

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591579
 研究課題名 (和文) 自然免疫を介した炎症防御機構の臓器間相互関連の解明と、その臨床応用に関する研究
 研究課題名 (英文) Investigation of organ interaction in the innate immune system during inflammation.
 研究代表者
 河野 寛 (KONO HIROSHI)
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
 研究者番号：40322127

研究成果の概要：

腹腔内感染に起因する急性肺障害発症機序における Kupffer 細胞 (KC) の役割を検討。ラットに KC 抑制物質塩化ガドリニウム (GD) を投与後、盲腸結紮穿孔刺腹膜炎 (CLP) モデルを作成、死亡率と肺障害を検討。死亡率はコントロール (C) 群で 60%、GD 群は 12 時間以内に全て死亡。GD 群で C 群と比較し急性肺障害が急性増悪。IL-10 の発現は、GD 群では発現が低下。炎症時に肺と肝臓の自然免疫系は、相互に関連しあっている事実が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：Kupffer 細胞, サイトカイン, 急性肺障害, ケモカイン, 炎症性細胞腹膜炎

1. 研究開始当初の背景

肝臓のマクロファージである Kupffer 細胞は肝類洞に存在し、食食による異物除去能、活性酸素やサイトカインなどのメディエーター産生能、抗原提示能など種々の働きを有しており、自然免疫機構において非常に重要な役割を果たしている。一方、その過剰な活性化は宿主にとって有害であり臓器障害を引き起こすことが知られている。しかし、その機序の詳細はいまだ明らかではない。

一方、これまで申請者は、この多様な機能を有する Kupffer 細胞に注目し様々な動物モデルを用いて、急性および慢性肝疾患発生機

序における活性化 Kupffer 細胞の関与について研究を展開してきた。

(1) 重症エンドトキシン血症時の Kupffer 細胞の役割に関する研究：KC 抑制物質塩化ガドリニウム (以下、GD) を投与後、ラット致死量エンドトキシン (10mg/kg; 以下、Etx) 血症モデルを作成し、肝障害と死亡率に与える影響を検討した。その結果、GD 投与により肝障害と致死率が有意に改善された。その機序の 1 つとして KC 由来のスーパーオキシドが関与していることを解明し、Etx 誘発

肝障害における活性化 KC の関与と、その抑制効果の意義を報告した (Kohno et al. Eur Surg Res. 1997; 29:176-86.)。

(2) 肝切除後感染症における Kupffer 細胞の活性化抑制の意義: 70%肝切除ラットに非致死量 Etx (5mg/kg) を投与し検討した。その結果, GD 投与により致死率と肝障害は完全に改善され、また、肝切除ならびに Etx 投与により低下した動脈血中ケトン体比が有意に改善され、KC 活性化の抑制が肝細胞機能保護の点からも有用であることを解明し報告した (Kono et al. J Surg Res. 2001; 96:204-210.)。

(3) エンドトキシン血症時の末梢血中サイトカイン活性値と Kupffer 細胞のサイトカイン産生能の比較: LPS 投与後血清中 TNF- α ならびに IL-6 値と、LPS 刺激下分離 KC の TNF- α と IL-6 の産生能を GD 投与群と非投与群で比較検討した。血清 TNF- α 値は両群に差を認めなかったが、IL-6 は 9 時間で GdCl₃ 投与群が非投与群と比較して有意に低下していた。一方、分離 KC の TNF- α 産生能は GD 投与群で有意に低下していたが、IL-6 産生能は反対に GD 投与群で上昇した。この結果から、末梢血中サイトカイン値が臓器局所での活性を反映していない可能性が明らかとなった (Kono et al. J Surg Res 2002;106:179-187.; Kono et al. J Surg Res. 2005;129:176-89.)。また、この検討において、KC には形態学的に small と large1 の亜種が存在し、GD 投与ラットから分離された KC は、形態的に small KC であった結果より、GdCl₃ の効果は large KC を減少させることが解明された。これらの亜種は形態学的のみならず、LPS 刺激に対する反応がそれぞれ異なる事実も報告した。(Kono et al. J. Surg. Res. 2002;106:179-187.; Kono et al. J Surg Res. 2005;129:176-89.)。

(4) アルコール性肝障害発症機序における、腸管由来エンドトキシンによる活性化 Kupffer 細胞の関与 - 特にフリーラディカルの関与について - : アルコール肝障害の発症機序を慢性 Etx 血症に起因する病態としてとらえ、この病態を最もよく反映するラット胃瘻モデル Tsukamoto-French model を作成し検討を行った。その結果フリーラディカル発生源は KC に存在する NADPH oxidase である事実を解明した。次に、ノックアウトマウスを使用すべく、この胃瘻モデルのマウスへの応

