

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：3 4 5 1 9  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：2 3 6 5 9 6 6 0  
 研究課題名（和文）：仮説「血液凝固・IFN $\gamma$ ・PAI-1は肝線維化・発癌機構を制御する」の提唱と検証  
 研究課題名（英文）：Proposal and verification the hypothesis “coagulation, IFN $\gamma$  and PAI-1 control liver fibrosis and carcinogenesis mechanism”  
 研究代表者  
 藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)  
 兵庫医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：9 0 1 9 9 3 7 3

## 研究成果の概要（和文）：

我々は手術癒着機構解析により、血液凝固系と IFN- $\gamma$  (Interferon-gamma)・PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor-1)が癒着、線維形成を制御していることを解明した。これより肝線維化においても血液凝固系・IFN- $\gamma$ ・PAI-1 が重要な役割を演じている仮説をたて、PAI-1 ノックアウトマウスによる胆管結紮肝線維モデルにて検証を行い、PAI-1、tPA(tissue plasminogen activator)が肝線維化に何らかの形で関わっているが、IFN- $\gamma$ の関与は少ないことが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

We elucidated that blood coagulation system and IFN- $\gamma$ (Interferon-gamma), PAI-1(Plasminogen activator inhibitor-1) controlled the adhesion, desmoplasia by operation adhesion mechanism analysis. From this analysis, we hypothesized that blood coagulation system, IFN- $\gamma$ , PAI-1 played an important role in liver fibrosis and inspected it by the PAI-1 knockout mice, and it was suggested that PAI-1 and t-PA (tissue plasminogen activator) affected liver fibrosis but IFN- $\gamma$  did not contribute so much using a mouse model that was ligated bile duct.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：肝線維化、IFN- $\gamma$ 、PAI-1、tPA

## 1. 研究開始当初の背景

現在、肝線維化の中心的機構は、炎症・障害による肝細胞脱落とそれに続く肝クッパー

細胞産生 TGF- $\beta$ による肝星細胞活性化・線維形成であると考えられている。我々もラット肝硬変における肝星細胞と TGF- $\beta$ の働き、

HGF による TGF- $\beta$  抑制と硬変肝の正常化を報告した (Ueki T, Yoshimoto T, Nakanishi K, Fujimoto J, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rat. Nature Med 5:226-30, 1999)。一方で 2008 年に報告した文献 (Kosaka H, Yoshimoto T, Fujimoto J, Nakanishi K, et al. Interferon- $\gamma$  is a therapeutic target molecule for prevention of postoperative adhesion formation. Nature Med 14:437-441,2008) のコンセプトは、tPA (Tissue Plasminogen Activator) が正常に作用すると、フィブリン溶解、癒着は回避される。一方、手術侵襲により neuropeptide であるタキキニンが放出され、NKT 細胞を刺激、IFN- $\gamma$  産生、PAI-1 を活性化、この働きが tPA を上回ると癒着が形成される。即ち術後の線維・癒着形成に IFN- $\gamma$ ・PAI-1 が必須であることを示した。今回の研究ではこの IFN- $\gamma$ ・PAI-1 に着目、肝線維化においても重要であるという仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

\*仮説「血液凝固・IFN $\gamma$ ・PAI-1 は肝線維化・発癌機構を制御する」の提唱と検証を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) PAI-1 $^{-/-}$ マウスを用いた肝線維モデルの解析

\*胆管結紮肝線維モデルを作製し、肝線維化抑制の有無を病理組織学的に検討、野生型マウス (以下 WT マウス) と比較した。具体的には HE 染色後、Sirius-Red 染色にて線維を評価し、その定量化は ImageJ にて実施した。

(2) PAI-1 $^{-/-}$ マウスを用いた肝線維モデルにおける血液凝固・線溶系の解析

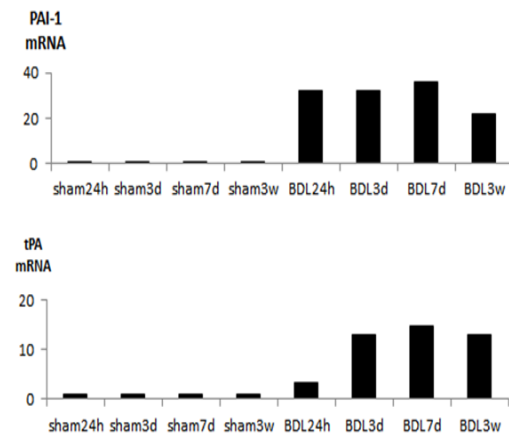
肝組織中の、IFN- $\gamma$  と tPA の変動を PAI-1 $^{-/-}$ マウスおよび WT マウスにおけるコントロール群において mRNA 解析 (PCR) にて検索した。

