

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790240

研究課題名（和文） カルシトニン遺伝子関連ペプチドによる免疫反応制御と  
肝保護作用機序の解明研究課題名（英文） Mechanism of protective effects of calcitonin gene-related peptide  
on liver injury

研究代表者

神吉 昭子（KAMIYOSHI AKIKO）

信州大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10397309

研究成果の概要（和文）：カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）は、血管拡張作用をはじめとした多彩な生理活性を有するペプチドである。CGRP ノックアウトマウスを用いた解析により、コンカナバリン A（Con A）誘導急性肝炎及び慢性肝障害モデルにおいて、内因性 CGRP が肝障害抑制作用を有することを明らかにした。また、外因性 CGRP 投与により肝障害が抑制されることも明らかにし、CGRP が肝疾患の治療に有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）： $\alpha$ -Calcitonin gene-related peptide ( $\alpha$ CGRP) is a pleiotropic peptide including vasodilating effects. By analysis of  $\alpha$ CGRP knockout ( $\alpha$ CGRP<sup>-/-</sup>) mice, endogenous  $\alpha$ CGRP showed to exert a hepatoprotective effect, on concanavalin A (Con A)-induced acute hepatitis and chronic hepatitis model. In addition, administration of exogenous  $\alpha$ CGRP has a hepatoprotective effect.  $\alpha$ CGRP could be a useful therapeutic target for the treatment of hepatitis.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：生理活性物質・肝臓学

## 1. 研究開始当初の背景

(1)  $\alpha$ カルシトニン遺伝子関連ペプチド ( $\alpha$ CGRP) は、カルシトニン遺伝子の alternative splicing によって作られる 37 個のアミノ酸残基からなるペプチドであり、神経系、消化器系、血管などに発現が認められる。 $\alpha$ CGRP は、強力な血管拡張作用や、カプサイシン感受性神経の神経伝達物質としての役割など、多彩な生理活性を有し、肝臓においても CGRP 受容体の発現が認められる。これまで、カプサイシン感受性神経が肝保護作用に関与すること、 $\alpha$ CGRP が炎症性サイト

カインの分泌に関わることなどが報告されているが、肝臓における  $\alpha$ CGRP の病態生理学的意義の詳細は不明であった。

(2) 我々は、カルシトニン-CGRP 遺伝子配列のうち、CGRP に特異的なエクソン 5 のみを欠損させることで、カルシトニン値は正常でありながら、CGRP のみ特異的に欠損するノックアウトマウスの樹立に成功した。更に、これを用いることで CGRP の病態生理学的意義の検討を行ってきた (Circ Res 89: 983-990, 2001, Am J Physiol 283: L963-970, 2002)。

我々の樹立した CGRP 特異的ノックアウト (CGRP-/-) マウスは、正常に発育し、軽度血圧上昇を認める他は、外見上の異常や肝臓を含めた臓器機能不全は、定常状態では確認できない表現型を示した。

(3) そこで我々は、病態誘導時における内因性 CGRP の意義を検討するため、各種の臓器障害モデルを作製し、CGRP-/- マウスの反応性を検討してきた。その中で、T 細胞依存性の自己免疫性肝炎モデルであるコンカナバリン A (Con A) 誘導急性肝炎において、CGRP-/- マウスは肝障害が強く、肝細胞のアポトーシスが強く誘導された。また CGRP-/- マウスでは、肝炎初期に炎症性サイトカインである IL-6 が抑制されているのに対し、後期では逆に産生が亢進していることを見出した (BBRC 343: 152-158, 2006)。このことから、内因性 CGRP が抗アポトーシス作用や炎症反応の制御により肝臓保護作用を發揮していることを、我々は初めて明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、急性期、及び慢性期双方の肝障害モデルにおいて、CGRP による肝臓保護作用のメカニズムをさらに解明し、CGRP の肝疾患の新たな治療法への展開をはかることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Con A 連続投与による慢性肝障害モデルでの内因性 CGRP の肝障害抑制効果の検討