用を試みマウス胃瘻モデルとアルコール性肝障害モデルを世界に先駆けて開発した。さらに、マウス胃瘻モデルを肝細胞由来フリーラディカルの産生源として重要と報告されてきた Cytochrome P4502E1 ノックアウトマウス (Kono et al. Am J Physiol. 1999; 277: G1259-67.)、ならびに NADPH oxidase ノックアウトマウス (Kono et al. J Clin Invest. 2000;106: 867-72.) に応用し検討した。その結果、KC 由来のフリーラディカルがアルコール性肝障害発症機序において非常に重要であることが明らかとなり、アルコール性肝障害発生機序においてアルコールに起因する慢性 Etx 血症により活性化された KC が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(5) 腹膜炎に起因する急性肺障害発症機序における肝臓と肺の臓器相関: 腹腔内感染に起因する急性肺障害発症機序における KC の役割を、ラット腹膜炎モデルで検討した。雄性 S.D.種ラットを用い GD 前投与後、盲腸結紮穿刺腹膜炎 (CLP) モデルを作成し、致死率、臓器障害を肝と肺で検討した。CLP 後 7 日目死亡率はコントロール群 (C 群、生理食塩水投与) で 80%、GD 群は 12 時間以内に全て死亡した。死因である急性肺障害は GD 群で C 群と比較し増悪した。炎症性サイトカイン TNF- α 発現は両群で差を認めず、炎症性サイトカイン IL-10 の発現は C 群で肝と肺ともに CLP 後早期に増加を認め、GD 群で発現が低下した。KC 消去に伴う IL-10 抑制が宿主の生存に関与する事実が解明された。さらに、致死性サイトカイン HMGB1 血清値は GD 群で、C 群と比較し高値であった。KC は感染免疫において中心的な役割を果たしていた。また、炎症時に肺と肝臓は、相互に関連しあっている事実を解明した。(Kono et al. J Surg Res. 2005;129:176-189.; Kono et al. J Leukoc Biol. 2006;79:809-817.; Kono et al. J Surg. Res. 2008 In press)。

(6) 腹膜炎における脾臓の役割: 腹腔内感染の臓器障害発症機序における脾臓の役割を CLP モデルで検討した。雄性 S.D.種ラットを用い、脾摘(Spx) 7 日後に GD 投与、CLP モデルを作成し、血清 HMGB1 値と致死率を検討した。結果;死亡率はコントロール群 (C 群、生理食塩水投与) で 60% (CLP 後 7 日)、GD 群は 12 時間以内に全て死亡。しかし、Spx 群ならびに Spx + GD 群では致死率は C

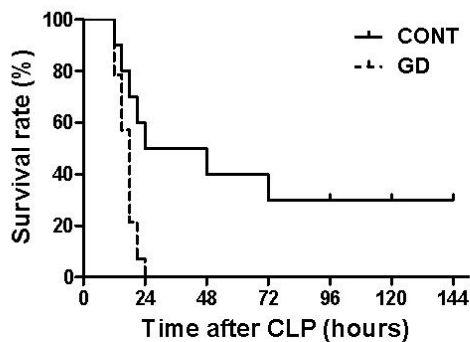
群と同程度で差を認めなかった。HMGB1の血清値は、GD群で増加したが、Spx群ならびにSpx + GD群ではHMGB1の上昇は認めず、HMGB1の主な産生臓器は脾臓であり、脾臓と肝臓が門脈を介して臓器相関している可能性が考えられた。

2. 研究の目的

自然免疫学的に生体に対して本来は有益であり、合目的であるべき各臓器マクロファージの細胞機能が、どのような環境、病態のもとで宿主にとって有害な反応を引き起こすのかを解明することである。その機序の解明には、以前より申請者が動物モデルにおいて検討を進めてきた Kupffer 細胞の形態的・機能的異種性の解析にとどまらず、末梢血、脾臓、肺、消化管、骨髄などの全身各臓器のマクロファージについても同様に解析し、生体内の防御機構を解明する必要がある。また、これまでの急性感染症ならびにエンドトキシン血症モデルによって得られた知見を、さらに検討を展開し慢性感染症モデルにおいても解析を行う必要があると考える。

3. 研究の方法

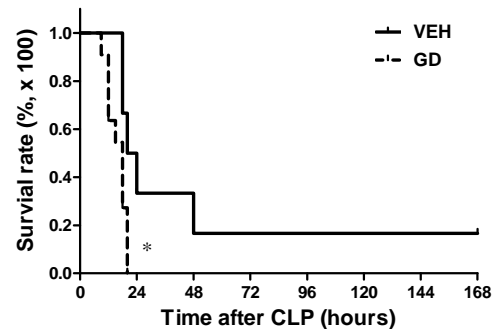
検討1: 雄性 S.D.種ラット (200g body weight) を用い、肝マクロファージ抑制物質である塩化ガドリニウム (GD 群) を 24 時間前に投与後、盲腸結紮穿刺腹膜炎 (CLP) モデルを作成した。7 日目までの致死率を検討した。また、臓器障害を肝・肺で検討した。さらに、両臓器での炎症性メディエーター発現 (サイトカイン、ケモカイン) を検討した。