## 4. 研究成果

平成 23 年度はまず研究計画調書に記載した通り、マウスの BDL による肝線維化モデルを用い、急性期における WT マウスでの肝障害、

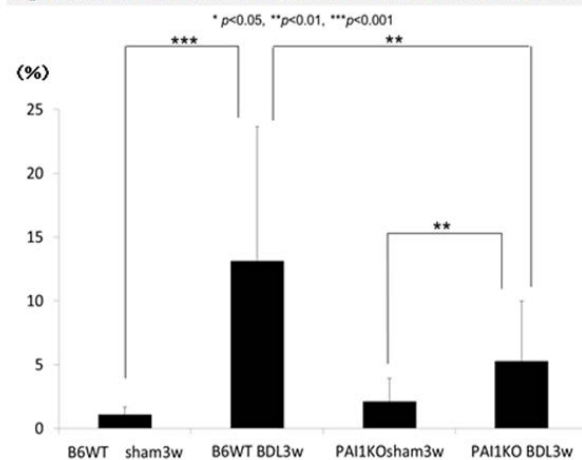
肝線維化とその時の遺伝子発現の確認を行い、BDL による肝線維化に PAI-1、tPA が何らかの形で関わっているが、IFN $\gamma$  の関与は少ないという可能性が示唆された (Fig. 1)。

Fig.1 PAI-1 and tPA level after sham and BDL operation



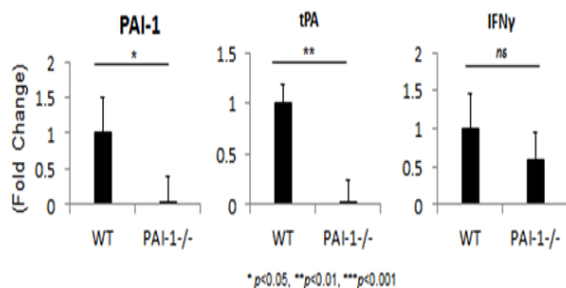
平成 24 年度は慢性期を調べるべく観察期間を延長し、かつ前年度の実験で肝線維化に PAI-1、tPA が関わっている可能性が示唆されたため、BDL 後 3 週間での WT マウスと PAI-1 $^{-/-}$ マウスにおける肝障害、肝線維化を調べた。すると、BDL 後、肝障害に関しては WT マウスに比べ、PAI-1 $^{-/-}$ マウスで軽減される傾向があった。また、肝線維化の程度も Sirius-Red 染色をもとに数値化を行い PAI-1 $^{-/-}$ マウスで有意に抑制される事がわかった (Fig. 2)。

Fig.2 Ratio of liver fibrosis in one field of vision three weeks after BDL



この時の遺伝子発現に関しては PAI-1<sup>-/-</sup>マウスで t-PA の発現が有意に抑制されたが、IFN $\gamma$  の発現に関しては差を認めなかった (Fig. 3)。

Fig.3 PAI-1, tPA, and IFN $\gamma$  level after surgery of BDL



PAI-1<sup>-/-</sup>マウスの tPA 発現量自体は偽手術を行ったものと BDL を行ったもので差を認めなかった。

今回の実験結果をまとめると、BDL 後 3 週間の時点で、WT マウスでは肝線維化が起こったが、PAI-1<sup>-/-</sup>マウスは肝線維化が抑制された事から PAI-1 が肝線維化に重要な因子である事が示唆された。この時 PAI-1<sup>-/-</sup>マウスは tPA の発現が増加する事なく線維化が抑制され、IFN $\gamma$  の関与は少ないという事がわかった。そのメカニズムに関してはさらなる解析が必要である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 9 0 1 9 9 3 7 3

### (2) 研究分担者

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 3 0 2 5 2 0 1 8

平野 公通 (HIRANO TADAMICHI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 9 0 3 4 0 9 6 8

宇山 直樹 (UYAMA NAOKI)  
兵庫医科大学・医学部・研究生 (研究員)  
研究者番号 : 7 0 4 0 2 8 7 3

中西 憲司 (NAKANISHI KENJI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 6 0 1 7 2 3 5 0

西口 修平 (NISHIGUCHI SYUHEI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 1 0 1 9 2 2 4 6

善本 知広 (YOSHIMOTO TOMOHIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：60241171

近藤 祐一 (KONDO YUICHI)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70567213

(3)連携研究者

( )

研究者番号：