

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461932

研究課題名(和文)急性肝不全における肥満細胞セリンプロテアーゼ(キマーゼ)の役割

研究課題名(英文)Role of mast cell serine protease (chymase) on acute liver failure

研究代表者

廣川 文鋭 (HIROKAWA, Fumitoshi)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：20322373

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)：マウス急性肝不全モデルを用いて肥満細胞セリンプロテアーゼ(キマーゼ)の役割を検討した。リポポリサッカライド(LPS)とD-ガラクトサミン(D-Gln)(LPS+Galn)の投与直後に肝臓のキマーゼ活性が増加した。LPS+Galn投与7時間後にMMP-9、TNF- α 、MPOは増加したが、LPS+Galn投与1時間後のキマーゼ阻害薬投与でこれらは有意に低下し、生存率の有意な増加に繋がった。キマーゼは急性肝不全の発症において重要な役割を担い、その阻害薬は急性肝不全を予防した。

研究成果の概要(英文)：The role of mast cell serine protease (chymase) was investigated in a mouse acute liver failure model. Hepatic chymase activity was significantly increased just after lipopolysaccharide/D-galactosamine (LPS+Galn) injection. Seven hours after LPS+Galn injection, MMP-9, TNF- α and MPO were increased, but they were significantly suppressed by treatment with chymase inhibitor 1 hour after LPS+Galn injection, resulting in the increase of survival rate after LPS+Galn injection. Chymase plays an important role in the development of acute liver failure, and chymase inhibitor prevented the acute liver failure.

研究分野：一般・消化器外科学

キーワード：急性肝不全 キマーゼ MMP 阻害薬 肥満細胞 マウス

1. 研究開始当初の背景

未だ救命率の低い急性肝不全の病態は不明であるが、急性肝不全の動物モデルではマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -9 の関与が指摘されていた。キマーゼはその MMP-9 を活性化する酵素として知られており、プレリミナリーな急性肝不全モデルの解析で MMP-9 と共にキマーゼも亢進してくることを確認していた。しかし、急性肝不全におけるキマーゼの役割は不明であった。

2. 研究の目的

急性肝不全モデルをマウスで作製し、急性肝不全におけるキマーゼの役割を明らかにすると共にキマーゼ阻害薬の効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(急性肝不全モデルの解析)

6 週齢の雄性マウス (C57Black/J: 日本エスエルシーより購入) にリポポリサッカライド (LPS) の 4 µg/kg と D-ガラクトサミン (D-GalN) の 600 mg/kg を腹腔内に投与することで急性肝不全モデルを作製した LPS + D-GalN 投与後 1、3、7 時間の時点で血液および肝臓組織を解析してキマーゼおよびその関連因子と肝炎症関連因子を解析した。

(薬物投与方法)

キマーゼ阻害薬の影響を検討するために、特異的キマーゼ阻害薬 (TY-51469: トーアエイヨーより提供) の 10 mg/kg を LPS/D-GalN 腹腔内投与後 1 時間の時点で尾静脈より投与した。

(血漿および肝臓)

採血後、冷蔵遠心機を用いて 4 度、3,000 回転にて 15 分間遠心して血漿を採取し、AST および ALT を測定用として使用するまで 30 度で冷凍保存した。

肝臓組織の一部は、キマーゼ活性、MMP-9 活性、TNF-α の測定用に摘出直後に液体窒素にて冷凍し、-80 度のディープフリーザーにて保存した。また、別途、肝臓の一部をキマーゼ、MMP-9、Tumor Necrosis factor (TNF) -α、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の遺伝子発現量を測定用に摘出直後に液体窒素にて冷凍し、-80 度のディープフリーザーにて保存した。

肝臓組織切片を用いて組織学的解析を行うため、肝臓の一部を摘出したのち速やかにカルノア固定液に浸漬した状態で 24 時間室温にて放置した。その後、エタノールで置換した組織を用いてパラフィンブロックを作製した。

(生化学的解析)

血漿中の AST および ALT の測定はエスアールエルに依頼した。

肝臓組織の抽出液は、肝臓組織に対して 10

倍量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) にてホモジネートしたのち冷蔵遠心機を用いて 4 度、10,000 回転にて 30 分間遠心した。その上清液を TNF-α の濃度測定用に用いた。一方、沈殿物は 0.1% Nonidet™ P-40 と 2 M 塩化カリウムを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて再度ホモジネートした。その後、冷蔵遠心機を用いて 4 度、10,000 回転にて 30 分間遠心し、その上清液を用いてキマーゼ活性と MMP-9 活性の測定に用いた。

