

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16373

研究課題名(和文) プロスタグランジンを介した肝樹状細胞の肝修復における役割解明

研究課題名(英文) Role of dendritic cells in liver repair via prostaglandin receptor signaling

研究代表者

西澤 伸恭 (Nishizawa, Nobuyuki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60566925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロスタグランジン(PG)E2の受容体サブタイプであるEP3受容体シグナルが肝虚血再灌流障害後の肝修復に関与すること、さらに樹状細胞がマクロファージ形質転換を促進することを明らかにした。このとき分化誘導因子であるIL-13が樹状細胞から産生されマクロファージはEP3受容体シグナルに依存して炎症性マクロファージから修復性マクロファージに分化することを培養実験で示した。これらの結果から肝虚血再灌流障害後には集積樹状細胞がマクロファージとEP3受容体シグナルを介してクロストークし、樹状細胞由来のIL-13産生がマクロファージ分化を刺激して肝修復を促進させていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はプロスタグランジン/PGE受容体シグナルが従来の炎症誘導作用ではなく、肝組織修復・肝再生に関与している観点から、脂質メディエーターの果たす機能的役割を検証した。さらに、PGE受容体シグナルを介した肝修復に関与する細胞としてこれまで解明されたことのない肝樹状細胞に焦点を当て、新しい肝修復制御機構を明らかにすることができた。今後、脂質メディエーター制御による新規肝再生治療への開発や創薬など臨床応用につながる可能性があり、肝再生医学の研究領域の発展に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We clarified the role of PGE receptor, EP3 in dendritic cells (DCs) during liver repair by subjecting EP3-deficient (EP3^{-/-}) and wild-type (WT) mice to hepatic ischemia-reperfusion (I/R). Compared with WT mice, EP3^{-/-} mice showed delayed liver repair accompanied by reduced accumulation of reparative macrophages and monocyte-derived DCs (moDCs). Adoptive transfer of moDCs from EP3^{-/-} mice resulted in impaired repair, along with increased inflammatory macrophages. Bone marrow macrophages (BMMs) up-regulated expression of genes related to a restorative macrophage phenotype when co-cultured with moDCs; this phenomenon was dependent on EP3 signaling. In the presence of an EP3 agonist, interleukin (IL)-13 derived from moDCs drove BMMs to increase expression of genes characteristic of a reparative macrophage phenotype. The results suggest that EP3 signaling in moDCs facilitates liver repair by inducing IL-13-mediated switching of macrophage phenotype from pro-inflammatory to pro-reparative.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝修復 樹状細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝虚血再灌流障害は肝切除手術、肝移植、外傷、出血性ショックなどに起こりうる病態で、術後肝障害や肝不全などの合併症をきたすと、患者の予後は不良になる。肝移植術においては虚血再灌流障害により10%が早期グラフト機能不全となるだけでなく、急性または慢性拒絶反応などにも関連する。従って、肝修復・肝再生は肝虚血再灌流障害の予後を左右する決定因子といえる。しかしながら、肝虚血再灌流障害に対しては有効かつ確実な対処法がいまだに確立されていない。さらに肝虚血再灌流障害においては、これまで主として障害成立機序に焦点が当てられ、障害後の肝修復・肝再生に関する解明は十分には進んでいない。これまで申請者らはプロスタグランジン PGE₂-EP3 受容体シグナルがマクロファージ(Mφ)の肝修復促進作用に重要な役割を果たすことを見いだした。同時に近年、心筋組織において自然免疫細胞である樹状細胞が組織修復に関与することが報告されており、Mφ と樹状細胞のクロストークが組織修復に関与する可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