検討2: 腹腔内感染の臓器障害発症機序における脾臓の役割を CLP モデルで検討した。雄性 S.D.種ラット (200g body weight) を用い、脾摘(Spx) 7 日後に肝マクロファージ抑制物質である塩化ガドリニウム (GD 群) あるいは liposome-entrapped dichloromethylene diphosphonate (lipo-MDP) を 24 時間前に投与後、盲腸結紮穿刺腹膜炎 (CLP) モデルを作成した。7 日目までの致死率と血清 HMGB1 値を検討した。

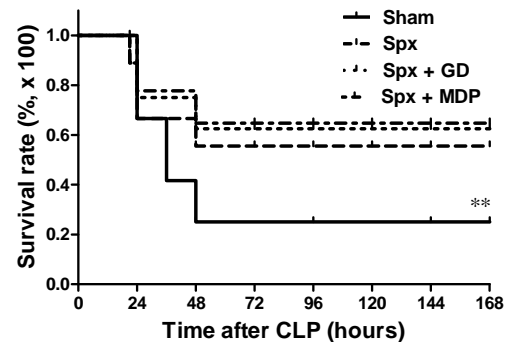
4. 研究成果

検討1: 死亡率はコントロール群 (C 群、生理食塩水投与) C 群で 60% (CLP 後 7 日目)、GD 群は 12 時間以内に全て死亡した。

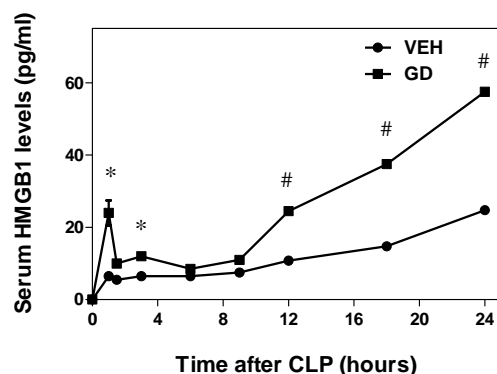


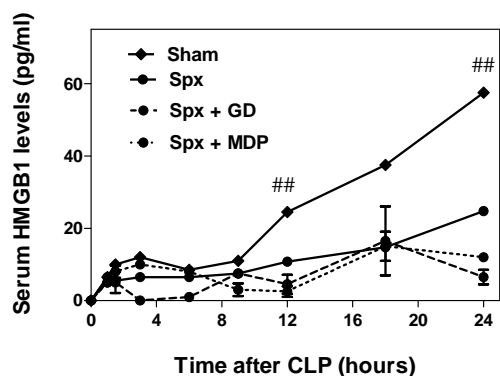
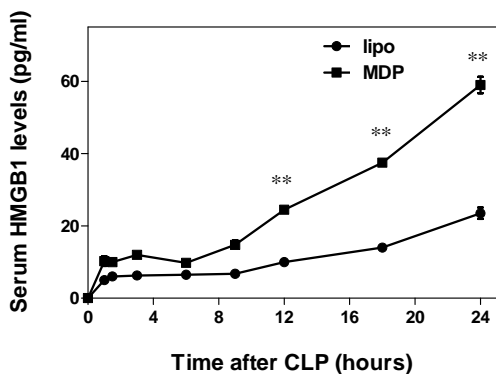
肝障害は認めなかった。死因は、急性肺障害であり、GD 群で C 群と比較し障害が急性増悪した。肝臓と肺における pro-inflammatory cytokine である TNF- α 発現は両群で差を認めなかった。一方、anti-inflammatory cytokine である IL-10 の発現は、C 群では肝ならびに肺とともに CLP 後早期に増加を認めたが、GD 群では発現が低下していた。これに伴い、各種炎症性サイトカインならびにケモカインの肺での発現は GD 群で増加した。

検討2: 死亡率はコントロール群 (C 群、生理食塩水投与) で 60% (CLP 後 7 日)、GD 群は 12 時間以内に全て死亡。しかし、Spx 群ならびに Spx + GD 群では致死率は C 群と同程度で差を認めなかった。



Spx : 脾摘
致死率





血清 HMGB1 値

HMGB1 の血清値は、GD 群で増加したが、Spx 群ならびに Spx + GD 群では HMGB1 の上昇は認めず、HMGB1 の主な産生臓器は脾臓であり、脾臓と肝臓が門脈を介して臓器相関している可能性が考えられた。

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 2 件)

