

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461013

研究課題名(和文) 組織修復マクロファージに発現する新規分子Gpnmbの肝癌の発育・進展に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of Gpnmb expressed in macrophages on repair of injured liver and hepatocarcinogenesis

研究代表者

井戸 章雄 (Ido, Akio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30291545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：傷害肝および肝発癌におけるGlycoprotein nonmetastatic melanoma B (Gpnmb)陽性マクロファージの役割を検討した。四塩化炭素急性肝障害モデルの肝臓に浸潤するGpnmb陽性マクロファージは高い貪食能を有し、Gpnmbを欠損させると貪食で誘導されるTGF-betaおよびMMP13分泌が抑制され、線維化が抑制された。また、傷害肝に誘導される移植肝癌結節の周囲にはGpnmb陽性マクロファージが浸潤しVEGFを発現していた。Gpnmb陽性マクロファージは肝障害の修復過程において線維形成と溶解に関与して傷害肝の再生・修復及び肝癌の進展に重要な役割を果たしている。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the characteristics of infiltrating macrophages that express Glycoprotein nonmetastatic melanoma B (Gpnmb), and the involvement of Gpnmb in the repair process in response to liver injury. Gpnmb expression in the liver was stimulated four days after CCl4 injection. Gpnmb-positive cells were almost positive for CD68-positive macrophages, contained engulfed apoptotic bodies and exhibited enhanced phagocytic activity. Isolated infiltrating hepatic macrophages transfected with siGpnmb showed high MMP-13 secretion. Hepatic MMP-13 expression, as well as  $\alpha$ -SMA expression and collagen production, decreased significantly in mice lacking Gpnmb. Additionally, Gpnmb-positive macrophage infiltrated around inoculated hepatoma nodules. These results indicated that Gpnmb-positive macrophages contribute to the balance between fibrosis and fibrolysis in the repair process, and also play an important role in development of hepatocellular carcinoma.

研究分野：消化器内科学

キーワード：急性冠不全 マクロファージ 組織修復 肝再生 肝線維化 炎症生発癌

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は慢性肝炎や肝硬変を背景に発生し、慢性炎症と密接に関連（炎症性発癌）している。我々は、肝硬変から肝細胞癌が発生する肝癌モデルラット（コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット）の肝臓で肝発癌以前の線維化進展時期に発現亢進する遺伝子群から、Glycoprotein nonmetastatic melanoma B (Gpnmb) 遺伝子を単離し、Gpnmb 発現増強が肝線維化を抑制することを報告した。さらに Gpnmb は傷害肝に浸潤するマクロファージに発現していた。しかし、Gpnmb 陽性マクロファージが傷害肝の再生・修復過程においてどのような役割を果たしているかについては未だ明らかにされていない。一方、正常マウスの脾臓に syngeneic な肝癌細胞株を接種して作成した肝癌モデルでは肝癌結節周囲に Gpnmb 陽性マクロファージが浸潤することも見出しているが、傷害肝の再生・修復の微小環境およびその過程に浸潤する Gpnmb 陽性マクロファージが肝発がんとその発育・進展に及ぼす影響は未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、急性肝障害モデルを用いて、(1) 傷害肝の再生・修復過程におけるマクロファージの役割の詳細を、特に Gpnmb 陽性マクロファージに着目して明らかにすること、また (2) 傷害肝の修復過程に肝癌細胞を接種し、肝癌結節周囲に浸潤するマクロファージの性質および肝癌の発育・進展に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) 8 週齢の C57BL/6 マウスまたは Gpnmb 変異マウスに四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 1 ml/kg を単回投与し、下記を経時的に解析した。
  - 1) 血清 ALT 値
  - 2) 組織学的所見

- 3) 肝組織中サイトカイン
  - 4) 線維化関連分子の発現
  - 5) Gpnmb の発現および局在
- (2) 肝障害モデル肝組織からマクロファージを単離し、下記を解析した。
    - 1) 細胞表面マーカー
    - 2) 貪食能
    - 3) 線維化関連分子の発現
  - (3) CCl<sub>4</sub> 投与 2 日後にマウス肝癌細胞 Hepa 1-6 を脾臓に接種し、下記を解析した。
    - 1) 肝癌結節の発生
    - 2) 免疫組織染色