TNF-α の濃度測定は、肝臓組織抽出液を用いて TNF-α 測定用 ELISA キット (R&D 社) にてマニュアルに従って実施した。

キマーゼ活性は、肝臓組織抽出液と Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-pNA (最終濃度: 2 mM) を含有する 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) と 37 度で 30 分間インキュベートしたのち 3% メタリン酸で反応を停止させた。その反応液を 4 度、10,000 回転にて 30 分間遠心し、その上清液 405 nm にて測定した。

MMP-9 活性は、肝臓組織抽出液を MMP-9 の德的抗体 (R&D 社) でコーティングした 96 穴プレートに添加し、洗浄後に MMP 活性測定用の合成基質である QXL520TM-²-Abu-Pro-Cha-Abu-Smc-His-Ala-Dab(5-FAM)-Ala-Lys-NH₂ (AnaSpec Inc) を用いて 37 度で 30 分間インキュベートしたのち定量した。

肝臓組織中の遺伝子発現量を定量するため、肝臓組織を TRIzol (Life technologies) を用いてホモジネートし、組織中より mRNA を抽出した。次に SuperScript VIL0 (Life technologies) を用いて mRNA から cDNA を作製した。キマーゼ、MMP-9、TNF-α、MPO、18S ribosomal RNA (18S rRNA) のプライマーおよびプライマーはロシュ・ダイアグノスティクスにより設計した。TaqMan 法にてリアルタイム PCR (Stratagene Mx3000P) を行った。各遺伝子の発現量は 18S rRNA を用いて補正した。

(組織学的解析)

肝臓組織をカルノア固定して作製したパラフィンブロックより 5 µm の切片を作製し、肥満細胞の確認をするためにトルイジン・ブルー染色を行い、赤紫色に染色された細胞を肥満細胞とした。また、抗マウス MPO 抗体 (Abcam Inc.) を一次抗体として Dako LSAB キット (Dako Co.) を用いて MPO の免疫染色を行った。そして、肝臓組織面積あたりの MPO 発現細胞数を定量した。

4. 研究成果

(マウス急性肝炎モデル)

LPS+D-GalN 投与前 (Pre) と LPS+D-GalN 投与後 1、3、7 時間の時点における血漿中の AST および ALT を図 1 に示す。LPS+D-GalN 投与後 1 時間および 3 時間の時点では LPS+D-GalN 投与前の AST および ALT と有意な差はなかったが、LPS+D-GalN 投与後 7 時間において、AST および ALT は共に著しく上昇した。

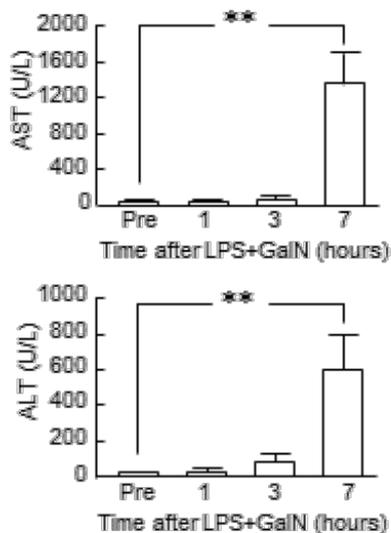


図 1. 血漿中の AST および ALT の経時的変化 (**P<0.01)

肝臓組織中のキマーゼ活性およびキマーゼにより活性化される MMP-9 活性の LPS+D-GalN 投与前 (Pre) と LPS+D-GalN 投与後 1、3、7 時間の時点の結果を図 2 に示す。

キマーゼ活性は LPS+D-GalN 投与後 1 時間後に著しい増加を認めて投与後 3 時間には低下するが、投与後 7 時間では再度増加した。

MMP-9 活性も LPS+D-GalN 投与後 1 時間後に著しい増加を認めて投与後 3 時間には低下するが、投与後 7 時間では再度増加した。

これらの結果は、LPS+D-GalN 投与後直後より肝臓組織中のキマーゼ活性および MMP-9 活性が著明に増加し、7 時間後に再度増加する二相性があることが判明した。