プロスタグランジン(PG)E₂ 受容体サブタイプの一つである EP3 受容体シグナルが肝虚血再灌流後の肝組織修復に果たす役割とその制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの予備実験でPGE₂ 受容体サブタイプのなかでEP3 受容体サブタイプが肝修復増強作用があることを見いだした。そこで、遺伝子改変動物 EP3 受容体ノックアウトマウスと野生型マウス(WT)を用いて既報に従い肝虚血再灌流障害モデル(70%肝部分温虚血(45分))を作成する。肝修復制御機構における EP3 受容体シグナルの役割を解明するために以下の実験を計画した。

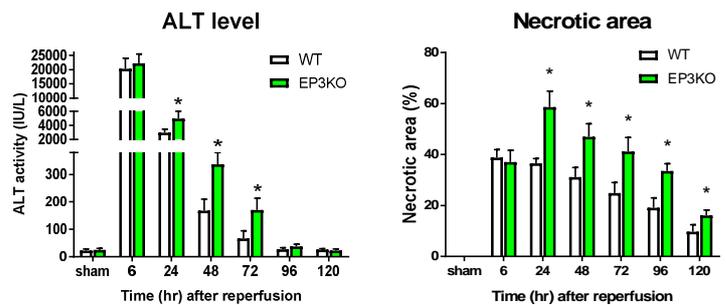
EP3 受容体シグナルの肝組織修復への関与(生化学的検査、PCR、免疫染色等)および受容体アゴニストによる再現性の確認

樹状細胞と Mφ のクロストークによる肝修復制御機構の解析(免疫染色、FACS、in vitro 等)

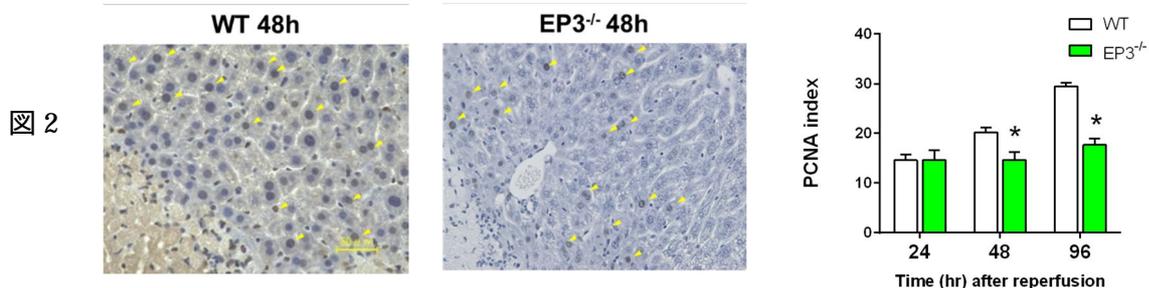
4. 研究成果

EP3 受容体シグナルの肝修復促進作用

a) 肝障害の指標として血清 ALT 値を測定すると、WT および EP3^{-/-}において障害は6時間でピークを認め有意差を認めなかった。EP3^{-/-}では、血清 ALT 値および壊死面積で 24 時間以降において有意に高値を示した。また肝壊死面積も同様であった。従って、EP3 受容体シグナルには肝修復を促進する作用があることが考えられた(図1)。

