

## 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 5 月 28 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659328

研究課題名（和文） 免疫・炎症応答が惹起する肝局所 DIC とそれを介した劇症肝炎の解析

研究課題名（英文） Inflammatory response-mediated Hypercoagulation underlies  
Concanavalin A-induced severe hepatitis in mice

研究代表者

筒井 ひろ子 (TSUTSUI HIROKO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：40236914

研究成果の概要（和文）：

Concanavalin A (Con A) をマウスに投与すると重症肝障害に至る。抗凝固剤のヘパリンを事前に投与しておく、IFN $\gamma$  と TNF が正常に産生誘導されるにも関わらず肝障害に至ることから、凝固亢進の細胞・分子機序を検討した。その結果、IFN $\gamma$  と TNF に依存して、肝のマクロファージ (M $\phi$ ) と肝類洞内皮細胞 (SEC) が発現する凝固先導因子である組織因子 (TF) の重要性を証明した。さらに、Con A 肝炎抵抗性の *Rag2*<sup>-/-</sup> マウスは、Con A と共に IFN $\gamma$  と TNF を投与すると、TF 依存性に劇症肝炎に陥ることが分かった。以上の結果から、IFN $\gamma$ 、TNF 並びに Con A シグナルによる、肝 M $\phi$  や SEC での TF 発現誘導が、劇症肝炎の本体であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

Con A treatment induces severe hepatitis in mice in a manner dependent on T cells, IFN $\gamma$  and TNF. Treatment with the anticoagulant heparin protects against hepatitis despite normal production of IFN $\gamma$  and TNF. Here, we investigated molecular and cellular mechanisms for hypercoagulation-mediated hepatitis. After Con A challenge liver of wild-type mice showed prompt induction of *Ifn $\gamma$*  and *Tnf*, followed by mRNA expression of tissue factor (TF), which initiate blood coagulation. The mice developed dense intrahepatic fibrin deposition and massive liver necrosis. In contrast, *Ifn $\gamma$* <sup>-/-</sup> mice and *Ifn $\gamma$* <sup>-/-</sup> *Tnf*<sup>-/-</sup> mice neither induced *Tf*, nor developed hepatitis. In wild-type mice TF blockade with an anti-TF antibody protected against Con A-induced hepatitis. Both hepatic macrophages and sinusoidal endothelial cells expressed *Tf* after Con A challenge. Macrophage-depleted wild-type mice reconstituted with hematopoietic cells including macrophages deficient in STAT1 essential for IFN $\gamma$  signaling, exhibited substantial reduction of hepatic *Tf* and of liver injuries. This was also true for macrophage-depleted *Stat1*<sup>-/-</sup> mice reconstituted with wild-type macrophages. Exogenous IFN $\gamma$  and TNF rendered T cell-null, Con A-resistant mice deficient in recombination-activating gene 2, highly susceptible to Con A-induced liver injury involving TF. Collectively, these results strongly suggested that pro-inflammatory signals elicited by IFN $\gamma$ , TNF and Con A in both hepatic macrophages and sinusoidal endothelial cells are necessary and sufficient for the development of hypercoagulation-mediated hepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：集中治療医学、劇症肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

*Propionibacterium acnes* 死菌を投与すると、マウスはグラム陰性菌細胞壁成分の LPS に著しく高感受性になる。その結果、無処置マウスの致死量の 1/1,000 量の極微量の LPS を投与してもマウスは致死性ショックに陥る。死を免れたマウスも急性肝障害に至ることを報告してきた (Hepatology 27:497;1997; Nature 378:88;1995; Immunol Rev 174:192;2000)。最近、*P. acnes* 処理マウスに LPS チャレンジすると、ヒトのエンドトキシンショック病態である、凝固系と線溶阻止系の顕著な亢進 (DIC) を惹起することを明らかにした。これらの応答に IFN- $\gamma$  を介した *P. acnes* プライミングによる LPS 感受性亢進と LPS チャレンジ後の TNF- $\alpha$ ・IFN- $\gamma$  産生の両者が必須であることも明らかにした。LPS に対する感受性が亢進したマウスでは、内因性の IFN- $\gamma$  が TNF- $\alpha$  と共に血液凝固・線溶阻止の活性化を誘導し、全身性 DIC をもたらす。一方、T 細胞レクチンである Concanavalin A (Con A) は、既報のように、*P. acnes* 未処置マウスに投与しても、T 細胞と内因性の IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  に依存して劇症肝炎を誘導する。投与された Con A は肝臓に特異的に集積し、血小板減少症と選択的な肝血流量著減を誘導する。さらに、本劇症肝炎は、抗凝固剤であるヘパリンの直前投与で、完全に阻止出来る (Hepatology; 1997)。以上のことから、Con A 刺激は、IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  産生を誘導すると共に、*P. acnes* プライミングに該当する「第 2 経路」をも同時に活性化することで、肝局所での病的な血液凝固亢進、すなわち「局所 DIC」を誘導し、肝障害を惹起すると考えるに至った。

