

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591745

研究課題名（和文） 炎症防御における自然免疫系を介した臓器相互関連の解析と、その臨床応用に関する研究

研究課題名（英文） Investigation of relationship between the liver and spleen via the portal circulation in sepsis

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（和文）：細菌性腹膜炎における肝臓自然免疫と脾臓の役割を検討した。ラットを用い正常群、肝マクロファージ（KC）抑制群、脾摘群、脾摘+KC抑制群で結紮穿刺腹膜炎モデルを作成し検討した。致死率は正常群と比較しKC抑制群で上昇したが、脾摘群ではKC抑制の有無に関係なく正常群と同程度であった。この結果より腹膜炎において、脾臓と肝臓の臓器相関が示唆されるとともに、細菌性腹膜炎における脾臓の重要性が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate whether inhibition of Kupffer cells (KCs) affects the expression of HMGB1 and mortality in septic peritonitis. Furthermore, the role of the spleen in septic peritonitis was also investigated. Elimination of the Kupffer cells increased mortality significantly. Furthermore, on the other hand, splenectomy improved mortality in animals with or without KC inhibition after CLP. Thus, the liver and spleen play key roles in host defense during septic peritonitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
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：腹膜炎、自然免疫、マクロファージ、脾臓、臓器相関

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 large 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症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、盲腸結紮穿孔腹膜炎 (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、抗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、以前より申請者ら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

目的：腹腔内感染に起因する急性肺障害発症機序における肝臓マクロファージである Kupffer 細胞 (KC) と脾臓の役割を、ラット腹膜炎モデルで検討した。方法：雄性 S. D. 種ラットを用い脾臓を摘出した脾摘モデルを作成、その 1 週間後に KC 抑制物質である liposome-entrapped dichloromethylene diphosphonate (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、致死率、臓器障害を肝・肺で検討した。また、両臓器での炎症性メディエーター発現を検討した。

4. 研究成果

結果：死亡率はコントロール群 (C、生理食塩水投与) C 群で 60% (CLP 後 7 日目)、MDP 群は 12 時間以内に全て死亡した。しかし、Spx 施行群においては MDP の投与非投与に関係なく、C 群と同程度の致死率であった。死因は、急性肺障害であり、MDP 群で C 群と比較し障害が急性増悪したが Spx 施行群では C 群と同じ程度の肺障害であった。腹膜炎において致命的サイトカインである HMGB1 を血中

で測定すると考察：KC 消去による IL-10 発現低下が宿主の生存と肺障害発症と進展に関与する事実が解明された。KC は感染免疫において中心的な役割を果たしていると考えられた (Kono et al. J. Surg. Res. 2010 In press)。また、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。

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 6 件)

- ① 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. 2012 In press (査読有)
- ② 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. 2012;174(1):142-9 (査読有)
- ③ Kono H, Fujii H, Ogiku M, Hosomura N, Amemiya H, Tsuchiya M, and Hara M. Role of interleukin-17A in neutrophil recruitment and hepatic injury after warm ischemia-reperfusion in mice. J. Immunol 2011; 187:4818-25 (査読有)
- ④ Ogiku M, Kono H, Hara M, Tsuchiya M, Fujii H. Glycyrrhizin prevents liver injury by inhibition of HMGB1 production by Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2011;339(1):93-8 (査読有)
- ⑤ Amemiya H, Kono H, and 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 Jan;165(1):59-67. (査読有)
- ⑥ 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)

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① Hiroshi Kono, Masahito Ogiku, Michio Hara, Shinji, Furuya, Hideki Fujii. Interleukin-17a derived from the spleen plays a pivotal role in neutrophil recruitment into the liver after ischemia/reperfusion in mice. IASGO 2011, 2011. 11. 9~11. 12, Tokyo, Japan
- ② Hiroshi Kono, Hideki Fujii, Masahito Ogiku, Michio Hara. Interleukin-17a derived from the spleen plays a pivotal role in neutrophil recruitment into the liver after ischemia/reperfusion in mice. AASLD The Liver Meeting 2011, 2011. 11. 5~11. 9, San Francisco
- ③ 河野 寛, 藤井秀樹: 細菌性腹膜炎における肝臓と脾臓マクロファージの役割 門脈を介した肝脾臓器相関, 第 23 回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2011.6.8~6.10, 東京都
- ④ 河野 寛, 土屋雅人, 藤井秀樹: 消化器病における漢方治療のエビデンスを目指して十全大補湯による肝細胞癌再予防効果の検討(ワークショップ), 第 97 回日本消化器病学会総会, 2011. 5. 13~5. 15, 東京都
- ⑤ 河野 寛, 大菊雅人, 原倫生, 土屋雅人, 藤井秀樹: 細菌性腹膜炎における肝臓と脾臓マクロファージの役割-門脈を介した肝脾臓器相関, 第 111 回日本外科学会定期学術集会, 2011. 4 (震災のため紙上開催)
- ⑥ Hiroshi Kono, Hideki Fujii. 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
- ⑦ 河野 寛, 土屋雅人, 藤井秀樹: C 型肝炎ウイルス感染における背景肝の酸化ストレスと、肝細胞癌再発との関連に関する検討, 第 46 回日本肝癌研究会, 2010. 7. 8~7. 9, 大阪府
- ⑧ 河野 寛, 大菊正人, 藤井秀樹: 細菌性腹膜炎における、肝と脾臓の自然免疫を介した臓器相関, 第 20 回日本サイトメトリー学会, 2010. 6. 26~6. 27, 東京都
- ⑨ 河野 寛, 土屋雅人, 藤井秀樹: 肝病態形成における酸化ストレスの意義 C 型

肝炎ウイルス感染における背景肝の酸化ストレスと、肝細胞癌再発との関連に関する検討, 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010. 5. 27~5. 28, 山形県

- ⑩ 河野 寛, 藤井秀樹: 中鎖脂肪酸の投与によるエンドトキシン血症における肝臓ならびに消化管の抗炎症性効果, 第 22 回日本肝胆膵外科学会・学術集会, 2010. 5. 26~5. 28, 宮城県
- ⑪ 河野 寛, 藤井秀樹: 炎症性腸疾患の栄養療法としての中鎖脂肪酸の有用性の検討, 第 96 回日本消化器病学会総会, 2010. 4. 22~4. 24, 新潟県

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

(3) 連携研究者

なし