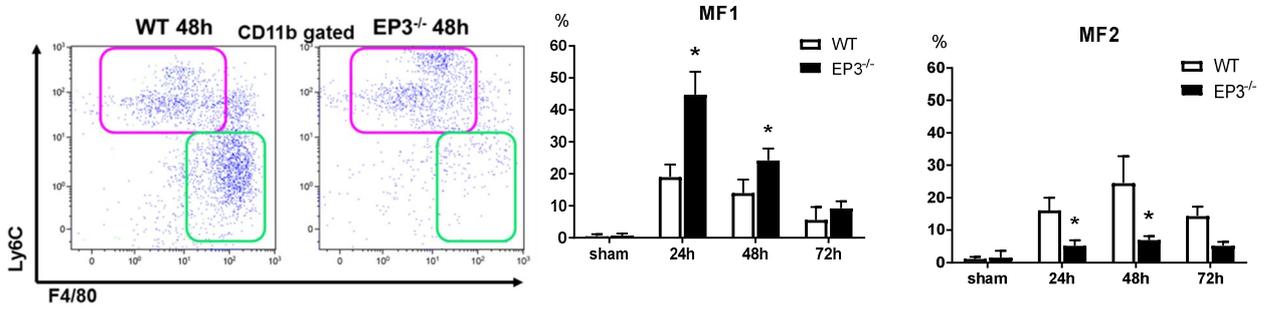


b) 細胞周期 S 期のマーカーである PCNA を染色で評価し肝細胞の増殖能を検討した。その結果、EP3^{-/-}では 48、96 時間において有意に PCNA が抑制され肝再生が遅延した。また、肝修復には肝再生増殖因子 (HGF,EGF,VEGF)を調べると、EP3^{-/-}で発現が軽減された(図2)。



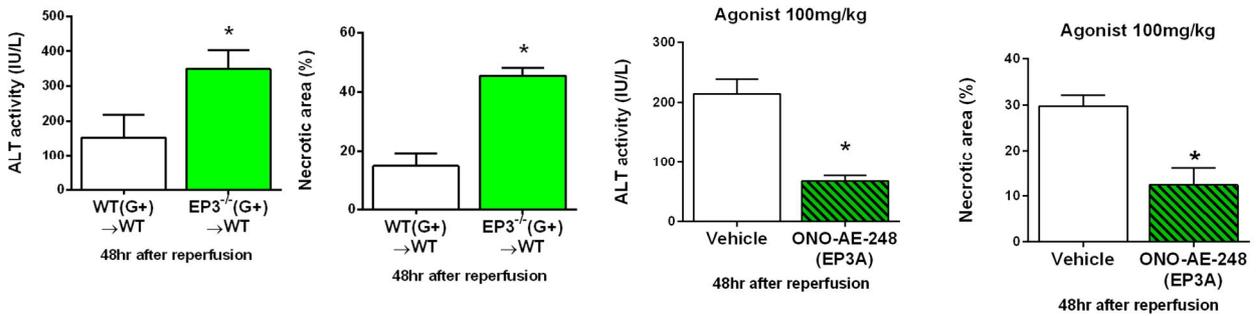
c) マクロファージには M1 マクロファージと M2 マクロファージの 2 つのサブタイプがあり、これまでに我々は Flow Cytometry を用いて Ly6C^{hi} / CD11b^{hi} / F4/80^{lo} が M1, Ly6C^{lo} / CD11b^{hi} / F4/80^{hi} が M2 マクロファージの表現形式をとることを見出している。傷害後の肝組織より抽出された細胞を解析すると、Ly6C^{hi} / CD11b^{hi} / F4/80^{lo} (M1)が EP3^{-/-}で有意に多く、Ly6C^{lo} / CD11b^{hi} / F4/80^{hi} (M2) が WT で有意に多い結果が得られた(図3)。

図 3



d)そこで骨髄移植実験を行い EP3^{-/-}骨髄移植マウスで血清 ALT 値および壊死面積が増加したことから、EP3 発現骨髄細胞が肝修復に関与するものと考えられた。また EP3 受容体シグナルの肝修復促進作用を薬理的に検証するため、EP3 受容体作動薬を投与したところ再灌流 48 時間後の血清 ALT 値および肝壊死面積は投与群で有意に低下を認めた (図 4)

図 4



樹状細胞と Mφ のクロストーク

a) 骨髄由来樹状細胞はその分化系列と成熟段階から機能的に大きく3つのサブタイプ(1.単球由来樹状細胞 (Monocyte-derived DCs: moDC)、2.通常型 DC (conventional DCs)、3.形質細胞様 DC (plasmacytoid DCs) に分けられる。そこで、肝修復に関与する樹状細胞のサブタイプを特定するために、Flow Cytometry を行った。その結果、moDC(CD11b^{high}, CD11c^{high}, MHC2^{high}, Ly6c^{high})が有意に傷害肝への集積を認め、かつ WT に比較して EP3^{-/-}で有意に低下した (図 5)。

