

## 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 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591761

研究課題名（和文） 障害肝再生過程における肝血管新生とその分子制御

研究課題名（英文） Liver repair and reconstitution of the hepatic sinusoids after acute liver injury

研究代表者

伊藤 義也（ITOHI YOSHIYA）

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40203187

研究成果の概要（和文）：

薬剤、外傷、炎症などによって肝障害が発生した後に、障害修復過程が遅延あるいは阻害されると肝再生が十分に行われなくなり、肝不全に至る。肝組織修復には肝細胞の増殖のみならず、肝微小血管再構築が重要である。本研究は、血管新生因子として知られている血管内皮増殖因子（VEGF）とその受容体（VEGFR-1）が障害肝修復における役割を解明するために遂行された。薬剤性（アセトアミノフェン）肝障害ならびに肝虚血再灌流障害モデルにおいて VEGFR-1 シグナリングは肝障害後に肝血管新生因子や肝再生因子を増強することで、類洞壁再構築や肝修復を促進させることが示唆され、そこに VEGFR1 陽性マクロファージが関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The failure of liver to regenerate is considered a critical contributing factor in liver dysfunction and liver failure after chemical, liver surgery, and inflammation. Hepatic tissue repair, including the reconstitution of hepatic microvasculature, plays a critical role in determining the final outcome of acutely injured liver. The present study was conducted to examine whether VEGF, a well-known angiogenic growth factor, and its receptor, VEGFR1, are involved in liver repair and regeneration. In the model of acute liver injury elicited by acetaminophen (APAP) and hepatic ischemia/reperfusion, VEGFR1 signaling plays an important role in liver repair and sinusoidal restoration after APAP hepatotoxicity and hepatic ischemia/reperfusion through the recruitment of macrophages expressing VEGFR1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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

キーワード：肝再生

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、障害肝の病態を微小循環障害の観点から検討してきた。薬剤（アセトアミノフェン）性肝障害、エンドトキシン誘発肝障害や肝虚血再灌流障害などの実験モデルでは、肝細胞障害に先行して肝類洞内皮が障害されている。この類洞内皮障害には VEGF（血管内皮細胞増殖因子）や一酸化窒素の産生低下や MMP-2, MMP-9 の活性化が関与している。これらの急性肝障害モデルでは広範囲に肝壊死がもたらされるのにもかかわらず、1 週間以内には肝再生がおき、正常肝機能に回復する。このことは、肝細胞増殖とともに傷害肝微小血管系の再構築すなわち血管新生がおきたことを意味しているが、早期障害標的である肝微小血管系の再生修復については殆ど解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では障害肝からの肝再生過程を肝血管新生ならびに肝微小血管再構築の観点から明らかにすることを目的とする。すなわち、実験モデルを用いて肝微小循環と類洞壁細胞の形態学的かつ機能的な経時的変化を検討する。またこれを制御する分子機構として血管新生に関与が深い VEGF-A と VEGF-A 受容体で血管新生を誘導する作用がある VEGFR1 と VEGFR2 についてその発現と受容体シグナル伝達の役割を解明することである。

## 3. 研究の方法

肝組織修復機構における VEGFR1 受容体の役割を解明するために、VEGFR1 tyrosine kinase deficient mice (Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>) を用い、本研究では 2 つの急性肝障害モデルにおいて以下の研究項目について検討した。

- 1) VEGFR1 受容体シグナルが肝組織修復に実際に関与していることを明らかにする。
- 2) 肝組織修復の作用解析を肝血管新生の観点から行う。
- 3) また、肝組織修復の作用解析をマクロファージ動員集積の観点から行う。

## 4. 研究成果

### (1) アセトアミノフェン誘導肝障害

Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>または野生型マウス (C57BL/6, WT) にアセトアミノフェン (APAP) を投与 (300

mg/kg, ip) したところ、WT は全例生存したが、Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>は 48 時間までに約 70%, 72 時間までにほぼ全例死亡した。血清 ALT 値は WT において投与後 24 時間でピークとなり、以降減少した。一方 Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>においても 24 時間で血清 ALT 値はピークとなったが 48 時間でも減少はみられず、WT に比べ有意に高値を示した。肝壊死面積もほぼ ALT 値と同様な経時的変化が認められ、特に Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>においては投与後 48 時間で出血壊死性変化がみられ、肝類洞構築が破壊されていた。肝類洞血流は Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>で低下し、また肝類洞内皮細胞のエンドサイトーシス機能の低下がみられた。これらのことから、APAP 投与により、Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>の生存率低下が認められ、肝実質細胞および肝類洞内皮の著しい障害がその原因の一つとして考えられた。なお、VEGFR2 発現は差はなく、また WT に VEGFR2 阻害薬を投与しても、肝障害には変化がなかったことから、VEGFR2 シグナルの関与はないものと推察された。

