

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23873

研究課題名(和文)トリプトファン代謝制御による肝幹細胞の増殖と分化機構の解明

研究課題名(英文)The deficiency of indoleamine 2,3-dioxygenase 2 enhances liver regeneration in mouse after partial hepatectomy

研究代表者

安藤 達也(ando, tatsuya)

藤田医科大学・共同利用研究設備サポートセンター・ポスト・ドクター

研究者番号：50796068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：WTマウスおよび各種トリプトファン代謝酵素欠損マウスに70%部分肝切除を実施し、肝体重を用いて肝再生能力を評価した。その結果、Ido2-KOマウスにおいて肝再生が促進する結果となった。この時の肝幹細胞(Lgr5陽性細胞)の量的変化と分化マーカー(Albumin)を定量したが、肝再生モデルでは変化を認めなかった。一方で、肝再生に関与する炎症性サイトカイン発現を確認したところ、Ido2-KOマウス優位に増加していた。

以上より、部分肝切除後における肝再生は、肝幹細胞の関与ではなく、Ido2遺伝子欠損による炎症性サイトカイン産生の亢進が大きく関与している結果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肝臓にて発現するIDO2の役割を肝再生の観点から明らかにしたことで、肝再生が必要な急性疾患、移植後の予後の安定化に寄与する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：After loss of hepatic cells by hepatectomy for liver transplantation or acute liver damage, liver regeneration starts immediately and hepatic failure is prevented. In this study, we examined the roles of Ido2 in the liver regeneration using Ido2 gene deficient mice. The liver-body weight ratio significantly increased in Ido2-KO mice compared to that in WT mice after PHx. The number of Ki-67 and PCNA positive cells per field significantly increased in Ido2-KO mice compared to that in WT mice. The mRNA expression of IL-6 and TNF- α in the intrahepatic MNC of Ido2-KO mice significantly increased compared to that of WT mice. NF- κ B (p65) intranuclear transport facilitated in Ido2-KO mice compared to WT mice after LPS stimulation. In conclusion, the results in the present study suggested that Ido2 deficiency enhanced NF- κ B pathway and augmented inflammatory cytokine production in the intrahepatic MNC after PHx.

研究分野：免疫学

キーワード：肝再生 炎症 トリプトファン代謝酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓は再生する臓器として知られ、生体間移植が行われているが、移植後の拒絶反応(GVHD)などの様々な問題が存在する。肝再生は、肝実質細胞が膨化や細胞増殖を行うことで欠損した部分を補い、肝機能を確保するとされている。この過程に、炎症反応(サイトカインの放出や炎症性細胞の浸潤など)と細胞増殖シグナル(細胞増殖周期の亢進や成長因子の誘導)が必須であることが知られている。また、肝再生において、肝幹細胞が成熟肝実質細胞へ分化することが知られているが、再生完了時における分化・増殖の停止シグナルの存在は現在のところ明確になっていない。

トリプトファン代謝には、インドールアミン酸素添加酵素(IDO1、IDO2)とTDOによるキヌレニン経路への代謝が知られている。この過程で生成されるキヌレニン等の代謝産物は、リガンドとしてAhRに作用し免疫細胞抑制的に作用することが知られている。これらの作用の中心は、炎症反応により誘導されたIDO1による代謝の結果と考えられてきた。しかし、近年IDO2が発見され、非炎症時においても肝臓などで恒常的に誘導され生理学的な作用を有するとの報告があるが、未だにその役割は不明である。一方で、AhRは細胞の分化、成熟を制御することが知られている。したがって、肝臓におけるIDO2やTDOの恒常的な発現は、トリプトファン代謝を通じ、AhRのリガンドあるキヌレニン等の産生を制御することで、肝再生時などで出現する幹細胞が分化する課程において、重要な役割を担っているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、肝実質細胞に恒常的に発現するトリプトファン代謝酵素(IDO2およびTDO)とその代謝産物の役割を、肝実質細胞の増殖・分化の観点から明らかにする。また、トリプトファン代謝産物と肝再生時の分化の仕組みや再生完了時の増殖停止機構の解析を通して、肝移植後の予後の安定化や、肝移植に代わる新たな肝幹細胞移植療法の確立に寄与し、今後の再生医療に役立てることとする。

