

令和元年6月26日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10177

研究課題名(和文)肝虚血再灌流障害におけるGalectin-9の役割の解明

研究課題名(英文)The elucidation for the role of Galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury

研究代表者

内田 洋一郎 (UCHIDA, Yoichiro)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第1研究部・主任研究員

研究者番号：30597745

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)：Galectin-9は、好酸球の遊走因子として発見されたレクチンタンパクであり、check point分子の一つであるT-cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3)のligandである。CD4陽性T細胞の抑制効果や制御性T細胞の誘導などの作用がある。我々は、Galectin-9が肝虚血再灌流障害(Ischemia and Reperfusion Injury: IRI)に対して保護的に働き、再灌流後の肝障害を有意に抑制する事を国際学会誌(Liver Transplantation)に報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝虚血再灌流障害(IRI)は、肝臓外科領域における肝切除や肝移植の際に生じる回避できない事象であり、この予防・軽減は重要な課題である。様々な薬剤による研究がなされているが、いまだ決定的な治療薬は存在していない。Galectin-9はチェックポイント分子であるT-cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3)分子のligandであるが、TIM-3の作用は多様性である。今回我々は、肝IRIにおいてGalectin-9が保護的に働くことを解明した。IRI予防の治療薬開発という目的に加え、TIM-3分子の機能解明に迫ることができれば、その社会的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Galectin-9 is one of lectin proteins, identified as a migration factor of eosinophil, and also a ligand for T-cell Immunoglobulin Mucin-3 (TIM-3) which is one of check point molecules. Galectin-9 has a suppressive effect for CD4 positive T cells, and induces regulatory T cells. We found the protective function of Galectin-9 against liver ischemia and reperfusion injury, and proposed the possibility as a new therapeutic strategy by means of exogenous Gal-9 treatment. The results were reported in Liver Transplantation.

研究分野：消化器外科

キーワード：Galectin-9 肝虚血再灌流障害 クッパー細胞 TIM-3

1. 研究開始当初の背景

肝臓外科領域における肝切除術や肝移植では、虚血再灌流障害 (Ischemic Reperfusion Injury: IRI) の予防・軽減が安全かつ確実に手術を行うために必要となる。術中の一時的肝血行遮断 (プリングル法) は有用な出血軽減法であり、血行遮断およびその解除すなわち、虚血再灌流障害 (IRI) の回避は、患者負担軽減・肝不全回避・手術成績向上に対して必須の要件となる。また、脳死移植の分野では、臓器保存の観点からも IRI 対策は急務の課題である。本研究代表者は IRI のメカニズム及びその克服について一貫して研究継続している。米国を代表する IRI の研究開発施設であるカリフォルニア大学ロサンゼルス校 (UCLA) Dumont-UCLA Transplant Center において、肝 IRI の第一人者である Dr.Kupiec-Weglinski らと研究に従事し、IRI に関する研究成果を報告してきた。

自然免疫支配を受ける肝 IRI において、T 細胞上の T cell immunoglobulin mucin (TIM) family を介した免疫応答の相互作用により肝障害を制御することを解明した。その機序としては、TIM-1/TIM-4、そして TIM-3/galectin-9 (Gal-9: TIM-3 ligand) の相互作用による T 細胞における INF- γ の産生とマクロファージの活性化の制御であることを報告した (Uchida Y, et al. The emerging role of T cell immunoglobulin mucin-1 in the mechanism of liver ischemia and reperfusion injury in the mouse. *Hepatology*. 51:1363-1372, 2010, Uchida Y, et al. T-Cell Immunoglobulin Mucin-3 Dictates Severity of Liver Ischemia/Reperfusion Injury in Mice in a TLR4-Dependent Manner. *Gastroenterology*. 139:2195-2206, 2010)

また、Gal-9 は lectin family に属する protein であり、香川大学医学部免疫病理学 平島光臣元教授と本研究協力者である当研究所山内清明らが新規好酸球誘導因子として同定した。Gal-9 はマスト細胞やマクロファージが保有し、肝に豊富に存在し、TIM-3 陽性細胞の apoptosis 誘導により自己免疫反応を抑制、制御性 T 細胞の増加、Th2 cytokine へ抑制的に作用する働きがある。

2. 研究の目的

肝 IRI における Gal-9 と TIM-3 との interaction によって誘導される活性化 Th1 細胞の不活化の機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 野生型 (C57BL/6) マウスに肝 IR 刺激 (70% 部分肝、90 分虚血) を与え、Gal-9 の生体内での発現能を検討する。

