

令和 6 年 4 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15976

研究課題名（和文）免疫応答と細胞間相互作用に注目した急性肝不全の病態解明

研究課題名（英文）The mechanism of acute liver failure focusing on immune response and cell-cell interaction

研究代表者

桑野 哲史（Kuwano, Akifumi）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90899006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：急性肝不全の病態解明のため動物モデルの解析を行い、類洞障害型の急性肝障害の発症メカニズムの解析を行った。ConcanavalinA投与モデルマウスが類洞障害型の急性肝障害に類似する動物モデルであることが明らかとなり、その発症にはinnate lymphoid cellにおけるIFN $\gamma$ の発現上昇が超早期にみられた。IFN $\gamma$ は類洞内皮細胞へ作用しCD40の発現を亢進させ、更にCD40Lが作用することで類洞内皮細胞でのTissue Factorが発現し血栓形成に至ることがわかった。ヒト急性肝不全においてもこのIFN $\gamma$ -CD40-TF axisが発症に関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性肝不全は肝移植以外に有効な治療法が確立されておらず、移植治療ができない場合の致死率は高い。肝移植は脳死移植におけるドナー不足の問題、生体肝移植は健常者への手術侵襲の問題があり、移植以外の治療法の開発が望まれている。今回同定したIFN $\gamma$ -CD40-TF axisのメカニズムはヒトの急性肝不全の発症にも関与しているものと考えられ、急性肝不全の内科的な新たな治療法の開発のターゲットとなりえる。本研究で得られた知見は急性肝不全の新たな治療戦略の開発へと繋がる基盤的な知見であると考えている。

研究成果の概要（英文）：To uncover the pathogenesis of acute liver failure (ALF) with microcirculatory disturbance, I analyzed Concanavalin A mouse model which presented ALF with microcirculatory disturbance. In this model, IFN $\gamma$  was upregulated in innate lymphoid cells and stimulated hepatic vascular endothelial cells at the early stage of liver injury. IFN $\gamma$  upregulated CD40 expression and Tissue factor (TF) was further induced by increased CD40-CD40 ligand interaction. These mechanism of the IFN $\gamma$ -CD40-TF axis were involved in microcirculatory disturbance in human ALF patients.

研究分野：急性肝不全

キーワード：急性肝不全 免疫応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓は生体に必要な物質の合成、生体にとって不要な物質や薬物の解毒・排泄、栄養の貯蔵など多くの機能を担う重要臓器であり、これらの働きを担う肝細胞が急激かつ大量に破壊され、生命維持が困難になる病態が急性肝不全である。急性肝不全の治療として血漿交換や血液濾過透析など内科的集学的治療が行われるが、肝移植以外に救命困難な症例も多く、現代の医療を持ってしても予後が極めて不良な疾患の代表である。急性肝不全の発症や増悪に関わる因子としては、1) ウイルス因子（ウイルスの重感染や遺伝子変異を伴うウイルス感染）、2) 生体側の因子（年齢や妊娠合併、細胞障害性 T 細胞活性化）、3) 肝臓局所の因子（類洞血流障害、肝内炎症細胞の活性化、肝細胞のアポトーシス）等が指摘されているが、同一の病因でありながらも軽度の肝障害に留まる症例から急性肝不全まで進展する症例まで存在し、病態も含め詳細については明らかでない。本来急性炎症として炎症細胞による標的細胞への攻撃が起これば、免疫制御によりこの作用は抑制を受け炎症は終息へと向かうが、急性肝不全においてはこれらのバランスが破綻し、組織破壊の重篤化と遷延化へと至ると考えられる。以前の報告や研究代表者らの先行的な解析結果から、急性肝不全では肝臓でのマクロファージの活性化と種々のサイトカインの産生亢進が生じており、炎症細胞による免疫応答が病態形成に強く関与している事が想定されるが、発症に関与する炎症細胞種とその相互作用、標的細胞と細胞障害メカニズム、炎症沈静化に至る分子機構など不明な点が多数残されている。