## 2. 研究の目的

当該研究は、局所性 DIC に起因する劇症型臓器不全の細胞・分子メカニズムを解明することを目的とする。既に報告しているように、T 細胞レクチンである Con A 投与により誘導される劇症肝炎は抗凝固剤の前投与で完全防御できることから、本モデルを用いる。申請者らの最新の研究で、病的な血液凝固亢進における IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$  経路の活性化の必要性を明らかにした。しかし、IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$  経路の活性化だけでは不十分であることが予備実験で判明している。このことから、血液凝固亢進に寄与する「第 2 経路」の存在が強く推定される。これら両経路の細胞・分子機構の解明は、免疫・炎症応答を原因とする病的な血液凝固亢進に対して、新しい概念・原理を提供する。

加えて、当該研究の成果は、病的な血液凝固亢進、換言すれば局所性 DIC が原因と考えられる劇症型臓器不全に対して、根本的な新規予防法を提供すると考える。

## 3. 研究の方法

- (1) 野生型マウスに、Con A (0.4 mg) を美静脈から投与する。経時的に肝臓と血漿を採取する。肝障害の程度は、血中 ALT と AST 濃度を測定することで定量する。また、肝障害の特性は、肝切片をヘマトキシリン・エオジン染色で観察する。加えて、肝細胞のアポトーシス死を明らかにするために、肝切片の TUNEL 染色を実施する。
- (2) 肝臓での「局所 DIC」が内因性 IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  に起因することを以下の、2 つの方法で検討する。一つは、肝局所のフィブリン沈着を明らかにするために、肝切片をフィブリンに対する抗体を用いて、免疫染色する。他の一つは、全身性の凝固亢進を検討するために、採取した血漿中の Thrombin-anti-thrombin III complex (TAT) 濃度を ELISA で測定する。なお、凝固中間産物のトロンビンは不安定であるため、TAT 値を測定する。
- (3) 凝固亢進の分子機序を解明するために、Con A 投与後の肝切片を採取し、total RNA を分離する。凝固亢進には、凝固線同因子である組織因子 (tissue factor; TF) と線溶阻害因子である Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) が深く関わる。そこで、これらの分子の動態に着目する。採取した肝 total RNA を用いて、TF と PAI-1 の mRNA 発現量を、qRT-PCR で定量する。同時に、肝臓での *Ifn $\gamma$*  と *Tnf* 発現を同様に測定する。また、これらの発現が IFN- $\gamma$  や TNF により制御されているかを解明するために、*Ifn $\gamma$ <sup>-/-</sup>*、*Tnf<sup>-/-</sup>*、*Ifn $\gamma$ <sup>-/-</sup>Tnf<sup>-/-</sup>* マウスを用いて、同様に検討する。
- (4) 本凝固亢進に関わる分子を特定する。そのために、TF に対する中和抗体を投与して、肝障害の程度を (1) と (2) の方法で検討する。PAI-1 の関与については、*Pai1<sup>-/-</sup>* マウスを用いて、検討す