(2) 野生型 (C57BL/6) マウスおよび Gal-9 ノックアウト (KO) マウスに肝 IR 刺激 (70% 部分肝、90 分虚血) を与え、肝障害度を評価する (血液検査・HE 染色)。さらに、安定型 recombinant Gal-9 製剤 (rGal-9) 投与群と非投与群における肝障害度の変動を検討する。

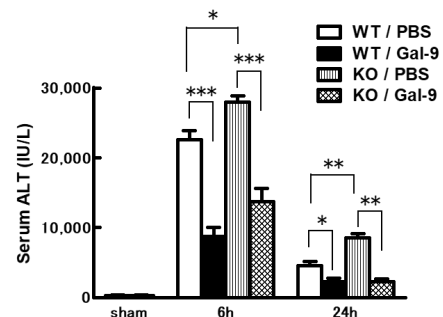
(3) 炎症性サイトカイン産生、アポトーシス誘導、組織浸潤など、RT-PCR・Western blotting・免疫染色により検討する。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスにおける肝組織内および血中 Gal-9 の発現は、IR 刺激により経時的に変化した。血中においては IR 後 1 時間で peak となり、肝組織中においては IR 後 6 時間で bottom となった。

(2) 野生型 (WT) マウスにおける IR 刺激による肝機能障害は、rGal-9 投与により有意に改善した。Gal-9 KO マウスでは野生型に比べて IR 刺激による肝機能障害は有意に増悪した。この増悪した肝障害は rGal-9 投与により有意に改善した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 6-8$ /group)。

(3) Gal-9 KO マウスでは IR 刺激により著明な肝組織のアポトーシスが生じた。肝組織における TNF- α / IL-6 / IL-1 β / INF- γ / CXCL-1 / CXCL-2 の発現を RT-PCR にて解析すると、rGal-9 投与群で有意に抑制された。免疫染色では、CD3(+), Ly-6G(+), CD68(+) 細胞数は rGal-9 投与群で有意に減少した。



以上、血中/組織内の Gal-9 発現の経時的変化を明らかにし、外因性 Gal-9 投与の有効性につき動物実験での実証に至った。Gal-9 は T 細胞を起点とした炎症反応のカスケードを抑制する機能を持つ。肝組織内での Gal-9 の発現量は通常は少ないが、IR 刺激、特に虚血により核内から細胞質へと経時的に発現され、細胞障害に伴い細胞外へ放出され、炎症を鎮静化する役割を担うと考えられる。これらの新しい知見に基づき、肝 IRI における Gal-9 に focus を置いて、海外雑誌 *Liver transplantation* へ報告した。

Gal-9 に関して海外雑誌 *Liver transplantation* への報告に引き続き、虚血そして再灌流早期に肝非実質細胞に Gal-9 が発現していることを同定した。形態学的にクッパー細胞（肝マクロファージ）と判断し、クッパー細胞が肝 IRI において Gal-9 を産生することで肝障害に対して抑制的に働くのではないかという仮説を掲げた。まずマウスのクッパー細胞の消去モデルの確立およびクッパー細胞の移植システムを確立した。Gal-9 KO マウスへのクロドロン酸リボソームの経門脈的投与によりクッパー細胞を消去し、野生型マウスもしくは Gal-9KO マウス由来のクッパー細胞を移植して、肝 IR 刺激するという実験を行なった。

結果として、野生型マウス由来クッパー細胞移植では肝障害が有意に軽減し、クッパー細胞由来の Gal-9 が肝 IRI 抑制に重要な役割を果たす可能性が示唆された。クッパー細胞が産生する Gal-9 の役割に関する解明と、TIM-3 シグナルによる制御機構につき研究を継続している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1, Miyauchi T, **Uchida Y**, Kadono K, Hirao H, Kawasoe J, Watanabe T, Ueda S, Jobara K, Kaido T, **Okajima H**, Terajima H, Uemoto S.

The preventive effect of antioxidative nutrient-rich enteral diet against liver ischemia and reperfusion injury

J Parenter Enteral Nutr. 43:133-144, 2019

2, Kadono K, **Uchida Y**, Hirao H, Miyauchi T, Watanabe T, Iida T, Ueda S, Kanazawa A, Mori A, **Okajima H**, Terajima H, Uemoto S.