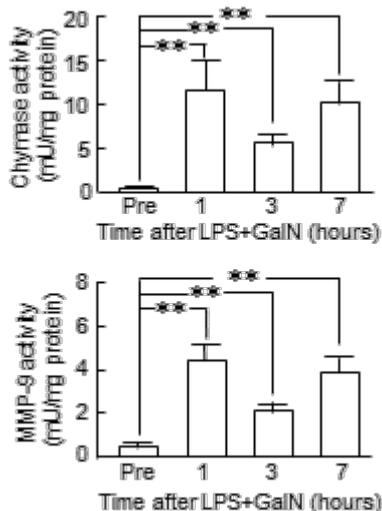


図 2 肝臓組織中のキマーゼ活性と MMP-9 活性の経時的変化 (**P<0.01)

肝臓組織中の TNF- α 濃度の LPS+D-GalN 投与前 (Pre) と LPS+D-GalN 投与後 1、3、7 時間の時点の結果を図 3 に示す。

TNF- α 濃度は LPS+D-GalN 投与後 1 時間後には著増し、投与後 3 時間では低下し、投与後 7 時間において再上昇した。TNF- α は炎症

を惹起することより LPS+D-GalN 投与直後に強力な炎症が惹起されたのち一旦低下して再度炎症が増強されることが示唆された。

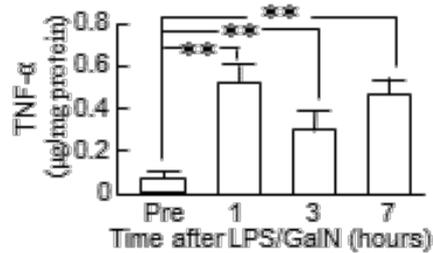


図 3 肝臓組織中 TNF- α 濃度の経時的変化 (**P<0.01)

肝臓組織中のキマーゼ、MMP-9、TNF- α 、MPO の遺伝子発現量の LPS+D-GalN 投与前 (Pre) と LPS+D-GalN 投与後 1、3、7 時間の時点の結果を図 4 に示す。

キマーゼ、MMP-9 および MPO の遺伝子発現量は、LPS+D-GalN 投与後 3 時間までは有意な変化を認めず、LPS+D-GalN 投与後 7 時間において有意な著しい上昇を認めた。一方、TNF- α の遺伝子発現量は LPS+D-GalN 投与後 1 時間後に著しい増加を認めて投与後 3 時間には低下するが、投与後 7 時間では再度増加した。

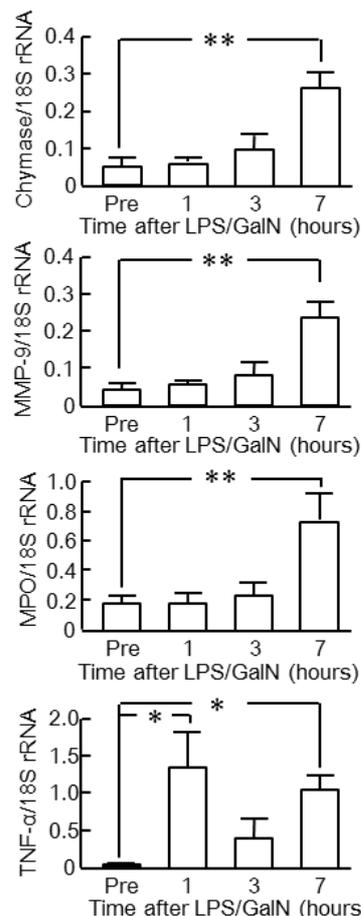


図 4 肝臓組織中のキマーゼおよび炎症関連因子の遺伝子発現量の経時的変化 (*P<0.05, **P<0.01)

(キマーゼ阻害薬による影響)

LPS+D-GalN 投与後1時間の時点でキマーゼ阻害薬を投与して LPS+D-GalN 投与後7時間後の時点の肝臓組織中のキマーゼ活性と MMP-9 活性に対する影響を図5に示す。

キマーゼ活性と MMP-9 活性は LPS+D-GalN 投与後1時間において著増した後 LPS+D-GalN 投与後7時間の時点で再度上昇してきたが、キマーゼ阻害薬(10 mg/kg TY-51469 を尾静脈内投与)により LPS+D-GalN 投与後1時間に静脈投与したことで二次的に上昇する LPS+D-GalN 投与後7時間のキマーゼ活性とキマーゼにより活性化される MMP-9 活性が共に有意に抑制された。

