

機関番号：13501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591516
 研究課題名（和文） 肝臓機能重視した新しい視点に基づく人工肝臓補助システムの開発
 研究課題名（英文） Development of artificial liver support system combining with liver cells and Kupffer cells
 研究代表者
 藤井 秀樹（FUJII HIDEKI）
 山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授
 研究者番号：30181316

研究成果の概要（和文）：人工肝臓補助システムの開発に必須である肝 Kupffer 細胞の機能をさらに解明した。その結果、肝 Kupffer 細胞は全身感染症をサイトカインネットワークを通じて制御するとともに、免疫環境を操作することにより制御していることが判明した。さらにこの免疫環境の変動が肝臓癌に作用していることも判明した。また、肝 Kupffer 細胞が種々の薬剤ならびに食品で制御可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：For making up a hybrid type artificial liver support system, functions of the Kupffer cell must be analyzed. As results, the Kupffer cell controlled systemic inflammation such as a sepsis with cytokine network and systemic immune system. And more inflammatory cytokine from the Kupffer cell cause a hepatocellular carcinoma. Activation of the Kupffer cell can be suppressed by administration of some drugs and foods such as medium-chain triglycerides.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工肝臓補助システム、肝実質細胞、肝 Kupffer 細胞、サイトカイン、盲腸結紮、穿孔モデル、肝免疫、十全大補湯、中鎖脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性肝疾患を背景にした外科手術後、あるいは大量肝切除を余儀なくされる悪性腫瘍手術後の急性肝不全は、いまだ頻度の高いまた致命的な病態であり、早急な治療法の確立が望まれる。血漿交換療法、近年では生体肝移植などが施行されるが、その有効性あるいはドナー不足などの問題は解決されていなかった。

(2) 海外では分離肝細胞を工学装置に組み込んだハイブリッド型人工肝臓が開発され臨床応用されているが、いまだ充分には普及していない。これは、肝細胞の生体外培養における分化機能の維持、複雑多岐にわたる機能を有する肝臓組織の再構築の困難さによるものと考えられる。特に肝細胞を生体内と同等の機能を維持したままに培養するかと

いう点は重要であり、モジュールの工夫、HGFの遺伝子導入、ES細胞の応用などが試みられているが解決すべき課題はあまりにも多かった。

- (3) 申請者は肝Kupffer細胞を適切に制御することにより、肝細胞障害を抑制し、肝再生を促進することを明らかにしていた(J Surg Res 2002、J Surg Res 2005)。
- (4) 申請者は腸肝臓器関連の面から、人工肝臓補助システムが必要とされる病態においては、腸管からの種々の因子により肝臓に過剰の負荷が生じていることを明らかにし、さらにこれらの負荷が肝Kupffer細胞により制御されている事実を明らかにしていた(Am J Physiol 2004)。
- (5) 人工肝臓補助システムによるサポートが必要とされる患者が有する肝疾患以外の負因子(例えば腹腔内膿瘍により発生した敗血症による多臓器不全の一表現型としての肝不全)も肝Kupffer細胞を人工肝臓補助システムに組み込むことにより有効に制御できる結果を得ていた(J Leukoc Biol 2006)。
- (6) 肝細胞、肝Kupffer細胞ともにスフェロイドの形態が理想的であるが、昇温時ゲル化型熱可逆ハイドロゲルによりスフェロイド作製は容易であり、すでに実用化されていた。さらに、高密度に培養するモジュールとして特殊なポリウレタン膜も開発されていた(H. Kurosawa, et al.: Morphology and albumin secretion of adult hepatocytes cultured on a hydrophobic porous expand polytetrafluoroethylene membrane. J Biosci Bioeng 95: 59-64, 2003)。申請者はそのいずれも使用しうる状態にあった。

2. 研究の目的

本申請研究では、より臨床効果を高めることに重点をおいた癌ワクチン療法の開発をめざし、新規に同定した扁平上皮癌に特異的に発現する3種類の癌拒絶抗原を用い、食道がんを対象とした癌ワクチン療法第I相試験を実施し、免疫学的評価と安全性評価、およびその臨床効果を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 人工肝臓補助システムが有効となり得る病態の解明を行った。
 - ① 急性肝障害モデルとして肝温虚血再還モデルを作成し、全身への炎症の重症度に関与するhigh mobility group box 1 (HMGB1)の血中の発現と、細胞膜安定化作用を有するグリチルリチンの投与効果を検討した。

