

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19857

研究課題名(和文) 肝虚血再灌流傷害におけるB-cell発現の関連に関する研究

研究課題名(英文) The role of B-cell expression in hepatic ischemia reperfusion injury

研究代表者

齋藤 裕 (SAITO, Yu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：50548675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝切除術における虚血再灌流障害は、克服すべき重要な臨床課題である。そのため、肝障害に関わる免疫細胞の中で、初めてB細胞に着目した。再灌流後の比較的早い時間(2時間)に、CXCL13 / CXCR5 axisを介して、肝内B細胞が増加しており、B細胞の抑制が治療ターゲットとなりえるという結論に至った。

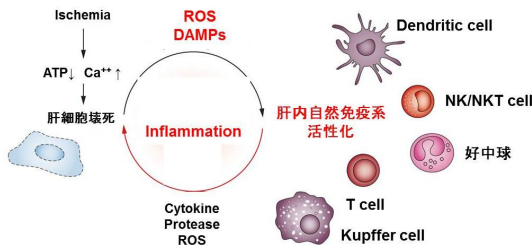
研究成果の概要(英文)：Liver ischemia-reperfusion (I/R) injury is one of critical problems to overcome in hepatectomy. Liver B cells among immune cells were focused on for the first time involved in I/R injury. Intrahepatic B cells might increase throughout CXCL13 / CXCR5 axis at relatively early time (2 hours) after reperfusion, and B cells can become therapeutic target in liver I/R injury.

研究分野：医歯薬学

キーワード：B細胞 肝虚血再灌流障害

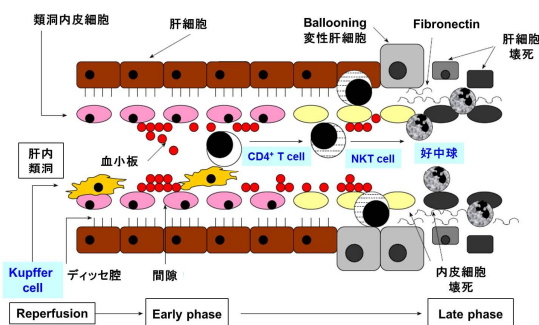
1. 研究開始当初の背景

肝虚血により肝細胞内の ATP は低下し、ミトコンドリアの形態異常、細胞内細胞内 Ca⁺⁺の上昇が生じ、不可逆的な組織破壊が生じる。ATP の欠乏した虚血組織においては多量の活性酸素 (ROS)、傷害関連分子パターン (DAMPs) を発生し、再灌流後の肝内自然免疫系の活性化が導かれる (World J Gastrointest Surg. 2014, J Surg Res. 2011)



(図 1)。

肝内で大量に産生された ROS あるいは、DAMPs は TLR4, RAGE を介して類洞内の kupffer cell を活性化する。活性化 kupffer cell は CD154-CD40、TIM-1-TIM-3、TIM-4-galectin 9、PD-L1 pathways を介して CD4+ T cell と相互的に作用する (Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013)。その interaction により NKT cell が誘導され、類洞間隙を通じて肝細胞に直接的傷害することで、肝細胞は変性する。これらの反応は Early phase (再灌流後約 2-6 時間以内に) に生じる (Am J Physiol. 1991, Transplant Proc 1994)。その後 Late phase 反応として、白血球の類洞内集積とそれにより産生される活性酸素、プロテアーゼが肝細胞をさらに傷害し、再灌流後約 18-24 時間の炎症反応の拡