### 2. 研究の目的

急性肝不全の発症、増悪に関与する炎症細胞での免疫応答と細胞間相互作用を中心とした解析を行い、急性肝不全の発症と増悪に関与する病態の解明と新規治療ターゲットを探索することで医学応用を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

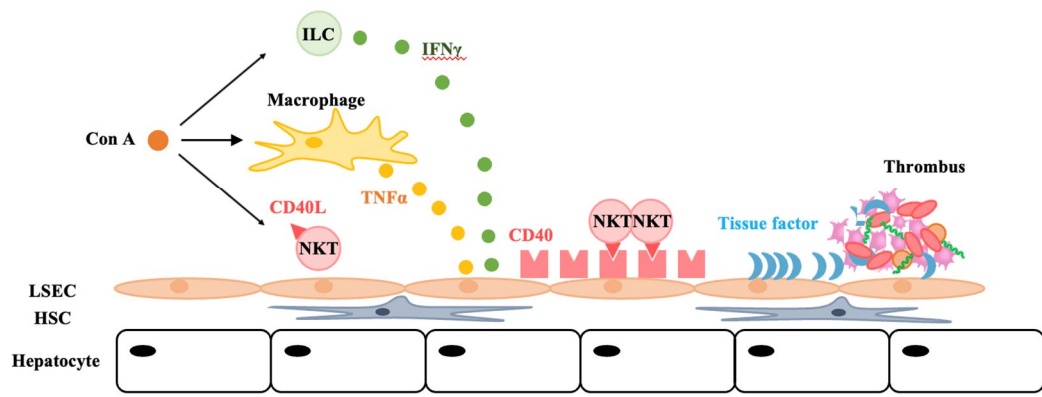
急性肝障害(ALI)の微小循環障害の関与を評価するため、当院に蓄積している ALI 患者の血液サンプルと肝組織を解析した。また動物実験としては微小循環障害が関与する急性肝障害に類似する肝障害を呈するモデルであるコンカナバリン A (Con A) 誘発 ALI モデルマウスを用いた解析を行うこととした。同モデルマウスの肝臓から非実質細胞を採取し、包括的 1 細胞遺伝子発現解析により炎症細胞や類洞内皮細胞などその他の肝臓非実質細胞における遺伝子発現と各細胞種の活性化状態を検討し、パスウェイ解析により炎症細胞間あるいは他の肝臓非実質細胞との細胞間相互作用を探索した。また急性肝不全発症に関わると考えられる IFN の欠損マウスに対し上記薬剤を投与することで、肝臓非実質細胞間の情報伝達機構への影響を評価した。また初代ヒト肝類洞内皮細胞(LSEC)に種々の刺激を加えることで各因子が組織因子の産生に与える影響を評価した。

### 4. 研究成果

血清 IFN 濃度は、微小循環障害を有する ALI 患者では、微小循環障害を有さない患者よりも有意に高く、微小循環障害を呈する ALI では IFN が病態に関与すると考えられた。Con A マウスモデルでも同様に IFN の発現が上昇し微小循環障害型の急性肝障害と共通のメカニズムの関与が示唆され、同モデルを用いて実験を行った。Con A マウスモデルの肝臓を一細胞遺伝子発現解析 (scRNA-seq) で解析したところ、薬剤投与後 1 時間という肝障害の超早期段階で、IFN が自然リンパ球で発現上昇し、肝血管内皮細胞を刺激していることが示唆された。IFN ノックアウトマウスに Con A を投与したところ、血管内皮細胞における CD40 と組織因子 (TF) の発現上昇が完全に抑制され、類洞の血栓形成と肝障害が顕著に抑制された。更にリガンドレセプター解析の結果から、血管内皮細胞の CD40 と NKT 細胞上の CD40L が相互作用している可能性が考えられた。CD40-CD40L の相互作用の確認のためヒト類洞内皮細胞を用いて *in vitro* の実験を行ったところ、IFN 投与で類洞内皮細胞の CD40 発現の上昇がみられ、更に CD40L 刺激を追加することで、さらなる TF の発現が誘導された。以上の結果から ConA マウスモデルの肝障害発症には自然リンパ球での IFN 産生、IFN による血管内皮細胞の活性化、血管内皮細胞での CD40 の発現上昇、血管内皮細胞の CD40 と NKT 細胞の CD40L の相互作用、血管内皮細胞の TF 発現上昇というステップで類洞内の過凝固が惹起されていると考えられた。