- ② 流盲腸結紮穿刺(腹腔内膿瘍)ラットモデルにおいて、肝Kupffer細胞を抑制し、high mobility group box 1 (HMGB1)の動態とさらに脾臓の関与をnon-entrapped liposomeの投与と脾臓摘出を行った。
 - ③ interleukin 17A Knockoutマウスを使用し、腹膜炎モデルでのIL-17Aの関与を検討した。
 - ④ 盲腸結紮穿刺(腹腔内膿瘍)ラットモデルにおいて、肺障害が惹起されることから、肺障害に関与する肝Kupffer細胞をgadolinium chloride(GdCl₃)の投与により抑制し、さらにIL-10の関与を検討した。
 - ⑤ C型肝炎による肝障害(最終的には慢性肝炎から肝硬変に移行し肝不全に至り、人工肝臓補助システムの適応になる)における肝Kupffer細胞の肝炎症の機序を、HCV関連蛋白であるCore、NS3、NS4、NS5を投与しそのサイトカイン産生の程度から検討した。
 - ⑥ macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)により誘導されるmacrophageが盲腸結紮穿刺(腹腔内膿瘍)ラットモデルの病態にどのように関与するかを、M-CSF欠損osteopetrotic(op/op)マウスを使用して検討した。
- (2) 人工肝臓補助システムの有効性を高めるために生体防御という観点から補助療法の可能性についての検討を行った。
 - ① 肝障害時におけるオリーブオイル投与の有用性を検証するためにcarbon tetrachloride(CCL₄)で処理したマウスにリノレン酸であるコーンオイルとオレイン酸であるオリーブオイルを投与し肝線維化を検討した。
 - ② 腸管の障害が肝臓に与える影響を中鎖脂肪酸とコーンオイルをラットに投与し、さらに非致死量のエンドトキシンを投与することにより検討した。
 - ③ 漢方薬である十全大補湯が、肝Kupffer細胞の活性化を抑制するとの仮説から、C型肝炎による慢性炎症性肝障害を抑制し、ひいては炎症による肝発癌を抑制するか否かを、ヒト肝細胞癌症例に投与し検討した。

4. 研究成果

- (1) 肝温虚血再還流モデルにおける全身炎症性症候群には high mobility group box 1 (HMGB1) が強く関与しており、細胞膜安定化作用を有するグリチルリチンの投与はそれを抑制する。

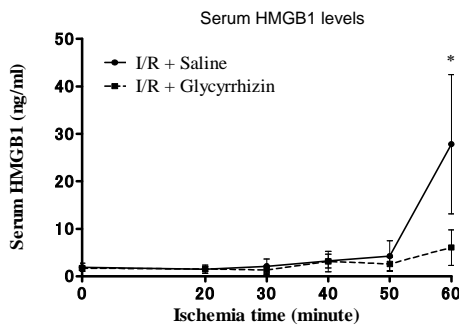


図 1

- (2) 肝臓、脾臓ともに敗血症性腹膜炎時には生体防御的に働く。また、その際には肝臓に遊走してくる macrophage の一部は脾臓由来のものであることが判明した。この成果は感染症における肝臓・脾臓臓器相関を解明する手がかりとなる。
- (3) 敗血症性腹膜炎を作成した IL-17A Knockout マウスでは生存率は不良であり、その背景に血中細菌の増殖と high mobility group box 1 (HMGB1) の増加が認められた。また、FOXP3 である制御性 Tsaibou が脾臓に多く見られた。このことは敗血症において炎症性サイトカインの増加とともに、免疫抑制状態が引き起こされることが明らかになった。感染防御に免疫機能の保持が重要であることを意味しておりインパクトが高い。
- (4) 敗血症性腹膜炎時には、肝 Kupffer 細胞の抑制と IL-10 の抑制は炎症細胞の遊走を引き起こす chemokine が発現され、急性肺障害が惹起されることが明らかになった。
- (5) HCV 関連蛋白のなかでも NS3 が肝 Kupffer 細胞を持続的に活性化し、持続的なサイトカインの産生により肝臓に炎症を惹起することが明らかになった。またこれらのサイトカインが肝細胞に DNA 損傷を与え発癌に関与することも明らかになった。HCV 関連肝発癌の機序として興味深く、今後の発癌という側面からの展開が期待される。
- (6) 敗血症時には macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) により誘導さ

れる成熟 macrophage がエンドトキシンを処理し、その結果 high mobility group box 1 (HMGB1) の賛成も抑制し、その病態を改善することが明らかになった。

- (7) オレイン酸であるコーンオイルは carbon tetrachloride (CCL(4)) で処理したマウスの肝線維化を抑制した。
- (8) medium-chain triglycerides (中鎖脂肪酸) の投与は小腸粘膜の増殖を促し、さらに goblet cell からの粘液分泌を促進し、内因性の感染防御能を高めることが明らかになった。この成果は炎症性腸疾患にも応用されるインパクトの高い成果である。