- ① Kono H, Fujii H, Tsuchiya M, Hirai Y, Ishii K, Hosomura N: Inhibition of the Kupffer cell increased serum HMGB1 levels and the mortality in a rat septic peritonitis model. J. Surg. Res. 2009 In press (査読有り)
- ② Kono H, Fujii H, Tsuchiya M, Hirai Y, Ishii K, Hosomura N: Inhibition of the Kupffer cell and neutralization of IL-10 increase the expression of chemokines in the lung in a rat peritonitis model J. Surg. Res. 2008 150:169-82. (査読有り)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Hiroshi Kono, Kenichi Ishii, Naohiro Hosomura, Maasto Ogiku, Hideki Fujii: Inhibition of the Kupffer cell increases serum high-mobility group protein levels and mortality in a rat septic peritonitis model; organ interaction between the liver and the spleen, 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, 2008. 10. 31~11. 4, San Francisco, CA, U.S.A.
- ② 河野 寛, 石井健一, 細村直弘, 田中暢之, 藤井秀樹: 細菌性腹膜炎において、肝類洞免疫能の低下は High-mobility group protein (HMGB) 1 発現を低下させる, 第 44 回日本肝臓学会総会, 2008.6.5~6.6, 愛媛
- ③ 河野 寛, 石井健一, 細村直弘, 田中暢之, 藤井秀樹: 細菌性腹膜炎において、肝類洞免疫機能の低下は High-mobility group protein (HMGB) 1 発現を増加させる, 第 108 回日本外科学会定期学術集会, 2008.5.15~5.17, 長崎
- ④ 河野 寛, 石井健一, 藤井秀樹: 炎症性腸疾患の発症機序におけるマクロファージの関与: macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 役割, 第 94 回日本消化器病学会総会, 2008.5.8~5.11, 福岡
- ⑤ 河野 寛, 藤井秀樹: 細菌性腹膜炎において、肝類洞免疫機能の低下は High-mobility group protein (HMGB) 1 発現を増加させる, 第 44 回日本腹部救急医学会総会, 2008.3.14~3.15, 横浜
- ⑥ Hiroshi Kono, Ishii Kenichi, Naohiro Hosomura, Nobuyuki Tanaka, Masanori Matsuda, Hideki Fujii: HCV-related proteins induce proinflammatory cytokine production by the human Kupffer cell via the MyD88-dependent signaling cascade. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, 2007. 11. 2~11. 6, Boston
- ⑦ Hiroshi Kono, Ishii Kenichi, Naohiro Hosomura, Nobuyuki Tanaka, Masanori Matsuda, Hideki Fujii: Inhibition of the Kupffer cell increases serum HMGB1 levels and the mortality in a rat septic peritonitis model., 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, 2007. 11. 2~11. 6, Boston

- ⑧ 河野 寛, 土屋雅人, 平井 優, 雨宮秀武, 浅川真巳, 松田政徳, 藤井秀樹: 肝類洞機能低下は肺障害を惹起するー肝肺臓器相関ー, 第19回日本肝胆膵外科学会総会, 2007.6.6~6.8, 横浜
- ⑨ 河野 寛, 平井 優, 細村直弘, 石井健一, 田中暢之, 松田政徳, 藤井秀樹: 肝類洞免疫能の低下が急性肺傷害を惹起するー肝・肺臓器相関ー, 第43回日本肝臓学会総会, 2007.5.31~6.1, 東京
- ⑩ 河野 寛, 土屋雅人, 平井 優, 雨宮秀武, 浅川真巳, 松田政徳, 藤井秀樹: 肝類洞免疫能の低下が急性肺障害を惹起するー肝・肺臓器相関ー, 第107回日本外科学会定期学術集会, 2007.4.11~4.13, 大阪
- ⑪ Hiroshi Kono, Masato Tsuchiya, Naohiro Hosomura, Kenichi Ishii, Nobuyuki Tanaka, Masanori Matsuda, Hideki Fujii: HCV-related proteins directly activate the Kupffer cell isolated from human liver tissues. The 17th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, 2007. 3. 27~3. 30, Kyoto
- ⑫ Hiroshi Kono, Masanori Matsuda, Hideki Fujii.: Eदारavone prevents acute ischemia-reperfusion injury of the liver by limiting free radical-mediated tissue damage. 1st Biennial Congress of AHPBA, 2007. 3. 21~3. 23, Fukuoka, Japan
- ⑬ 河野 寛, 松田政徳, 藤井秀樹: 診療と研究のトピックス 肝類洞機能低下は肺障害を惹起するー肝肺臓器相関ー, 第43回日本腹部救急医学会総会, 2007.3.8~3.9, 東京

(3)連携研究者
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

河野 寛 (KONO HIROSHI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 40322127

(2)研究分担者

松田 政徳 (MATSUSA MASANORI)
山梨大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 80242642

平井 優 (HIRAI YU)
山梨大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90436866