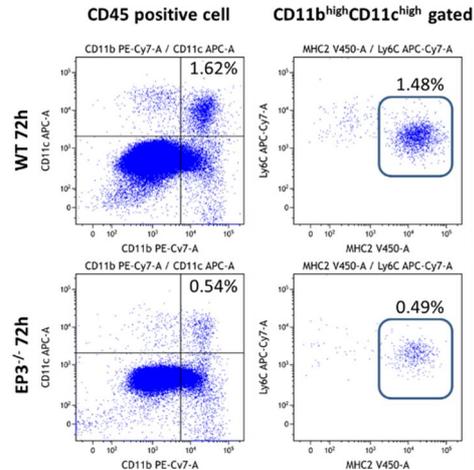
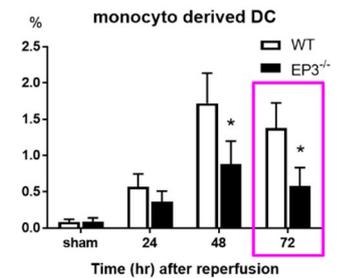
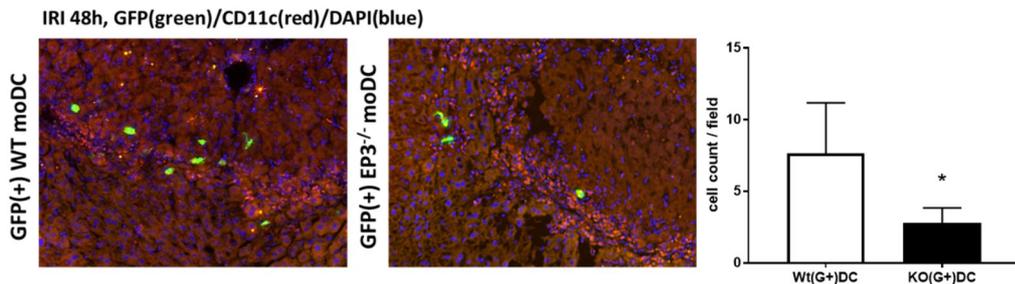


図 5



b) GM-CSF 誘導下で 8 日間分化培養した WT および EP3^{-/-}-moDC(GFP+)を静脈投与すると、免疫染色で EP^{-/-}-DC 投与群において障害部への DC 集積が有意に抑制された (図 6)

図 6



以上から、樹状細胞が EP3 受容体シグナルを介して肝修復に関与する可能性が考えられた。そこで、このメカニズムの解明のために培養骨髄マクロファージを培養樹状細胞を共培養するとマクロファージは EP3 受容体シグナルに依存して炎症性マクロファージから修復性マクロファージに分化し、このとき分化誘導因子である IL-13 が樹状細胞から産生されたことをみいだした。さらにマクロファージ形質転換が IL-13 に依存していることを培養実験で確かめた。

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 Nakamoto S, Ito Y, Nishizawa N, Goto T, Kojo K, Kumamoto Y, Watanabe M, | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 EP3 signaling in dendritic cells promotes liver repair by | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 FASEB J | 6. 最初と最後の頁 5610-5627 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201901955R. | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 中本 修司, 伊藤 義也, 西澤 伸恭, 大高 史聖, 津留 世里, 服部 響子, 本田 雅子, 天野 英樹, 馬嶋 正隆 |
| 2. 発表標題 プロスタグランジンEP3受容体シグナルを介した肝樹状細胞の肝修復促進作用 |
| 3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 中本 修司, 伊藤 義也, 後藤 卓也, 西澤 伸恭, 古城 憲, 隈元 雄介, 馬嶋 正隆 |
| 2. 発表標題 樹状細胞のEP3シグナル伝達はマウスの虚血再灌流障害後の肝修復を促進する。 |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|