

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17418

研究課題名(和文) アセトアミノフェン中毒の病態形成における樹状細胞の役割解析と法医診断学への応用

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of dendritic cells in acetaminophen induced liver injury

研究代表者

山本 寛記(Yamamoto, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30781265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症の制御あるいは増幅に関わるXCR1陽性樹状細胞に注目し、アセトアミノフェン(APAP)肝障害におけるXCR1+DCの動態と分子メカニズムの解明を目的として実験を行った。野生型及びXCR1遺伝子欠損(KO)にAPAP投与後、経時的に観察した結果、野生型と比較してXCR1 KOにおいて明らかに肝障害の増悪が見られた。野生型でAPAP投与後、肝臓におけるXCL1及びXCR1の発現は、投与10時間で減少した後に増加し、30時間で元の水準に戻ったことから、肝細胞の壊死により一旦減少したXCL1陽性細胞が補充され、それにより肝臓に集まるXCR1陽性細胞がAPAP肝障害において保護的に働くと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、臨床医学領域において、免疫機能における樹状細胞の動態と種々の疾患の病態との関わりについて研究が盛んになされ、炎症性疾患、癌、疼痛などの疾患の病態生理において樹状細胞が密接に関与していることが明らかとなっている。本研究を通じて、XCR1陽性樹状細胞がAPAP肝障害における「鍵となる細胞種」であることが明らかとなれば、従来の化学分析結果と樹状細胞の動態を有機的に組み合わせることによって、これまで以上に客観的かつ正確な死因の判断が可能となることが予想される。さらに、本研究は免疫学、薬理学、救急医学と密接に関連する学際的研究であり、法医学を発信源とした医科学の発展に寄与する将来性のある研究である。

研究成果の概要(英文)：We focused XCR1-expressing dendritic cells which involved the amplification and suppression of inflammatory and researched the role of them in APAP induced liver injury by using mice models (Wild type and knockout of XCR1). After APAP challenge, liver injury was aggravated in Xcr1-/- mice compared with wild type. In the wild type, after APAP challenge, the expression of XCL1 and XCR1 in the liver decreased after 10 hours of administration and then increased and returned to the original level at 30 hours. This is thought to be due to the replenishment of XCL1-positive cells necrotic due to APAP liver injury. The same trend of XCL1 expression was observed in Xcr1-/-mice after APAP challenge. Replenished XCL1-expressing cells recruit XCR1-expressing cells. Namely, it was suggested that the infiltration of XCR1-positive cells into the liver is involved in the suppression of inflammation.

研究分野：法医学

キーワード：アセトアミノフェン 肝障害 法医中毒学

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

解熱鎮痛剤として汎用されているアセトアミノフェン (APAP) は、容易に入手できることから、自殺例に加えて偶発的な中毒事故についても問題となっている。APAP が肝臓特異的に障害を起こすことは古くから知られており、現在法医学で主体とされている化学分析では、致死薬物濃度以下であるにも関わらず、死亡の主たる原因となることもしばしば見受けられる。

法医学は法医病理学、法医中毒学および法医血清遺伝学を 3 本柱とする応用医学の一つであり、その学問的特性から臨床医学と同様、最先端の知見が応用されなければならない。法医学において、正確な死因診断が最も重要な課題であることは言うまでもない。

実際、多量の薬毒物を服用したことによる薬物中毒死事例にもしばしば遭遇するが、これまで法医中毒学領域においては、採取された血液等の生物学的試料に含有される薬毒物は機器を用いて化学的に検出すること、すなわち分析学の確立に主体が置かれてきた。その結果、多くの薬毒物の検出が可能となり、法医学に大きく貢献してきたが、検出された薬毒物の血中濃度が、これまでの致死薬物濃度以下であるにも関わらず死亡に至る事例もしばしば経験する。そのような事例では、個人における薬毒物の感受性の違い、特に薬毒物による臓器障害について病態生理学的検討が必要であるものの、そのような研究は国内・国外を通じて非常に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

樹状細胞は抗原提示細胞として、自然免疫、獲得免疫両者の機能に関与しており、炎症局所に素早く集積し、自然免疫から獲得免疫への架け橋となることが知られている。樹状細胞は、病原体や外傷などによって放出される PAMPs や DAMPs を細胞膜上のパターン認識受容体が認識することによって、免疫応答機能が作動し、炎症性サイトカインなどの免疫系活性因子を産生するなど免疫応答を誘導する。近年、樹状細胞は機能や特徴が異なるいくつかのサブセットから構成されることがわかってきた。樹状細胞のサブセットのうち、ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞 (XCR1 陽性樹状細胞) は、特に細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導する活性が強く、病原体やがんに対する防御免疫応答の主役を担っていることが知られている。また XCR1 陽性樹状細胞はケモカインシステム (XCR1 - XCL1) を介して腸管 T 細胞とクロストークすることにより、腸管内の免疫環境を維持することも報告されている。樹状細胞は炎症期に様々な炎症性細胞や組織の構成細胞と相互に作用を及ぼしあい、炎症の制御あるいは増幅に関与していることも報告されてきた。しかし、XCR1 陽性樹状細胞が炎症性疾患においてどのような役割を果たしているかについてはよくわかっていない。

本研究では、APAP 中毒の病態における XCR1 陽性樹状細胞に着目し、その動態、APAP 代謝動態、炎症性サイトカインの発現動態との関連性を解析し、APAP 毒性に対する XCR1 陽性樹状細胞の影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 病理組織学的検討

実験動物として XCR1 遺伝子欠損マウス及びコントロールとして野生型 (C57BL/6) マウスを用いた。APAP 中毒モデルの作成は、野生型、各遺伝子欠損マウスそれぞれで、8 週齢の雄に APAP を 600mg/kg 腹腔内投与し、肝障害を惹起させることで作成した。

APAP 投与後経時的 (10, 24, 30 時間) に各マウスから採取した肝臓組織を 10% PBS 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作成し、各切片について HE 染色を行い、形態学的変化を観察した。形態学的肝障害の程度については、既に報告されている方法に基づいてスコア化し、統計学的解析を行った。(Eur J Immunol 36:1028;206)。

(2) 血清肝逸脱酵素の測定

APAP 投与後経時的 (10, 24, 30 時間) に各マウスから採取した血液の一部を血清分離し、血清肝逸脱酵素 (ALT, AST) の測定を行うことで肝障害の程度を生化学的に解析した。

(3) 免疫組織化学的検討

採取した肝臓組織を 10% PBS 緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋切片を作成し、好中球、マクロファージ (クッパー細胞)、T 細胞、NK 細胞に対する特異的抗体を用いて免疫組織学的に各白血球浸潤の程度を解析した。

(4) APAP 投与後の肝臓における、炎症メディエーターの遺伝子発現の検討

野生型および *Xcr1*^{-/-} マウスに APAP を投与後、経時的に採取した肝臓組織により total RNA を抽出し、逆転写反応を行い、cDNA を合成。IL-1b, IL-6, IFN- γ に特異的なプライマーを用いて、real time RT PCR を行い、各 mRNA を定量し、経時的変化を検討した。

(5) APAP 投与後のマウス肝臓における, XCR1, XCL1 の発現量推移の検討

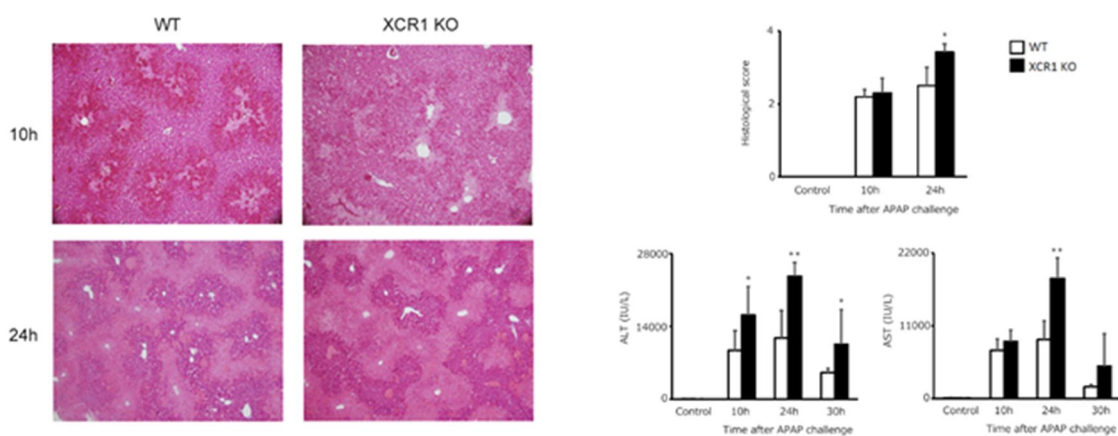
野生型マウスに APAP 投与後, 経時的(10, 24, 30 時間) に採取した肝組織により total RNA を抽出し, 逆転写反応を行い, cDNA を合成. XCR1, XCL1 に特異的なプライマーを用いて real time RT PCR を行い, 各 mRNA を定量した.

さらに, *Xcr1*^{-/-}マウスに APAP 投与後, 経時的(10, 24, 30 時間) に採取した肝組織により total RNA を抽出し, 逆転写反応を行い, cDNA を合成. XCL1 に特異的なプライマーを用いて real time RT PCR を行い, 各 mRNA を定量した.