最後にヒト ALI 患者検体を用いて上述のメカニズムの関与の有無を評価するため、微小循環障害を伴うヒト ALI 患者組織を用いて免疫染色を行ったところ、ヒト検体でも肝の CD40 発現が有意に上昇していることがわかった。以上から実臨床においても微小循環障害が関与するタイプの急性肝不全では、IFN -CD40-TF の関与が示唆された。

今回明らかとなったメカニズムは急性肝不全の治療ターゲットとなる可能性があり、新たな治療法の開発を目指した研究を予定している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kuwano Akifumi, Okui Tasuku, Kohjima Motoyuki, Kurokawa Miho, Goya Takeshi, Tanaka Masatake, Aoyagi Tomomi, Takahashi Motoi, Imoto Koji, Tashiro Shigeki, Suzuki Hideo, Fujita Nobuhiro, Ushijima Yasuhiro, Ishigami Kousei, Tokunaga Shoji, Kato Masaki, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 102
2. 論文標題 Transcatheter arterial steroid injection therapy improves the prognosis of patients with acute liver failure	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e33090 ~ e33090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000033090	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goya Takeshi, Kurokawa Miho, Hioki Tomonobu, Aoyagi Tomomi, Takahashi Motoi, Imoto Koji, Tashiro Shigeki, Suzuki Hideo, Tanaka Masatake, Kato Masaki, Kohjima Motoyuki, Ogawa Yoshihiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Elevated Pancreatic Enzymes Associated with Acute Liver Injury Were Mediated by Tumor Necrosis Factor-Alpha Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatitis Monthly	6. 最初と最後の頁 e128106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5812/hepatmon-128106	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwano A, Kurokawa M, Kohjima M, Imoto K, Tashiro S, Suzuki H, Tanaka M, Okada S, Kato M, Ogawa Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Microcirculatory disturbance in acute liver injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.10028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwano A, Tanaka M, Suzuki H, Kurokawa M, Imoto K, Tashiro S, Goya T, Kohjima M, Kato M, Ogawa Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Upregulated expression of hypoxia reactive genes in peripheral blood mononuclear cells from chronic liver disease patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 101068
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101068.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tashiro S, Tanaka M, Goya T, Aoyagi T, Kurokawa M, Imoto K, Kuwano A, Takahashi M, Suzuki H, Kohjima M, Kato M, Ogawa Y.	4. 巻 434
2. 論文標題 Pirfenidone attenuates acetaminophen-induced liver injury via suppressing c-Jun N-terminal kinase phosphorylation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicol Appl Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 115817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.taap.2021.115817.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goya T, Kurashige T, Kurokawa M, Tanaka M, Aoyagi T, Takahashi M, Imoto K, Tashiro S, Suzuki H, Kato M, Kohjima M, Ogawa Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 The combination of nucleotide analog therapy and steroid pulse therapy for acute HBV infection effectively promotes HBV clearance.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterol Insights.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗野哲史、田中正剛、国府島庸之
2. 発表標題 急性肝障害における炎症性サイトカインと細胞死
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日置智惟、川元美緒、高橋基、井本効志、黒川美穂、田代茂樹、鈴木秀生、合谷孟、田中正剛、加藤正樹、国府島庸之、小川佳宏
2. 発表標題 肝生検で診断した免疫チェックポイント阻害剤による肝障害の臨床的特徴
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川美穂、栗野哲史、日置智惟、川元美緒、高橋基、井本効志、田代茂樹、鈴木秀生、合谷孟、田中正剛、加藤正樹、国府島庸之、小川佳宏
2. 発表標題 IFNgは急性肝障害の類洞血流障害に関与する
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東夕喜、大野あかり、合谷孟、田中正剛、国府島庸之、小川佳宏
2. 発表標題 病理学的に特徴的所見を呈したAbemaciclibによる薬物性肝障害の2例
3. 学会等名 日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------