の物質が関係している可能性が高く、マウス劇症肝炎モデルに使用される細菌(*P. acnes*)およびLPSのマクロファージへの影響を *in vitro* で検討した。培養マウスマクロファージ細胞株(RAW264.7)に加熱処理した *P. acnes* を単独あるいはLPSと同時に添加し、細菌反応遺伝子群(84 genes)の発現を簡易 cDNA array を用いて解析した。また、グラム陰性菌である大腸菌(*E. coli*)についても、同様に検討した。

さらに、主要な炎症性サイトカイン(TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12b, IL-18)と Toll-like receptor 関連遺伝子(TLR2, TLR4, CD14)については、*P. acnes* および LPS の濃度を変えて投与し、RT-PCR によりその発現を

定量的に測定し、相互作用を詳細に検討した。

(2) *P. acnes*/LPS 劇症肝炎モデルにおける肝マクロファージの動態の検討

C57BL/6 マウス(雌、8週齢)に1mgの *P. acnes* を尾静脈から投与し、7日後に1 μ gのLPSを投与して肝障害を惹起した。LPS投与6時間後、麻酔下に超音波造影剤(Sonazoid)4 μ lを尾静脈から投与し、超音波断層装置(HI VISION Ascendus, 日立メディコ)を用いたハーモニックイメージング法で肝臓の早期相ならびにKupffer相イメージを撮像した。超音波造影剤の投与前、投与直後、投与15分後における肝臓のエコー輝度を測定し、*P. acnes*/LPSを投与していないコントロール群と比較した。

超音波画像を撮像後、マウスの血清と肝組織を採取し、血清ALT値を測定し、肝障害の程度を組織学的に確認した。さらに、抗F4/80抗体を用いて肝組織のマクロファージの分布と数を免疫組織学的に同定した。また、ハーモニックイメージング法で撮像したKupffer相イメージのエコー輝度を数値化し、肝組織のマクロファージの数ならび分布と比較検討した。

4. 研究成果

(1) *P. acnes* および LPS によるマクロファージの遺伝子発現の変化

細菌反応遺伝子群(84 genes)の中で、*P. acnes* 投与で12 genes (Receptor-interacting serine-threonine kinase 2 (RIPK2), CXCL3, IL1 β , IL-12b, IL-6, 他)、LPS投与で22 genes (RIPK2, IL-1 β , IL-12b, CXCL3, IL-6, 他)が2倍以上に発現が亢進し、併用投与によりさらに6 genes (CXCL5, IRF7, IFN- β 1, ZBP1, IL-18, IL-12a)の発現が *P. acnes* 単独投与に比べ、4倍以上に増強された(図1、図2)。

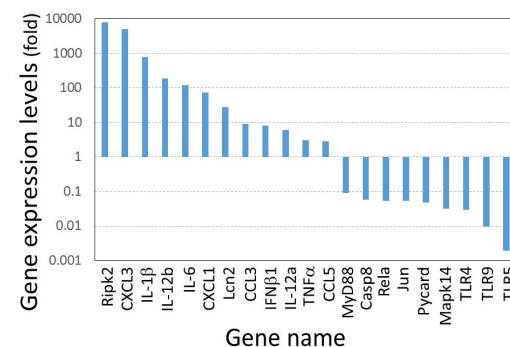


図1. *P. acnes* による主な細菌反応遺伝子群の発現の変化

グラム陽性菌である *P. acnes* でも LPS と同様に、NF- κ B の活性化を誘導する RIPK2 の発現が著しく増加していたが、TLR による細胞内シグナル伝達に重要な Myeloid differentiation primary response gene 88

(MyD88)の発現は抑制されていた。また、グラム陰性桿菌である *E. coli* でも多くの細菌反応遺伝子群の発現の増強を認めたが、LPS 単独投与とはほぼ同様の遺伝子発現プロファイルを示し、LPS の併用にて有意な発現の変化は認めなかった。