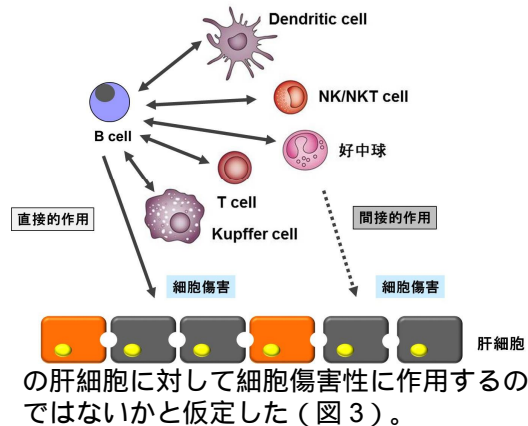
大による傷害の進展とされる (Hepatology 1996) (図 2)。

肝 I/R 傷害のメカニズムは、1. 虚血による肝細胞壊死、2. 再灌流後の肝内自然免疫活性化の 2 段階に分類され、近年肝内免疫担当細胞のメカニズムに関する検討が多く散見される。Early phase における kupffer cell、Dendritic cell の活性化、さらに CD4+T cell との相互作用、NKT cell 活性化による肝細胞直接傷害、そして、Late phase における好中球遊走によるさらなる炎症反応の拡大である (Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013)。しかし、これら免疫担当細胞における B cell

の働きに注目した報告は皆無であり、I/R 傷害の新しいメカニズム解明につながり得る。

脳虚血において、IL-10 産生 B cell が中枢神経系の炎症を軽減することで、梗塞体積減少作用を有し、治療ターゲットになり得る (Metab Brain Dis 2014)。また、ウイルス感染症急性期において、B cell と CD4+ T cell の interaction が抗ウイルス作用に重要である (J Immunol. 2014)。心筋虚血においては、B cell が虚血心筋への単球遊走の trigger となり、急性心筋梗塞動物モデルにおける心機能低下につながる (Nat Med. 2013)。すなわち、急性期の炎症あるいは虚血状態における B cell 発現の意義は臓器別に異なっており、他の免疫担当細胞との interaction も controversial である。

本研究における仮説として、肝内 B cell が、直接的にあるいは他の免疫担当細胞 (kupffer cell、Dendritic cell、T cell、NK/NKT cell、kupffer cell、Dendritic cell、T cell、NK/NKT cell) との interaction により間接的に、I/R 後



の肝細胞に対して細胞傷害性に作用するのではないかと仮定した (図 3)。

同機序解明によって、新たな肝 I/R 傷害の予防・治療につながり、ひいては肝切除術・肝移植術における治療成績向上にも寄与するものと考えている。

2. 研究の目的

肝 I/R 後の肝内 B-cell 発現の意義に着目し、I/R 傷害の新しいメカニズムを解明するとともに、合理的な予防・治療につながる基礎的根拠となるような知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

肝虚血再灌流傷害後の肝内 B 細胞発現の意義 (in vivo)

(1). マウス虚血再灌流モデルを用いた肝内 B 細胞発現の定量化及び location

8 週齢雄性 C57BL/6 マウスに全肝 30 分間虚血後に再灌流させ、0/2/6/12/24 時間後に犠死させ、血液・肝組織を採取し(各時間ごとに n=5、合計 n=25)、血中・肝内 B 細胞発現のタイムコース確認

(2). B 細胞枯渇モデルによる B 細胞の肝虚血

再灌流障害への関与

B 細胞 KO マウス(n=5, JAX 002288 B6.129S2-Ightm1Cgn/J \$140.0/mouse))に全肝 30 分間虚血後に再灌流し、上記のタイムコースで犠死させ、組織を採取する(各時間ごとに n=5、合計 n=25)

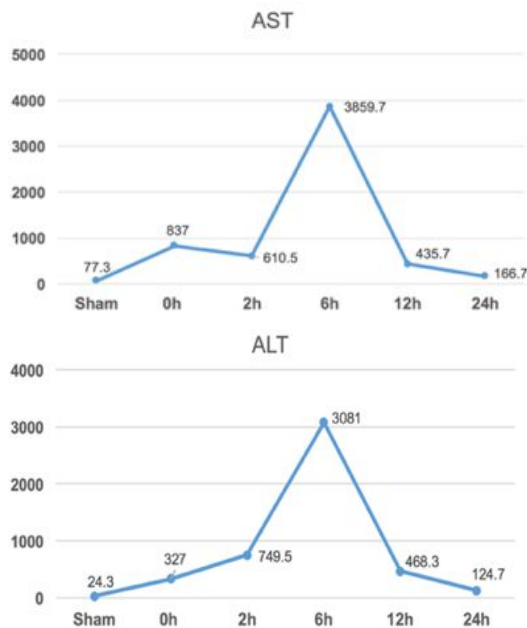
【検射項目】

血清肝機能 (AST / ALT / LDH / T-bil)、DAMPs (HMGB1)、ROS (MDA)、炎症性サイトカイン (TNF- α 、IFN- γ 、IL-1、IL-6、IL-10) 肝免疫組織染色 (HE 染色、アポトーシス (Caspase3/7))

4. 研究成果

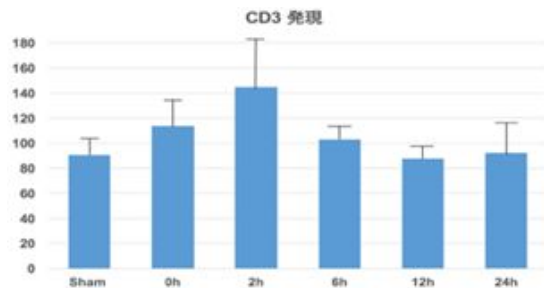
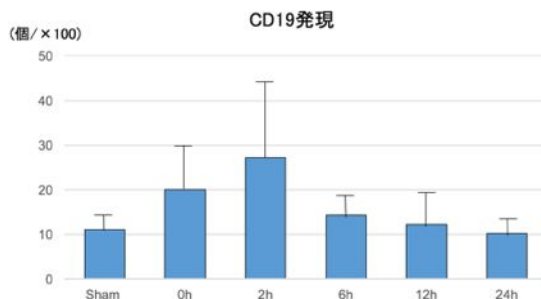
(1). マウス虚血再灌流モデルを用いた肝内 B 細胞発現の定量化及び location 虚血再灌流後肝傷害の確認