Thrombomodulin Attenuates Inflammatory Damage Due to Liver Ischemia and Reperfusion Injury in Mice in Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner.

Am J Transplant. 17:69-80, 2017

3, Hirao H, **Uchida Y**, Kadono K, Tanaka H, Niki T, Yamauchi A, Hata K, Watanabe T, Terajima H, Uemoto S.

The protective function of galectin-9 in liver ischemia and reperfusion injury in mice.

Liver Transpl. 21:969-81, 2015

〔学会発表〕(計9件)

1, 宮内 智之、**内田 洋一朗**、海道 利実、上本 伸二

肝臓外科術後合併症の軽減に対する栄養療法の可能性

第 34 回日本静脈経腸栄養学会学術集会 サイエンスセッション 東京 2019/2/14-2/15

2, Kadono K, **Uchida Y**, Miki A, Ohno R, Miyauchi T, Okamoto T, Kamimura R, Horiguchi M, Fukuda M, Watanabe T, Ueda S, Terajima H

Thrombomodulin suppresses inflammatory damage due to liver ischemia and reperfusion injury in mice in TLR-4 dependent manner

The 53rd Congress of the European Society for Surgical Research, Walter Brendel awarded session, Madrid, Spain, 2018/5/30-2018/6/2

3, 門野 賢太郎、**内田 洋一朗**、平尾 浩史、宮内 智之、堀口 雅史、上田 修吾、金澤 旭宣、寺嶋 宏明、**岡島 英明**、上本 伸二

トロンボモジュリンによる肝虚血再灌流障害の改善とその作用機序の解明

第 117 回日本外科学会総会 横浜 2017/4/27-4/29

4, **内田 洋一朗**、平尾 浩史、門野 賢太郎、山内 清明、上田 修吾、森 章、金澤 旭宣、上本 伸二、寺嶋 宏明

肝虚血再灌流障害における Galectin-9 による制御機構の解明

第 116 回日本外科学会総会 大阪 2016/4/14-4/16

5. 内田 洋一郎

肝虚血再灌流障害における酸化ストレスと Galectin-9 の作用

第 12 回酸化ストレスと肝研究会 福岡 2016/2/13-2/14

6. 内田 洋一郎、大野 龍、後藤 徹、岡本 拓也、上田 修吾、森 章、金澤 旭宣、寺嶋 宏明

当院における高度局所進行膵癌に対する治療戦略

第 77 回日本臨床外科学会 福岡 2015/11/26-11/28

7. Hirao Y, Uchida Y, Kadono K, Yamauchi A, Watanabe T, Terajima H, Uemoto S

The role of T cell immunoglobulin mucin-3 and Galectin-9 pathway in liver ischemia reperfusion injury

The 14th Transplantation Science Symposium, Lorne, Australia, 2015/11/11-11/13

8. 内田 洋一郎、寺嶋 宏明、飯田 拓、高 忠之

肝内胆管癌に対する集学的治療戦略

第 51 回日本肝臓学会 熊本 2015/5/21-5/22

9. 内田 洋一郎、平尾 浩史、門野 賢太郎、田中 宏和、吉富 摩美、飯田 拓、上田 修吾、金

澤旭宣、上本 伸二、寺嶋 宏明

肝虚血再灌流障害と自然免疫の新しいメカニズムの解明-T cell / Macrophage Cross-Talk-

第 115 回日本外科学会 シンポジウム 名古屋 2015/4/16-4/18

〔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 <https://www.kitano-hp.or.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名：内田 洋一郎

ローマ字氏名：UCHIDA Yoichiro

所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会

部局名：医学研究所 第 1 研究部

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：30597745

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：岡島 英明

ローマ字氏名：OKAJIMA Hideaki

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：20308604

(3) 研究協力者

研究協力者氏名：平尾 浩史

ローマ字氏名：HIRAO Hirofumi

所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会

部局名：医学研究所 第 1 研究部

職名：研究員

(4) 研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 武

ローマ字氏名：WATANABE Takeshi

所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会

部局名：医学研究所 第 1 研究部

職名：研究員

研究者番号 (8 桁)：40028684

(5) 研究協力者

研究協力者氏名：山内 清明

ローマ字氏名：YAMAUCHI Akira

所属研究機関名：公益財団法人 田附興風会

部局名：医学研究所 第1研究部

職名：研究主幹

研究者番号(8桁): 00291427

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。