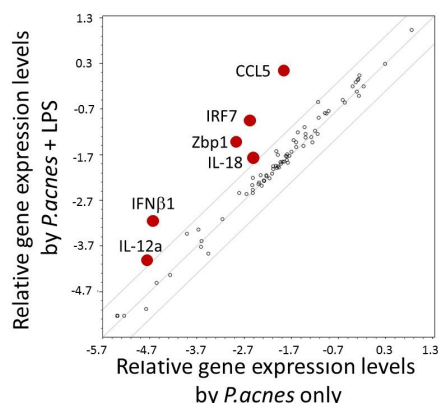


図2 . *P. acnes* 単独および LPS 併用投与による細菌反応遺伝子群の発現の変化

RT-PCR による定量的な検討では、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12b の発現が *P. acnes* および LPS の濃度依存的に増加し、LPS の併用で TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18 の発現が有意に上昇した。また、*P. acnes* により TLR2 および CD14 の発現は軽度増加傾向にあったが、TLR4 の発現は抑制されていた。

P. acnes/LPS 劇症肝炎の発症機序として、*P. acnes* TLR2(9) MyD88 NF- κ B IL-12 および LPS TLR4 TRIF NLRP3 IL-18 の経路が重要と報告されているが、今回の検討では MyD88 の発現は抑制されており、RIPK2 が NF- κ B の活性化を通して重要な働きをしている可能性が示唆された。

(2) *P. acnes*/LPS 劇症肝炎モデルにおける肝マクロファージの動態の検討

C57BL/6 マウスに *P. acnes* および LPS 投与により肝障害モデルを作成し、LPS 投与 6 時間後に麻酔下で超音波造影剤 (Sonazoid) を投与して 15 分後の Kupffer 相イメージを撮像した。一定のゲインで撮像した肝画像のエコー輝度を数値化し、比較検討した。肝障害群ではエコー輝度が 74.1 ± 31.4 (mean \pm SD) とコントロール群 34.2 ± 14.9 に比べやや高い傾向にあった。

肝障害群では有意な血清 ALT 値の上昇が認められ (肝障害群 682.5 ± 238.9 IU/L、コントロール群 64.4 ± 29.0 IU/L)、肝組織では複数の肉芽腫と炎症細胞の浸潤、出血、肝細胞の壊死を認めた。

抗 F4/80 抗体でマクロファージを免疫染色し、肝内マクロファージの数と分布を検討した。肝マクロファージ数は、コントロール群で $33.4 \pm 15.2/0.1\text{mm}^2$ 、肝障害群で $123.6 \pm 25.5/0.1\text{mm}^2$ と有意に増加していた ($p <$

0.05)。肝組織のマクロファージ数の著しい増加に比べ、Kupffer 相イメージのエコー輝度の変化は比較的軽微であった。

今回の実験では、急性肝障害の小動物モデルにおいても超音波造影剤によるリアルタイムでの早期相 (血流動態) や Kupffer 相の画像化が可能であることが示され、急性肝障害における非侵襲的な病態把握のツールとしての有用性が示唆された。

一方、肝マクロファージの数と Kupffer 相イメージの輝度とは乖離があり、活性化したマクロファージの貪食能の低下や肝障害による血流障害など多くの因子が画像化に影響する可能性があり、その解釈や応用には十分な注意が必要であると考えられる。

今回用いた超音波造影剤はマクロファージの数的な変化とその貪食能などの機能を総合的に評価するには適しているが、肝障害時におけるドックデリバリーツールとしては限界があり、マクロファージ特異的な抗体分子を結合させたバブルリポソームなどの応用が今後期待される。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

峯村正実、田尻和人、河合健吾、高木宏明、安村敏、高原照美、杉山敏郎、マクロファージと細菌の相互作用の検討、第 52 回日本肝臓学会総会、2016 年 5 月 19 日、東京ベイ幕張ホール (千葉県)

Minemura M, Tajiri K, Kawai K, Baba H, Nagata K, Takagi H, Yasumura S, Takahara T, Sugiyama T. Analysis of the direct interaction between macrophages and microbiota. The 25th Annual Conference of Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), 2016.2.23, Tokyo (Japan)

[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

峯村 正実 (MINEMURA, Masami)

富山大学・附属病院・講師

研究者番号: 10313602

(2)研究分担者

杉山 敏郎 (SUGIYAMA, Toshiro)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・
教授

研究者番号： 00196768