この結果は、キマーゼ活性が二次的に上昇する MMP-9 活性に関与していることを示唆した。

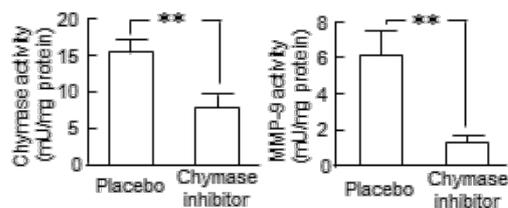


図5 肝臓組織中のキマーゼ活性および MMP-9 活性に対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01 vs. Placebo)

TNF- α は LPS+D-GalN 投与後1時間と7時間で二相性に上昇したが、LPS+D-GalN 投与後1時間の時点でキマーゼ阻害薬を投与したことで LPS+D-GalN 投与後7時間に増加する TNF- α を有意に抑制できた(図6)。

キマーゼ阻害薬により二相目に上昇する炎症惹起因子の TNF- α を抑制できることが確認できた。

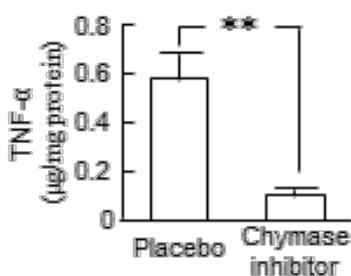


図6 肝臓組織中 TNF- α 濃度に対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01 vs. Placebo)

LPS+D-GalN 投与後7時間の時点における肝臓組織中のキマーゼ、MMP-9、TNF- α 、MPO の遺伝子発現に対するキマーゼ阻害薬による影響を図7に示す。

キマーゼ阻害薬はキマーゼ活性のみならず LPS+D-GalN 投与後7時間に増加するキマーゼの遺伝子発現も有意に抑制した。その理由としてキマーゼの肥満細胞分化における役割が影響したと考える。キマーゼは骨髄で産生されるキマーゼ非含有の未熟肥満細胞

を組織でキマーゼ含有成熟肥満細胞へ分化させる。そのため、キマーゼ阻害薬によりキマーゼの発現細胞の肥満細胞の分化が抑制された場合、キマーゼの遺伝子発現量が肥満細胞の発現減少に伴って低下したと考えられた。事実、Placebo 群で著明に増加した肥満細胞がキマーゼそがい薬により減少していた。

MMP-9、TNF- α 、MPO の肝臓組織中の遺伝子発現量はキマーゼ阻害薬によってすべて有意に抑制された。このことは LPS+D-GalN 投与後7時間に著明に増加する炎症関連因子の遺伝子発現量を LPS+D-GalN 投与後1時間の時点でキマーゼ阻害薬を投与することにより強力に抑制できたことより、キマーゼ阻害薬は炎症惹起因子の増加後であっても早期に静脈内投与することで二次的に増加する炎症関連因子を抑制できることを示唆する。

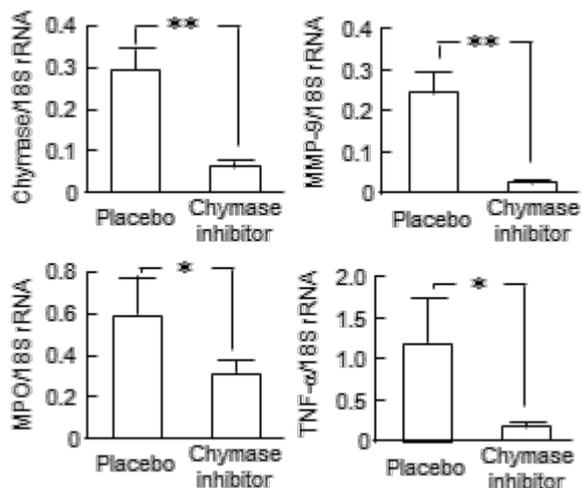


図7 肝臓組織中のキマーゼおよび炎症関連因子の遺伝子発現量に対するキマーゼ阻害薬の影響 (*P<0.05, **P<0.01 vs. Placebo)