16 週令の雄  $\alpha$ CGRP-/- マウスとその野生型マウスを用いた。Con A を 20 $\mu$ g/g-BW で週 1 回 (計 8 回) 尾静注して、慢性肝障害モデルを作成した。採血は Con A 投与 24 時間後、肝臓のサンプリングは Con A 投与 1 週間後に行った。

肝障害の評価は血清トランスアミナーゼ (ALT、AST) の測定、アポトーシスを TUNEL 染色、肝臓の線維化をマッソントリクローム染色と  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) 免疫染色により評価した。

肝臓の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により定量した。

(2) 慢性肝障害で増加する活性化肝星細胞の解析

Con A 投与 2 週目のマウスより two-step collagenase perfusion により初代培養肝星細胞を分離し、肝星細胞の活性化を ICAM-1 免疫染色により評価した。

活性化肝星細胞として、ヒト活性化肝星細胞株 LI90 を用いて、外因性 CGRP 添加時の細胞増殖を BrdU assay で評価した。

(3) Con A 誘導急性肝炎モデルでの外因性

CGRP 投与による肝障害抑制効果の検討

16 週令の C57BL/6J 雄マウスを使用した。CGRP 5 $\mu$ g/mouse を Con A 投与 30 分前に腹腔内投与し、Con A 20 $\mu$ g/g-BW を尾静注後、12、24 時間後に採血して、血清トランスアミナーゼを測定した。また、Con A 投与後 3、6、12、24 時間の血清 IL-6 を ELISA 法により測定した。

Con A 投与 24 時間後に肝臓のサンプリングを行い、アポトーシスを TUNEL 染色と DNA 断片化により評価した。

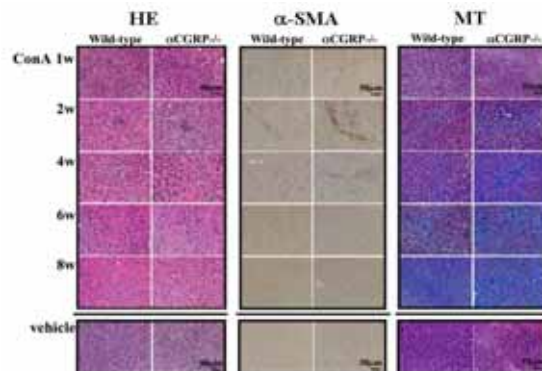
肝臓の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により定量した。

## 4. 研究成果

(1) Con A 連続投与による慢性肝障害モデルでの内因性 CGRP の肝障害抑制効果

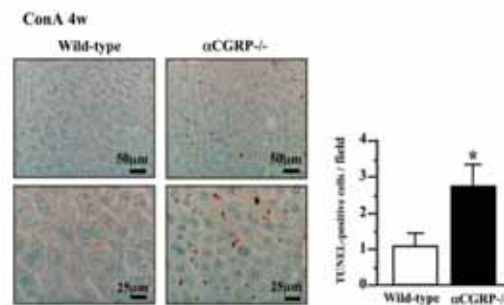
肝障害の指標であるトランスアミナーゼは、Con A 投与 1 週目で  $\alpha$ CGRP-/- マウスで野生型より高値であり、4 週目で野生型では見られなかった有意な上昇が見られた。

$\alpha$ CGRP-/- マウスでは、肝臓への炎症細胞浸潤と  $\alpha$ -SMA 陽性の活性化肝星細胞が、野生型より早期に生じた。肝臓の線維化も、野生型より悪化していた。