APAP は cytochrome P450 (CYP) により N-acetyl-p-benzquinone imine (NAPQI) に代謝されて肝毒性を発揮し、グルタチオン抱合により無毒化されることが知られているが、両群に CYP2E1 の mRNA 発現および肝グルタチオン量の差はみられなかった。一方、肝組織 mRNA 発現は WT に比べ、Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>で VEGF, VEGFR-2 に加え CD31, TGF- $\beta$ , bFGF, HGF などが低値を示し、IL-6, MMP-9 などが増加を示した。また、免疫組織染色により、WT においては肝壊死領域に VEGFR1 陽性マクロファージの集積が確認されたが、Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>ではほとんど認められなかった。これらのことから、Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>の肝障害増悪の原因として、肝血管新生因子や肝再生因子の発現低下による類洞壁再構築および肝再生能低下が考えられ、VEGFR1 陽性マクロファージの集積減少を伴っていた。

### (2) 肝虚血再灌流障害

Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>または野生型マウス (WT) に 70%肝部分温虚血 (60 分) を行い、再灌流 6, 24, 48, 96. 時間後の血清 ALT、肝壊死面積、肝組織 mRNA 発現 (real time RT-PCR) などの経時的変化を比較検討した。血清 ALT 値は WT において再灌流後 6 時間でピークとなり、以後減少した。Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>では、各時点で WT よりも ALT 値が高く、6, 24 時間後のレベルは、それぞれ 1.7 倍有意に増加した。肝壊死面積は WT で 24 時間 (33%壊死)、48 時間 (27%壊死) と推移した。Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>において 24, 48 時間後で 40%壊死と WT より有意に高値を示した。肝細胞増殖因子 (PCNA) 発現が Vegfr-1 tk<sup>-/-</sup>で遅延した。肝組織 mRNA

発現は再灌流後 24, 48 時間後、WT に比べ Vegfr-1 tk-/- において TNF、IL-6 などが有意に増加し VEGF、VEGFR-1、EGF などが有意に減少した。また CD11b 発現マクロファージの障害肝への集積が減少した。

#### 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 5 件)

- ① T Kato, Y Ito, H Kanako, T Suzuki, T Hideaki, T Minamino, S Kato, H Sakagami, M Shibuya, M Majima. Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes liver repair through restoration of liver microvasculature after acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2011 Mar;120(3):218-229.
- ② Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, Suzuki T, Amano H, Kato S, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Watanabe M, Majima M. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Feb; 300(2):H431-H439.
- ③ Kato S, Amano H, Ito Y, Eshima K, Aoyama N, Tamaki H, Sakagami H, Satoh Y, Izumi T, Majima M. Effect of Erythropoietin on Angiogenesis With the Increased Adhesion of Platelets to the Microvessels in the Hind-Limb Ischemia Model in Mice. *J Pharmacol Sci.* 2010;112(2):167-75.
- ④ Kato H, Hosono K, Ito Y, Suzuki T, Ogawa Y, Kubo H, Kamata H, Mishima T, Tamaki H, Sakagami H, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M. COX-2 and Prostaglandin EP3/EP4 Signaling Regulate the Tumor Stromal Proangiogenic Microenvironment via CXCL12-CXCR4 Chemokine Systems. *Am J Pathol.* 2010 Mar;176(3):1469-83.
- ⑤ Ogawa Y, Suzuki T, Oikawa A, Hosono K, Kubo H, Amano H, Ito Y, Kitasato H, Hayashi I, Kato T, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M. Bone marrow-derived EP-expressing stromal cells enhance tumor-associated angiogenesis and tumor growth.

*Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 15;382(4):720-725.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, Hosono K, Watanabe M, Majima M. Role of VEGFR1 signaling in liver injury and repair following hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. 第 37 回日本微小循環学会 2012 年 3 月 16—17 日、盛岡、岩手
- ② 加藤 哲希、伊藤 義也、鈴木 立紀、細野加奈子、南野 勉、馬嶋 正隆. アセトアミノフェン誘発性肝障害後の肝修復における血管内皮増殖因子 1 型受容体の役割 第 32 回日本炎症再生医学会 2011 年 6 月 2-3 日 京都
- ③ Yoshiya Ito, Tetsuki Kato, Tsutomu Minamino, Kanako Hosono, Masahiko Watanabe, Masataka Majima. Vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase signaling facilitates hepatic repair and regeneration after acetaminophen-induced liver injury. 15th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid 2010 Aug. 29-Sep. 1 Pasadena, CA, USA
- ④ 加藤 哲希、伊藤 義也、細野 加奈子、鈴木 達紀、馬嶋 正隆. アセトアミノフェン誘発性肝障害における VEGF 受容体シグナリングの役割 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会 2010 年 6 月 16-18 日、沖縄
- ⑤ 伊藤義也、渡邊昌彦、馬嶋正隆. エンドトキシン血症における肝微小循環障害の成立機序とその病態生理学的意義 第 24 回日本 Shock 学会総会 2009 年 5 月 29, 30 日 金沢

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 義也 (ITO YOSHIYA)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40203187

(2) 研究分担者

馬嶋 正隆 (MAJIMA MASATAKA)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70181641