

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07936

研究課題名(和文)急性肝不全モデル動物におけるMCP-1, sSiglec9の有用性

研究課題名(英文)Effect of MCP-1 and sSiglec9 in the animal models of acute liver failure

研究代表者

石上 雅敏 (Ishigami, Masatoshi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90378042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は現在実臨床では存在しない、急性肝不全に対する肝再生を直接促進させる薬剤の候補として、マクロファージを炎症局所に遊走させる因子であるMCP-1とsSiglec-9の2因子の効果を様々な急性肝不全モデル動物において検討した。Concanavalin A、CC14誘発肝障害モデルにおいても上記2因子は生存率の改善を認めた。そのメカニズムとして炎症抑制性マクロファージであるマーカーであるCD206、Arginase-1、肝再生マーカーであるHGF、 β -カテニン、EpCAMの発現上昇を認めた。また、上記2因子は星細胞の活性化を抑制、静止期に留め、HGF発現上昇効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、急性肝不全においてその治癒の鍵となる肝再生促進を直接促進させる薬剤は存在せず、そのために未だに多くの患者を失っているのが現状である。その一つの有効な候補としてMCP-1+sSiglec9の2因子併用が、多くの肝不全動物モデルにおいて有用であること、またその炎症抑制、肝再生促進のメカニズムを明らかにすることで、現在実臨床で存在しない新たな治療法、および現在でも死亡率の高い本疾患における生存率の向上に寄与することが可能となってくるであろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effect of combination of 2 humoral factors; MCP-1, which is the well-known factors for the migration of macrophage into inflamed site, and sSiglec-9, which is the key factor of transition of macrophage from inflammatory to anti-inflammatory subset in several animal models of acute liver injury as the candidate for promoting liver regeneration directly, which does not exist in clinical practice. Combination of these 2 factors improved the survival of mice in Concanavalin A or CC14 induced acute liver injury models. Expression of CD206 and Arginase-1, which are the surface markers of anti-inflammatory subsets of macrophage and HGF, β -catenin, or EpCAM, which are the markers of liver regeneration, increased in the group of inoculation of these 2 factors compared with controls. In cultured hepatic stellate cells, these 2 factors inhibit the activation, and keep the quiescent state, resulting the increased expression of HGF.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝再生 マクロファージ 炎症-再生関連

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎を始めとした急性肝不全においては、近年の全身管理方法の大きな進歩により、治療効果が大きく改善されてきた。ただその反面、炎症による大量の肝細胞壊死を来した患者の回復を導くためには肝臓の自力での再生が不可欠である。現在の所、実臨床で使用できる肝再生を促す有効な薬剤がないため、自力での回復が得られない場合は肝移植に頼らざるを得ない。ただわが国の現状でのドナー不足や、様々な合併症、また年齢の問題から肝移植が受けられない多くの患者を救命できなかったという歯痒い経験をしてきた。

「肝再生」の現象はギリシア神話にも出てくる通り、非常に古くから知られている現象ではあるが、その詳細なメカニズムについてはようやく最近になりわかってくるようになってきたものの、未だ不明な点も多く、現在盛んに研究されている分野の一つである。

このような中、実臨床で使用可能な自己の肝再生を促す作用のある急性肝不全治療薬の開発は患者の救命、および予後改善には大変重要なものと考えられる。

2. 研究の目的

以前より研究代表者らは、乳歯歯髓由来幹細胞(stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED)を樹立、その培養上清の投与により D-galactosamine(D-gal)誘発ラット急性肝不全モデルでの炎症抑制、肝再生促進効果について明らかにしてきた(Matsushita Y, Ishigami M, et al. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11: 1888-1896)。また上記急性肝不全モデルラットにおいてその培養上清中の因子の中で、マクロファージ遊走因子である MCP-1 とマクロファージを炎症性(M1)から抗炎症性(M2)に形質転換するのに重要な糖鎖蛋白である s-Siglec 9 の 2 因子が重要であることも明らかにしてきた(Ito T, Ishigami M, et al. *Sci Rep.* 2017 ;7:44043)。

本研究ではこの成果を発展し、上記 2 因子が肝再生機序に関わる詳細なメカニズム、また種々の急性肝不全モデルにおける汎用性を検討することで、本研究をまだ不明な部分の多い肝再生のメカニズム、モデルによる共通点、差異を検討、これら 2 因子が将来的に急性肝不全の有望な治療薬となり得るかどうかの基礎的検討と位置づけた。

3. 研究の方法

(1)今まで MCP-1+s Siglec-9(2Pro)の効果を示してきた D-galactosamine(D-gal)誘発急性肝不全モデル以外での汎用性の検討として Concanavalin A 誘発急性肝不全モデルマウス、CC14 誘発急性肝不全モデルマウス、アセトアミノフェン誘発急性肝不全モデルマウスにおいて、生存率、血清 ALT 値、炎症性サイトカインとして TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、PAI-1、iNOS、IFN- γ 、炎症抑制性マクロファージマーカーである CD206、Arginase-1 の発現、肝再生増殖因子である HGF の発現、および肝再生の状態を Ki-67 免疫染色の経時的推移、およびこれらについての検討を上記 2 因子投与群とコントロール群に分けて行った。

(2)D-gal 誘発急性肝不全モデルにおいて未だ明らかではなかった肝再生促進の検討として、Fn14, TWEAK, HGF, β -catenin の発現についてその経時的推移、および上記 2 因子投与群とコントロール群に分けて検討を行った。

(3)HGF 産生を豊富に行う細胞としては静止期の星細胞に着目。星細胞株である Lx-2 に SHED-CM、もしくは上記 2 因子を添加し、 α -SMA の発現をコントロールと比較、星細胞の活性化抑制作用について検討した。

4 . 研究成果

(1)ConcanavalinA 誘発マウス急性肝不全モデルにおいて 15mg/kg 静注後 3 時間の時点で 2Pro 群と PBS(コントロール)群に分けると有意に 2Pro 群における投与 7 日目までの生存率が高かった($P=0.0107$)。ただし、投与 24 時間後でピークを迎える ALT 値は両群間では大きな差は見られなかった。

(2)CC14 誘発急性肝不全マウスモデルにおいては、2ml/kg の CC14 投与後 24 時間にて 2Pro、もしくは PBS を投与、比較検討を行うと、投与 5 日目までの生存率はやはり 2Pro 群で高い傾向にあり($P=0.0539$)、ALT 値は低い傾向にあった。48 時間の時点でピークを迎える ALT 値については 2 因子投与群と control 群で差は認められなかった。また、CC14 投与 60 時間後で 2 因子投与群の Arginase-1, CD206 が control に比べて高発現であることが示され、効果にタイムラグがある可能性が示唆された。CC14 投与 36、48、60、72 時間後に Ki-67 染色にて肝再生の評価を行った所、2 因子投与群、control 群とも血清 ALT 値に比例した Ki-67 染色の増強と、48、60 時間後において強い発現上昇を認め、control 群と比較して 2 因子投与群において発現上昇の強いことがわかった。また、48 時間後においては 2 因子投与群では control 群と比較して炎症抑制性マクロファージマーカーである CD206、炎症サイトカインの一つである TGF- β の発現増強が認められた。また、ALT 値に差がなかったことにより、炎症を介さない肝再生に対する 2 因子の直接作用を検討するため、肝切除ラットモデルを用いた。肝切除直後に治療介入として歯髄幹細胞培養上清(SHED-CM)を投与、control 群と比較した所、2 群間の Ki-67 発現に大きな差は認められず、SHED-CM, 2 因子の作用は抗炎症作用と協調的に働いていることが示唆された。

(3)D-gal 誘発ラット急性肝不全モデルにおいて肝再生マーカーである Fn14, TWEAK, HGF, β -catenin について検討した。従来 1.2g/kg 投与時では Fn14 の発現は 1 日目に、TWEAK, HGF, β -catenin については 2 日目にピークを迎えた。興味深いことに半量の 0.6g/kg 投与ではこれらのピークが 1 日目にずれることがわかり、壊死が小さい分より早く肝再生機序が発現するものと考えた。また D-gal 投与後 24 時間で 2Pro 群と PBS 群で比較検討すると、2Pro 群において HGF, β -catenin、EpCAM の発現が高いことが示された。

(4)HGF 分泌の主な細胞の一つと考えられる星細胞に着目、検討を行った。星細胞はその活性化に伴い、線維産生細胞として主に働くが、静止期にある星細胞は HGF の産生が強くなると考えられている。星細胞の活性化マーカーである SMA の染色を行うと 2 因子投与群では生体内では星細胞の活性化が抑制されていることが免疫組織学的検討に示された。培養星細胞株である Lx-2 において、SHED-CM の添加により、 α -SMA 発現の低下、HGF 発現の上昇が見られることがわかり、星細胞を静止期に維持する作用があることが示唆された。また、SHED-CM の添加により、Hep-G2 細胞の cell viability が促進されることが明らかとなり、肝細胞の再生促進を促す可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Muto H, Ito T, Tanaka T, Yokoyama S, Yamamoto K, Imai N, Ishizu Y, Maeda K, Honda T, Ishikawa T, Kato A, Ohshiro T, Kano F, Yamamoto A, Sakai K, Hibi H, Ishigami M, Fujishiro M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth ameliorates NASH via the Gut-Liver axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98254-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武藤 久哲、伊藤 隆徳、石上 雅敏、藤城 光弘
2. 発表標題 マウスNASHモデルに対する歯髄由来幹細胞培養上清の抗線維化作用の検討
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------