4. 研究成果

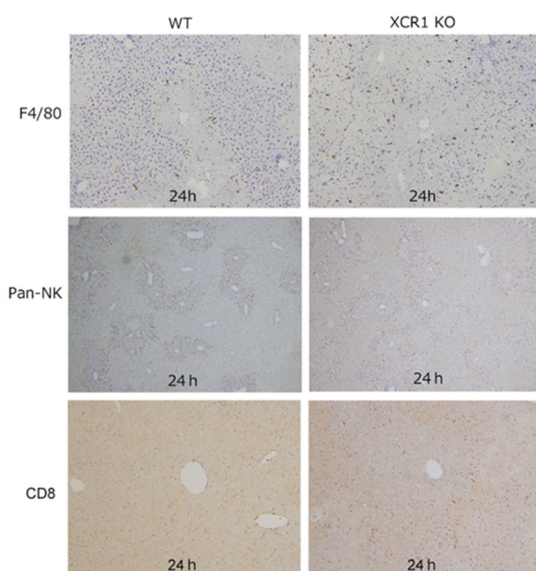
(1) *Xcr1*^{-/-} において, APAP 投与後, 24 時間の肝組織で, 明らかな肝障害の増悪が見られた.

投与前, すべてのマウスにおいて, 肝臓組織に違いはみられなかった. APAP 投与後, 野生型, 遺伝子欠損型とも肝細胞の壊死は経時的に拡大していったが, *Xcr1*^{-/-} で明らかに肝障害は重症化した.

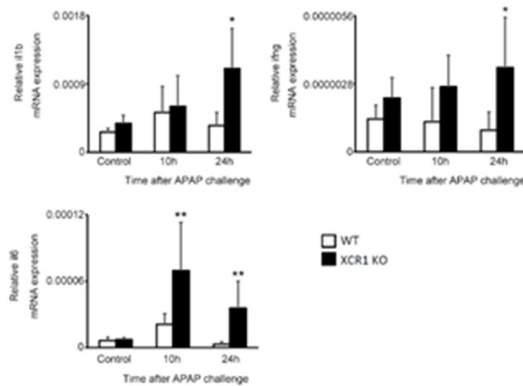


(2) 投与前, すべてのマウスにおいて, ALT, AST レベルに違いはみられなかった. APAP 投与後, すべてのマウスにおいて ALT, AST レベルは上昇したが, 野生型と比較して *Xcr1*^{-/-} で, ALT 及び AST の上昇の増加が見られた.

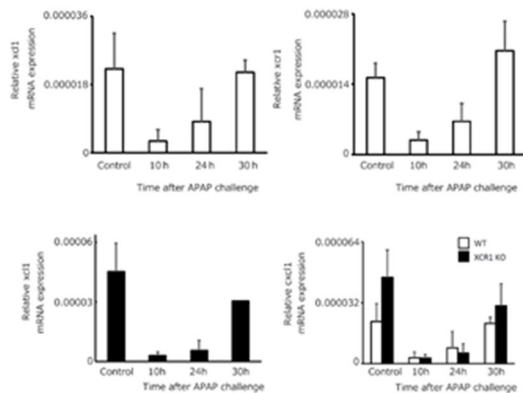
(3) さらに, マクロファージ, NK 細胞, T 細胞など各白血球の浸潤についても, APAP 投与前の肝臓で差はみられなかったが, APAP 投与後, 野生型と比較して, *Xcr1*^{-/-} でマクロファージ, T 細胞, NK 細胞の浸潤が増加していた.



(4) 野生型及び *Xcr1*^{-/-} マウスに APAP を投与後、経時的に採取した肝組織で、各時間における IL-1 β , IL-6, IFN- γ の mRNA を定量した結果、野生型と比較して、*Xcr1*^{-/-}マウスでは APAP 投与後の IL-1 β , IL-6, IFN- γ の発現の増加がみられた。



(5) 野生型マウスに APAP 投与後、経時的に採取した肝組織で、各時間における XCR1, XCL1 の mRNA を定量した結果、投与後 10 時間で減少し、その後増加し 30 時間で元の水準まで戻った。



また *Xcr1*^{-/-}マウスに APAP を投与し、経時的に取り出した肝組織における XCL1 の mRNA を定量した結果、野生型マウスと同様の発現動態が見られた。

野生型及び *Xcr1*^{-/-}マウスに APAP を投与し、経時的に病理組織学的及び生化学的解析を行ったところ、野生型と比較して *Xcr1*^{-/-}マウスで明らかな肝障害の増悪が認められた。さらに免疫組織学的解析においても、野生型と比較して *Xcr1*^{-/-}マウスで、肝臓への血球の浸潤は増強されていた。

野生型マウスに APAP を投与し、肝臓で XCL1 および XCR1 の mRNA を定量したところ、10 時間で減少した後に増加し、30 時間で元の水準に戻った。APAP を投与した *Xcr1*^{-/-}マウスの肝臓における XCL1 の発現についても同様の結果が得られた。これは APAP 肝障害によって壊死した XCL1 陽性細胞が再び補充されたことによると考えられる。つまり、XCR1 陽性細胞の肝臓への浸潤が炎症の抑制に関与していることが示唆された。

今後も引き続き蛍光二重染色による XCR1 陽性炎症細胞の同定等を行っていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------