## 4. 研究成果

本研究で以下の知見が明らかにされた。

- (1) CCl<sub>4</sub> 投与後 2 日目に血清 ALT 値、肝組織の障害範囲は最大となり、4 日目には血清 ALT 値は改善し、肝障害部位周囲にはマクロファージが著明に浸潤し、障害範囲も縮小していた。
- (2) CCl<sub>4</sub> 投与 2 日後にクロドロネートを腹腔内投与してマクロファージを欠損させると、肝障害が遷延化し（図 1）体重の減少を生存率の低下がみられた。

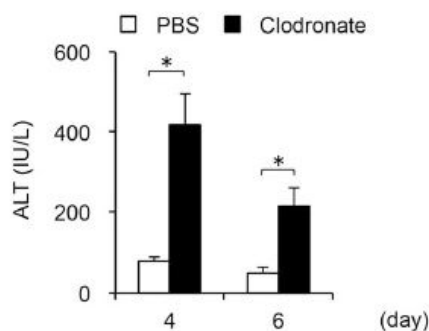


図 1 マクロファージの欠損によって、肝障害が遷延化した

さらに肝組織における TGF- $\beta$ 、Col1a1、MMP-9、MMP-13 発現が有意に低下し、星細胞の活性化および線維形成が抑制された（図 2）。

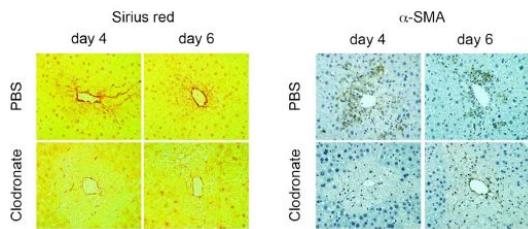


図2 マクロファージを欠損させると、肝線維化および星細胞の活性化が抑制された。

- (3) CCl<sub>4</sub> 投与4日目および6日目に Gpnmb 発現が増強し、Gpnmb 発現は全て CD68 陽性マクロファージに認められた(図3)。

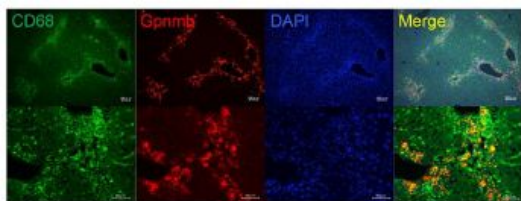


図3 Gpnmb 陽性マクロファージは CD68 陽性であった。

- (4) CD68 陽性マクロファージは CD11b 陽性に比して高い貪食能を有し、CD68 陽性/Gpnmb 陽性マクロファージは CD68 陽性/Gpnmb 陰性マクロファージに比してより高い貪食能を呈していた(図4)。

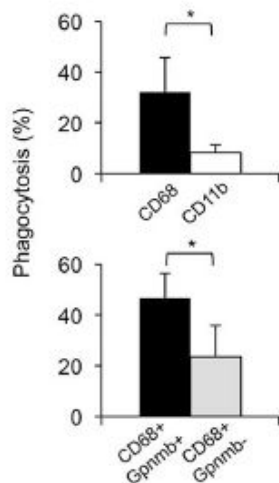


図4 Gpnmb 陽性マクロファージは高い貪食能を有していた。

- (5) Gpnmb 変異マウスは野生型マウスに比して肝障害の程度には差を認めなかった

が、活性化星細胞および線維形成が抑制され、MMP-9 および MMP-13 発現も有意に低下した(図5)。

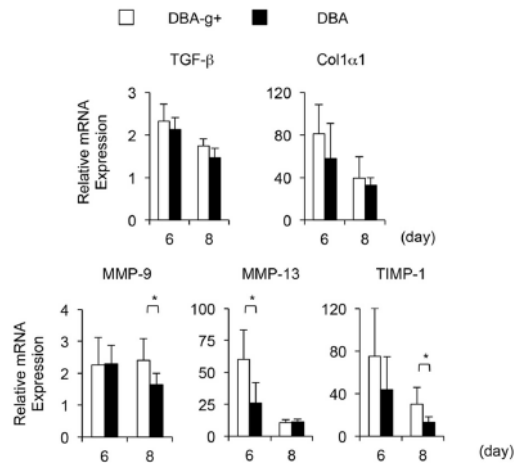


図5 Gpnmb 欠損マウス肝では MMP-9 および MMP-13 の発現が低下していた。

- (6) 単離肝マクロファージは死肝細胞の貪食によって TGF-β および MMP-13 の分泌が促進された。さらに肝マクロファージに siRNA を導入して Gpnmb 発現を抑制すると、MMP-13 の分泌が抑制された(図6)。