3. 研究の方法

野生型(WT)マウスと各種トリプトファン代謝酵素ノックアウトマウス(Do1-KO, Do2-KO, Tdo-KO, KMO-KO)に、70%部分肝切除を施行し肝再生モデルを作製する。肝再生時における肝幹細胞の出現と部位を、幹細胞マーカー(Lgr5)を用いて免疫染色で確認する。同時に、Lgr5陽性細胞におけるIDO2/TDO発現を蛍光免疫二重染色にて組織学的に評価する。

肝再生モデルより経時的に肝臓を採取し、IDO2/TDOの発現量の変化と代謝産物の産生量を確認する。また肝細胞分化段階を反映する分子マーカー(Albumin, Axin2)とトリプトファン代謝酵素の発現を蛍光免疫二重染色で評価する。これにより、幹細胞や細胞分化段階におけるトリプトファン代謝の変容や、その周辺細胞の変化(肝幹細胞の周囲で発現が亢進する、あるいは減少するなど)を評価する。

IDO2欠損マウスにおける、肝再生促進の機序を解明するために、肝実質細胞と肝内単核球を分離し、それぞれの細胞におけるDo2 mRNA発現の変化を測定した。また、肝再生に必須とされる炎症性サイトカインをリアルタイムPCRとELISA法にて測定した。

IDO2遺伝子欠損による炎症性サイトカイン産生の増強メカニズムを解明するために、炎症性サイトカイン産生に關与するNF- κ B経路を免疫染色とウエスタンブロット法にて確認した。

4. 研究成果

野生型(WT)と各種トリプトファン代謝酵素ノックアウトマウス(Do1-KO, Do2-KO, Tdo-KO, KMO-KO)における肝再生能の変化

WTマウスおよび各種トリプトファン代謝酵素欠損マウス(IDO1-KO, IDO2-KO, KMO-KO)に70%部分肝切除(partial hepatectomy: PHx)を実施し、肝体重を用いて肝再生能力を評価した。その結果、Do2-KOマウスにおいてWTマウスと比較し肝再生が促進する結果となった。この時の、細胞増殖能をPCNA染色で確認したところ、Do2-KOにおいて、優位にPCNA陽性細胞が増加する結果となった。本研究で着目していた肝幹細胞(Lgr5陽性細胞)の量的変化を、免疫組織化学染色およびウエスタンブロット法にて評価したところ、各マウスで変化を認めなかった。さらに

確認として、肝実質細胞の分化マーカーとして知られる Albumin を定量したが、肝幹細胞マーカーと同様に、各マウス間において大きな変化が認められなかった。また、他の肝再生モデルである、四塩化炭素を用いた薬剤誘導性肝障害モデルでも同様の実験を行ったが、肝幹細胞の出現や量的変化を確認するに至らなかった。

以上の結果より、部分肝切除後における肝再生では、肝幹細胞の増加や分化に依存しないと判断した。しかしながら、Ido2-KO マウスでは、肝実質細胞の増殖を伴う再生の亢進が確認されていることから、Ido2 の肝再生に及ぼす影響を検証した。

・ 部分肝切除後の Ido2 発現の変化とトリプトファン代謝産物の変化

改めて WT マウスと Ido2-KO の肝再生能を経時的に比較したところ、やはり肝実質細胞の増殖を伴う、肝再生の促進が確認された。この時の Ido2 発現を確認したところ、肝内単核球で部分肝切除後に発現が増加していることが確認された。一方で、トリプトファン代謝産物には変化が認められなかった。

・ 部分肝切除後の炎症性サイトカイン発現量の比較

肝再生に関与する炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-6) 発現をリアルタイム PCR で確認したところ、Ido2-KO マウスで WT マウスに比べ優位に増加していた。また ELISA にて血清中のサイトカイン濃度を確認したところ、WT マウスに比べ Ido2-KO マウスで有意な増加を確認した。

・ Ido2 遺伝子欠損における炎症性サイトカイン産生増加の機序解明

Ido2-KO マウスにおける炎症性サイトカイン産生の亢進機序を解明するために NF- κ B の核内移行を免疫細胞化学染色で確認したところ、Ido2-KO マウス由来のマクロファージにおいて、lipopolysaccharide 刺激後の早期の核内移行が確認された。また定量化のためにウエスタンブロットを行ったところ、免疫細胞化学染色の結果と同様に、WT マウス由来のマクロファージに比べ、Ido2-KO マウス由来のマクロファージで更新していることが確認された。

以上の結果より、部分肝切除後における肝再生は、肝幹細胞の関与ではなく、Ido2 遺伝子欠損による炎症性サイトカイン産生の亢進が大きく関与している結果が確認された。

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
---------	---------