る。

- (5)組換え IFN- $\gamma$ と TNF- $\alpha$ の投与だけでは「局所 DIC」を誘導できないか、野生型マウスに、種々の組み合わせ濃度の IFN- $\gamma$ と TNF- $\alpha$ を腹腔内投与して(1)と(2)の方法で証明する。
- (6)Con A肝炎抵抗性のT細胞欠損マウス (*Rag2*<sup>-/-</sup>マウス)に、組換えIFN- $\gamma$ と TNF- $\alpha$ に加えてCon Aを追加投与すると、「局所DIC」を介した劇症肝炎が誘導できることを証明する。さらに、これらの処置による肝障害が凝固亢進を介するかを解明するために、(4)で用いたTF中和抗体を投与して検討する。
- (7) *Rag2*<sup>-/-</sup>マウスを用いて、Con A刺激による第2経路の詳細を解明する。
- (8)Con A 様レクチンドメイン発現タンパクを分泌する細菌をデータベース検索し、感染実験で同レクチン依存性に病的血液凝固と臓器炎を惹起し、内因性の IFN- $\gamma$ ・TNF- $\alpha$ 経路とレクチン経路の両者が重要であることを証明する。

#### 4. 研究成果

マウス	<i>Ifn<math>\gamma</math>/Tnf</i>	<i>Tf</i>	Fb沈着	肝障害
野生型	+++	+++	+++	+++
+Heparin	+++	+++	-	-
+抗TF抗体	+++	+++	-	-
<i>Ifn<math>\gamma</math><sup>-/-</sup> Tnf<sup>-/-</sup></i>	-	-	-	-
<i>Rag2</i> <sup>-/-</sup>	-	-	-	-
+rIFN $\gamma$ /rTNF	-	+++	+++	+++

表に病的凝固亢進の研究結果(挑戦的萌芽研究 筒井ひろ子代表 平成22-23年)の概要を示し概説する。

- (1)野生型マウスに Con A を投与すると速やかに肝臓の *Ifn $\gamma$* と *Tnf* 量が上昇した。ついで、血液凝固先導因子で、細胞膜発現型蛋白質の組織因子(Tissue Factor: *Tf*)が、肝臓で発現増強した。遅れて、凝固亢進産物であるフィブリンの肝類洞壁沈着を特徴とする劇症肝炎が進展した。

- (2)抗凝固剤のヘパリン、あるいは、抗TF中和抗体前投与は肝局所 DIC と肝障害を阻止した。
- (3)*Ifn $\gamma$ <sup>-/-</sup> Tnf<sup>-/-</sup>*マウスはいずれの病変も示さなかった。
- (4)自然免疫細胞しか持たない*Rag2*<sup>-/-</sup>マウスは、Con A単独投与では陥らないが、Con Aと共に組換え(r)IFN $\gamma$ とrTNFを投与すると肝局所DIC・劇症肝炎に陥った。このDIC・劇症肝炎は、TFに対する中和抗体の直前投与で完全に、阻止された。

以上の結果から、TF発現にはT細胞を介したIFN $\gamma$ とTNFが必要で、このTFが肝局所DICを惹起し、その結果、微小循環障害に基づく広範な肝細胞壊死、即ち、劇症肝炎に至る可能性が示唆された。さらに、rIFN $\gamma$ とrTNFを投与するだけでは何ら肝病態を引き起こさない事実と(4)から、TF発現誘導を介した劇症肝炎には、IFN $\gamma$ とTNF信号は必要だが、それだけでは不十分で、自然免疫系細胞における、第3の未知なるTF誘導経路の同時活性化の必要性が強く示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計4件)

- (1) 筒井ひろ子、加藤順子、内山良介  
IFN $\gamma$ /STAT1 signaling contributes to Con A hepatitis via tissue factor induction necessary for hypercoagulation in mice. 第40回日本免疫学会学術集会 (2011年11月29日) 幕張(千葉)
- (2) Kato J, Uchiyama R, Tsutsui H.  
Hypercoagulation activated by endogenous IFN- $\gamma$  and TNF underlies Con A hepatitis. 第83回日本生化学会大会 (2010年12月9日) 神戸(兵庫)
- (3) Kato J, Uchiyama R, Tsutsui H.  
Hypercoagulation activated by endogenous IFN- $\gamma$  and TNF underlies Con A hepatitis. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology (Aug. 8, 2010), Kobe (Hyogo)
- (4) 加藤順子、榎本平之、西口修平、筒井ひろ子  
IFN-gammaとTNFは凝固亢進を介してConA肝炎に貢献する第46回日本肝臓学会総会 (2010年5月28日) 山形(山形)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 ひろ子 (TSUTSUI HIROKO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号： 40236914

(2) 研究分担者

内山 良介 (UCHIYAMA RYOSUKE)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号： 20456891