肝障害の経時変化

また、 $\alpha$ CGRP-/- マウスで、Con A 投与 4 週目で肝臓の非実質細胞のアポトーシスの有意な増加が見られた。

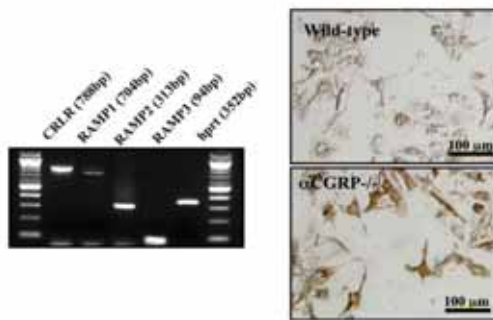


肝臓の TUNEL 染色

Con A 投与 1 週目で炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- $\alpha$ ) 4、8 週目で線維化関連遺伝子 (TGF- $\beta$ 1、collagen $\alpha$ 1、TIMP-1、MMP-2) と接着分子 ICAM-1 の発現が、 $\alpha$ CGRP-/-マウスにおいて、野生型より上昇していた。

## (2) 肝線維化における活性化肝星細胞の解析

Con A 投与 2 週目のマウスより分離した初代培養肝星細胞は、肝星細胞の活性化を示す ICAM-1 の発現が、 $\alpha$ CGRP-/-マウスで上昇していた。また、初代培養肝星細胞で CGRP の受容体である calcitonin receptor-like receptor (CRLR) と receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1) の発現を確認した。



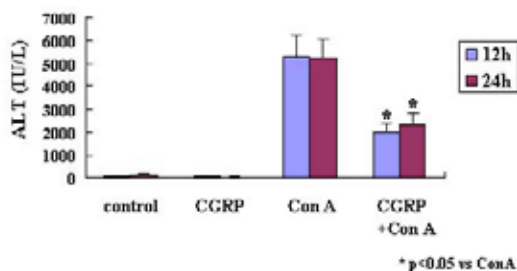
初代培養肝星細胞の ICAM-1 染色

活性化肝星細胞 LI90 は、外因性 CGRP 添加により 48 時間後の細胞増殖が抑制された。LI90 でも、CGRP の受容体である CRLR と RAMP1 の発現を確認した。

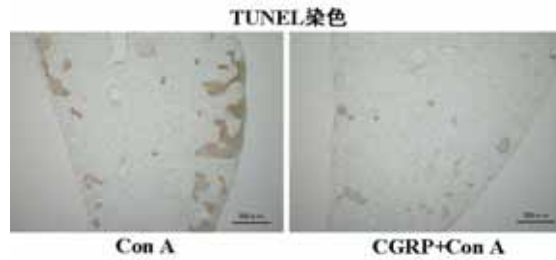
(1)、(2)の結果より、内因性 $\alpha$ CGRP は、炎症反応、肝星細胞の活性化と増殖、肝臓の線維化、非実質細胞のアポトーシスなど多様な反応を制御し、抑制することにより、慢性肝障害における肝線維化を緩和すると考えられた。

## (3) Con A 誘導急性肝炎モデルでの外因性 CGRP 投与による肝障害抑制効果

Con A 投与前に CGRP を投与したマウスにおいて、肝障害の指標であるトランスアミナーゼ (ALT、AST) の上昇が、12、24 時間後で有意に抑制された。



TUNEL 染色と DNA 断片化の解析より、CGRP 投与により肝細胞のアポトーシスが抑制されていた。



CGRP 投与により、初期の血中 IL-6 が上昇し、Con A 投与により上昇する血中 IL-6 の上昇が後期で抑制された。

また、CGRP 投与により、肝臓における炎症性サイトカイン (IL-6 と IFN- $\gamma$ ) の上昇が抑制された。さらに、肝臓保護効果を有する急性期タンパク質である $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質 (AGP) と血清アミロイド A2 (SAA2) の上昇が認められた。IL-6 ノックアウト (IL-6-/-) マウスを用いた解析より、急性期タンパク質の上昇が IL-6 の作用によるものであることがわかった。