肝傷害(AST, ALT)は再灌流後 6hr 後に peak



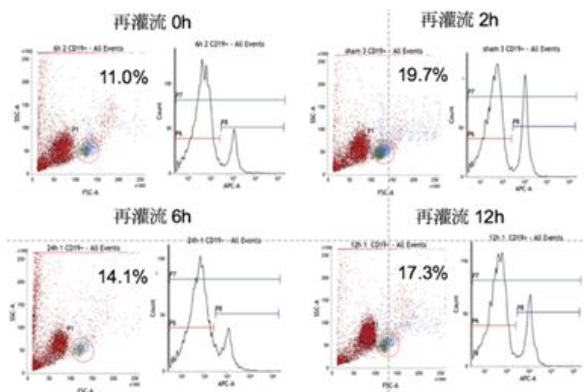
肝内 CD19(pan B), CD3(pan T)発現細胞

再灌流後早期(0-2h)に肝内の B 細胞、T 細胞ともに増加。

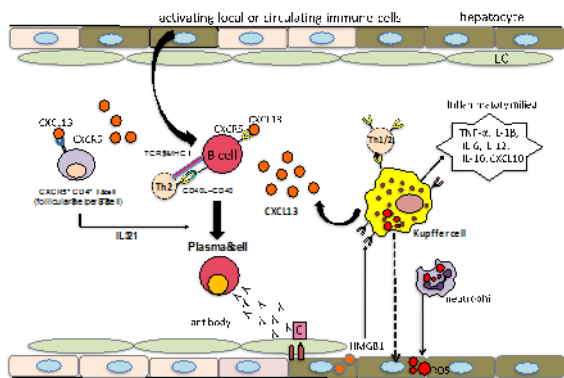


血中 CD19(pan B) 発現細胞

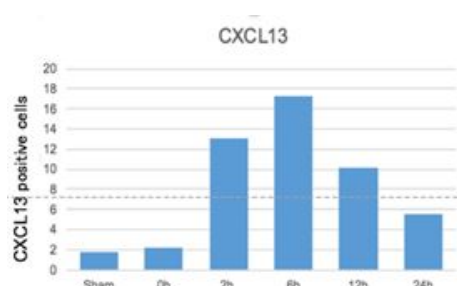
再灌流後 2h に血中 B 細胞増加。

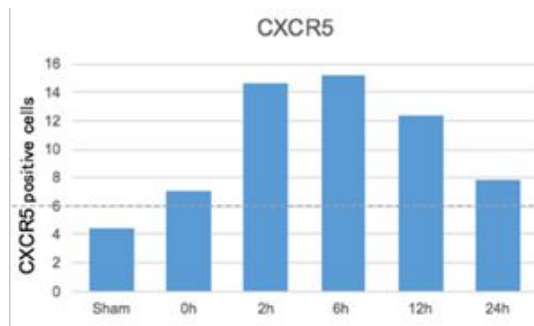


肝内 CXCL13, CXCR5 発現



炎症組織において B cell が誘導されるメカニズムとして、M や樹状細胞の産生する B cell attractant chemokine である CXCL13 がその receptor である CXCR5 positive CD4+Tcell, B cell を門脈域に homing する。誘引された CXCR5 positive CD4+Tcell が IL-21 を介して B cell を Plasma cell への分化を誘導することが報告されている(Hepatology. 2015) (図 4)





再灌流 2~6h 後に CXCL13 positive cell, CXCR5 positive cell とともに上昇。

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 4 件)

1. **Saito Y**, Morine Y, Shimada M. Mechanism of impairment on liver regeneration in elderly patients: Role of hepatic stellate cell function. doi: 10.1111/hepr.12872. Hepatol Res. 2017;47(6):505-513. 査読有
2. Watanabe M, Lundgren T, **Saito Y**, Cerami A, Brines M, Östenson CG, Kumagai-Braesch M. A Nonhematopoietic Erythropoietin Analogue, ARA 290, Inhibits Macrophage Activation and Prevents Damage to Transplanted Islets. doi: 10.1097/TP.0000000000001026. Transplantation. 2016;100(3):554-562. 査読有
3. Davaadorj M, Imura S, **Saito Y**, Morine Y, Ikemoto T, Yamada S, Takasu C, Teraoku H, Yoshikawa M, Shimada M. Loss of SFRP1 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Loss+of+SFRP1+Expression+Is+Associated+with+Poor+Prognosis+in+Hepatocellular+Carcinoma>. Anticancer Res. 2016;36(2):659-664. 査読有
4. **齋藤 裕**, 濱田康弘, 安井苑子, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 島田光生. 特集「外科領域におけるサルコペニア」周術期サルコペニア発生の予防法. <http://mol.medicalonline.jp/newbunken?GoodsID=dj5surgi/2016/005001/004&name=0021-0028j> 外科と代謝・栄養. 2016; 50(1): 21-28

査読有

[学会発表](計 2 件)

1. **齋藤 裕**, 良元俊昭, 高田厚史, 吉川雅登, 寺奥大貴, 山田眞一郎, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 島田光生. 2016 (Young Investigator 's Award) HDAC 阻害剤は脂肪由来幹細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導を促進する. 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 14 日-16 日, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府大阪市)
2. **Saito Y**, Shimada M, Ikemoto T, Morine Y, Imura S. The liver regeneration of left lobe after right liver resection: the comparison among caudate lobe, lateral and median segment. 17th Congress of the European Society for Organ Transplantation (ESOT), 2015 年 9 月 13 日-16 日 The square brussels meeting centre(Belgium,brussels)

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 裕 (SAITO, Yu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：50548675