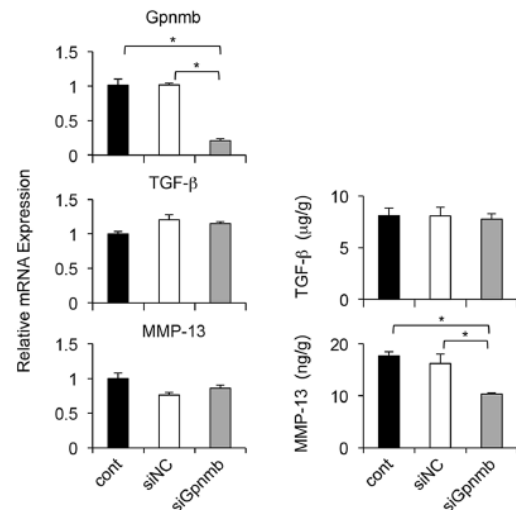


図6 Gpnmb 発現を抑制すると、MMP-13 の分泌が抑制された。

- (7) CCl<sub>4</sub> 単回投与2日後に脾臓に Hepa 1-6 細胞を接種すると、肝障害マウスでは優位に肝癌結節が生着した。

- (8) 傷害肝に生着した肝癌結節周囲には Gpnmb 陽性マクロファージが浸潤し、血

管内皮増殖因子(VEGF)を発現していた。  
(9) CCl<sub>4</sub> 単回投与2日後に脾臓に Hepa 1-6 細胞を接種し、中和抗体である抗 VEGF 抗体を反復投与したが、肝癌結節の発生数に変化はみられなかった。

本研究では CCl<sub>4</sub> 急性肝障害モデルにおいて、その修復期に浸潤する CD68 陽性マクロファージが高い貪食能を有し、傷害肝組織の再生・修復に重要な役割を果たしていることが考えられた。一方、Gpnmb は CD68 陽性マクロファージに発現しており、Gpnmb 陽性/CD68 陽性マクロファージは Gpnmb 陰性/CD68 陽性マクロファージよりも高い貪食能を有し、星細胞の活性化、線維形成に加えて MMP-13 分泌にも関与していた。以上の結果から、Gpnmb 陽性マクロファージは肝障害の修復過程において線維形成と溶解の両者に関与して傷害肝の再生・修復過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、傷害肝の再生・修復過程の微小環境は肝癌結節の生着および増大を促進し、肝癌結節周囲に浸潤したマクロファージには VEGF が発現していた。マクロファージから産生される VEGF は傷害組織の再生・修復に大きく関与していることが推測されるが、併せて肝癌結節の生着、発育にも促進的な作用していることが推測された。この仮定を証明するために、抗 VEGF 中和抗体を投与したが、肝癌結節の生着に及ぼす影響は明らかではなかった。今後、肝癌結節周囲に浸潤マクロファージの肝癌結節に及ぼす影響については、本研究で明らかとなった Gpnmb 陽性マクロファージの線維形成・吸収における役割の観点からもさらに検討を重ねる必要があると考えられた。

本研究の成果は、これまで肝実質細胞(肝細胞)に関する研究が主体であった肝再生研究において、肝非実質細胞であるマクロファージに着目して肝再生および肝再生不全の分

子機構の一端を明らかにしたもので、急性肝不全に対する新規治療法開発の分子基盤の確立につながることも期待される。

## 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1件)

1. Kumagai K, Tabu K, Sasaki F, Takami Y, Morinaga Y, Mawatari S, Hashimoto S, Tanoue S, Kanmura S, Tamai T, Moriuchi A, Uto H, Tsubouchi H, Ido A. Glycoprotein nonmetastatic melanoma B (Gpnmb)-positive macrophages contribute to the balance between fibrosis and fibrolysis during the repair of acute liver injury. PLOS One. 2015;10:e0143413. (査読有り)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井戸 章雄 (Ido, Akio)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：30291545

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