LPS+D-GalN 投与後7時間に摘出した肝臓組織切片を用いた組織学的解析の結果、MPO 陽性細胞数に対してキマーゼ阻害薬は有意な抑制を示した(図8)。

MPO は好中球のマーカーとして知られていることより、キマーゼ阻害薬は LPS+D-GalN 投与後7時間に集積する好中球を強く抑制することが判明した。

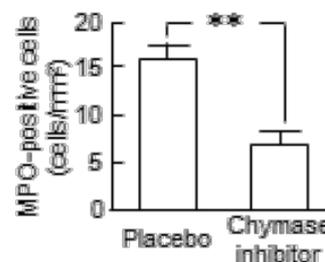


図8 肝臓組織中の MPO 陽性細胞数 (**P<0.01 vs. Placebo)

血漿中のASTとALTはLPS+D-GaIn投与後7時間の時点になると急激に上昇したが、キマーゼ阻害薬はその上昇を強力に抑制した(図9)。

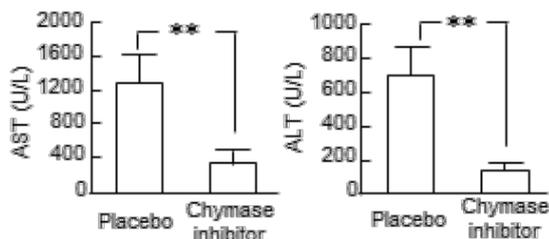


図9 血漿中のASTおよびALTに対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01)

LPS+D-GaIn投与後8時間よりPlacebo群およびキマーゼ阻害薬群、共に死亡するマウスがあったが、LPS+D-GaIn投与後24時間における生存率はキマーゼ阻害薬群の方が有意に高かった。

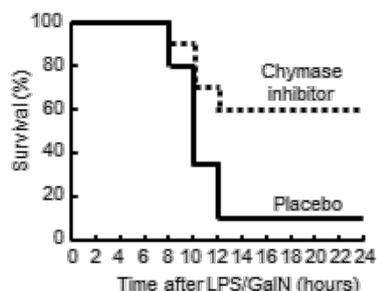


図10 生存率に対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01 vs. Placebo)

以上の結果より、マウス急性肝不全モデルにおいてLPS+D-GaIn投与直後より肝臓組織中のキマーゼ活性と炎症惹起に關与するTNF- α が亢進した。一方、キマーゼ遺伝子発現量はLPS+D-GaIn投与後7時間の時点からの上昇であった。その理由としてはLPS+D-GaInが誘導したTNF- α が炎症を惹起したことでキマーゼが活性化されたと考えられた。一方、LPS+D-GaIn投与後7時間におけるキマーゼの遺伝子発現量の増加は、LPS+D-GaIn投与直後に活性化されたキマーゼが二次的に肥満細胞数の増加を促進し、肥満細胞で発現するキマーゼの遺伝子発現量を結果として増加させたと考えられた。事実、キマーゼ阻害薬投与によりLPS+D-GaIn投与後7時間の時点におけるキマーゼの遺伝子発現量は有意に抑制された。

キマーゼ阻害薬をLPS+D-GaIn投与後1時間の時点で投与することでLPS+D-GaIn投与7時間後に二次的に増加する炎症関連因子(MMP-9、TNF- α 、MPO)の遺伝子発現量を抑制し、結果として生存率の有意な上昇に繋がった。これらのことより、キマーゼ阻害薬は急性肝不全の症状増悪に重要な役割を持ち、キマーゼ阻害薬が急性肝不全の発症予防に有効であることが示された。

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 1件)

Osumi W, Jin D, Imai Y, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Maemura K, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. Recombinant human soluble thrombomodulin improved lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure in mice. J Pharmacol Sci (査読有) 129, 2015, 233-239

〔学会発表〕(計 1件)

Osumi W, Jin D, Imai Y, Miyaoka Y, Tashiro K, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Nishiguchi K, Uchiyama K. Effect of recombinant human soluble thrombomodulin in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure in mice. Digestive Disease Week 2016, May 23, 2016. Chicago (USA)

〔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

廣川 文鋭 (HIROKAWA Fumitoshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号: 20322373

(2) 研究分担者

内山 和久 (UCHIYAMA Kazuhisa)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号: 80232867

高井 真司 (TAKAI Shinji)

大阪医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80288703

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()