(3)の結果から、外因性 CGRP は炎症反応を抑制し、肝臓保護効果のある急性期タンパク質を上昇させることにより肝臓保護作用を示すことが示唆された。

以上の結果より、CGRP は肝疾患に対する新たな治療法として有用であると考えられ、慢性肝障害モデルにおいても同様の効果が得られれば、肝臓保護における CGRP の重要性が明らかになると考えられる。

## 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 2 件)

Linuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, and Shindo T. Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. Peptides, 31(5):865-871, 2010 査読有

Kamiyoshi A, Sakurai T, Ichikawa-Shindo Y, Linuma N, Kawate H, Yoshizawa T, Koyama T, Muto S, and Shindo T. Endogenous  $\alpha$ -calcitonin gene-related peptide mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A. Liver

Int, 29(5):642-649, 2009 査読有

〔学会発表〕(計8件)

荒居琢磨、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、  
小山晃英、吉沢隆浩、植竹龍一、家里康弘、  
沖村綾乃、山内啓弘、Yang Lei、田中愛、河  
手久香、小川真一郎、宮川眞一、新藤隆行 ES  
細胞胚様体分化系を用いた肝類洞内皮細胞  
分化誘導と高次肝様構造構築 第40回日本  
心脈管作動物質学会 2011年2月4日 香川

吉沢隆浩、桜井敬之、神吉昭子、河手久香、  
新藤優佳、荒居琢磨、小山晃英、家里康弘、  
Yang Lei、植竹龍一、山内啓弘、沖村綾乃、  
田中愛、川上速人、中西広樹、田口良、中西  
豪、新藤隆行 アドレノメデュリン-RAMP2系  
による心臓エネルギー代謝制御と恒常性維  
持 第40回日本心脈管作動物質学会 2011  
年2月4日 香川

小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、  
河手久香、荒居琢磨、家里康弘、吉沢隆浩、  
Yang Lei、植竹龍一、沖村綾乃、山内啓弘、  
田中愛、新藤隆行 血管内皮細胞のアドレノ  
メデュリン-RAMP2 システムによる血管恒常  
性維持機構 第40回日本心脈管作動物質学  
会 2011年2月4日 香川

小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、荒居琢磨、  
新藤優佳、吉沢隆浩、Yang Lei、植竹龍一、  
沖村綾乃、山内啓弘、田中愛、新藤隆行 血  
管内皮細胞におけるアドレノメデュリン  
-RAMP2 システムの役割 第18回日本血管生  
物医学会 2010年12月1日 大阪

Yoshizawa T, Sakurai T, Kamiyoshi A,  
Shindo Y, Kawate H, Koyama T, Kawakami H,  
Nakanishi H, Taguchi R, Shindo T AM-RAMP2  
System, as a Novel Regulator of Cardiac  
Homeostasis The 14th Scientific Session of  
the Society of Cardiovascular  
Endocrinology and Metabolism (CVEM) 2010  
年3月31日 奈良

小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、吉沢隆浩、  
新藤優佳、川上速人、新藤隆行 発生および  
老化におけるアドレノメデュリン-RAMP2系  
の血管恒常性維持機構 第83回日本内分泌  
学会 2010年3月25日 京都

小山晃英、桜井敬之、神吉昭子、吉沢隆浩、  
新藤優佳、川上速人、新藤隆行 アドレノメ  
デュリン-RAMP2 システムによる血管・リンパ  
管新生と恒常性維持機構の解明 第17回日  
本血管生物医学会 2009年10月8日 東京

吉沢隆浩、桜井敬之、神吉昭子、小山晃英、

新藤優佳、川上速人、新藤隆行 アドレノメ  
デュリン-RAMP2 システムによる心保護作用  
第32回日本高血圧学会 2009年10月2日  
大津

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神吉 昭子 (KAMIYOSHI AKIKO)  
信州大学・医学系研究科・助教  
研究者番号: 10397309