コーンオイル、中鎖脂肪投与時の敗血症発生による致死率

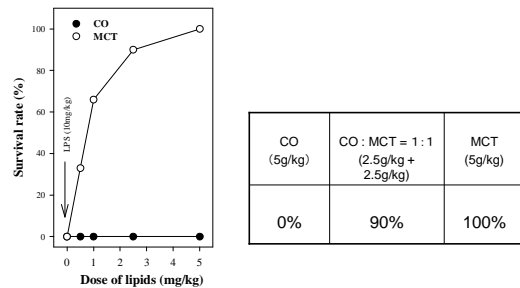


図 2

- (9) 漢方薬である十全大補湯は、肝細胞癌切除後の再発を有意に抑制した。この成果は、慢性肝疾患からの肝発癌が汎用されている薬剤で制御可能であることを示すインパクトの高いものである。

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 11 件)

- Amemiya H, Kono H, Fujii H: Liver regeneration is impaired in macrophage colony stimulating factor deficient mice after partial hepatectomy the role of M-CSF-induced macrophages. J Surg Res. 2011;165(1):59-67 (査読有)
- Hosomura N, Kono H, Tsuchiya M, Ishii K, Ogiku M, Matsuda M, Fujii H: HCV-related proteins activate Kupffer cells isolated from human liver tissues. Dig Dis Sci. 2011; 56(4): 1057-64. (査読有)

- ③ Kono H, Fujii H, Ogiku M, Hara M, Tsuchiya M, Ishii K, Hosomura N: The Kupffer Cell Inhibition Exacerbates but Splenectomy Prevents Mortality in a Rat Septic Peritonitis Model. J Surg Res 2011 [Epub ahead of print] (査読有)
- ④ Ogiku M, Kono H, Hara M, Tsuchiya M, Fujii H: Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Polymicrobial Sepsis According to Studies Using IL-17A Knockout Mice. J Surg Res. 2010 [Epub ahead of print] (査読有)
- ⑤ Kono H, Fujii H, Ogiku M, Tsuchiya M, Ishii K, Hara M: Enteral diets enriched with medium-chain triglycerides and N-3 fatty acids prevent chemically induced experimental colitis in rats. Transl Res. 2010;156(5):282-91 (査読有)
- ⑥ Tsuchiya M, Parker JS, Kono H, Matsuda M, Fujii H, Rusyn I: Gene expression in nontumoral liver tissue and recurrence-free survival in hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinoma. Mol Cancer. 2010; 9:74 (査読有)
- ⑦ Kono H, Fujii H, Ishii K, Hosomura N, Ogiku M: Dietary medium-chain triglycerides prevent chemically induced experimental colitis in rats. Transl Res. 2010;155(3):131-41 (査読有)
- ⑧ Tanaka N, Kono H, Ishii K, Hosomura N, Fujii H: Dietary olive oil prevents carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice. J Gastroenterol. 2009;44(9):983-90 (査読有)
- ⑨ Ishii K, Kono H, Hosomura N, Tsuchiya M, Ohgiku M, Tanaka N, Fujii H: Medium-chain triglycerides enhance mucous secretion and cell proliferation in the rat. J Gastroenterol. 2009;44(3):204-11 (査読有)
- ⑩ Tsuchiya M, Kono H, Matsuda M, Fujii H, Rusyn I: Protective effect of Juzen Taiho to on hepatocarcinogenesis is mediated through the inhibition of Kupffer cell-induced oxidative stress.

Int J Cancer. 2008;123(11):2503-11.
(査読有)

- ⑪ Kono H, Fujii H, Tsuchiya M, Hirai Y, Ishii K, Hosomura N, Tanaka 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(2):169-82. (査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① Kono H, Fujii H. Cholestasis-induced hepatic injury and fibrosis are attenuated in IL-17A-deficient mice. The Liver Meeting 2010 AASLD's 61st Annual Meeting, 2010.10.29 ~ 11.2, Boston, MA
- ② Kono H, Fujii H, Ogiku M, Ishii K, and Hosomura N. Inhibition of the Kupffer cell deteriorates and splenectomy prevents mortality in a rat septic peritonitis model. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, 2009. 10.30~11.3, Boston, MA
- ③ Kono H, Ogiku M, Hosomura N, and Fujii H. Specific role of the interleukin-17 in neutrophil recruitment into the liver after ischemia/reperfusion. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, 2009. 10.30~11.3, Boston, MA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 秀樹 (FUJII HIDEKI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部
・教授
研究者番号: 30181316

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし