

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590967

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた肝線維化の発症機序の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Approaches to the pathogenesis and treatment of liver fibrosis through genetically modified mice.

研究代表者

岩佐 元雄 (Iwasa, Motoo)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80378299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルコール性肝障害は、エタノール自体による肝毒性のみではなく、免疫異常が発症要因となっている。NKT細胞はCD1dを認識する免疫細胞であるが、アルコール性肝障害の病態形成への関与も推定されている。一方、プロテインSは肝で産生されるビタミンK依存性蛋白であるが、凝固阻害の他、アポトーシス抑制作用が注目されている。

今回、臨床的・基礎的研究を施行し、急性アルコール性肝障害では、プロテインSの産生亢進、エタノールによる肝細胞のCD1d発現亢進、過剰なプロテインSによるNKT細胞のアポトーシス抑制が相互に作用し病態を形成し、プロテインSの制御がアルコール性肝障害の治療ターゲットとなり得ることを見出した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the role of protein S in acute alcoholic hepatitis. A mouse overexpressing human protein S (hPS-TG) was generated in which acute hepatitis was induced by intraperitoneal injection of ethanol. The levels of serum liver enzymes, liver tissue inflammatory cytokines and the degree of hepatic steatosis were significantly increased in hPS-TG mice treated with ethanol. Cell expansion, activation and inhibition of apoptosis were significantly augmented in natural killer T (NKT) cells from hPS-TG mice. In a co-culture system of hepatocytes and NKT cells, the effects of protein S on ethanol-mediated cell injury were suppressed by a CD1d neutralizing antibody. NKT cells from patients with alcoholic hepatitis had increased levels of protein S and CD1d mRNA. Protein S exacerbates acute alcoholic hepatitis by enhancing the activation of NKT cells, indicating that protein S may be a molecular target for therapy of this disease.

研究分野：肝臓病学

キーワード：アルコール性肝障害

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 基礎的知見に裏打ちされた抗線維化療法の必要性

ウイルス性肝炎や脂肪性肝炎、アルコール性肝障害では肝に線維化が生じ、進展すると肝硬変に至り、さらには肝癌が発症する。C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法が飛躍的に進歩したが、未だ難治例が多く存在し、B型慢性肝炎に関しても、ウイルスの変異により核酸アナログ製剤に抵抗性を示す症例がみられる。また、近年増加している脂肪性肝炎は、生活習慣との関連が示唆されることから治療は容易でなく、近い将来脂肪性肝炎に起因する肝関連死の増加が危惧される。

以上のことから、基礎的知見に裏打ちされた抗線維化療法の確立が望まれる。これまで肝線維化の制御に関する研究は、肝星細胞活性化の分子機構に焦点を当てて行われてきたが、臨床への展開はなされていない。

### (2) 凝固線溶系制御による肝線維化抑制療法

我々は、以前から炎症性肺疾患、肥満症、糖尿病性腎症の病態進展における凝固線溶因子の関与に着目し、活性化プロテイン C、トロンピン、thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor などの炎症抑制作用、動脈硬化・腎症進展抑制効果を報告してきた。即ちプロテイン S は活性化プロテイン C の補助因子として抗凝固因子として働くが、プロテイン S 自体が炎症調整作用やアポトーシス抑制作用を持つことを明らかにした。我々は、今回新たにプロテイン S と第 6 成長停止特異性遺伝子産物(Gas6)の相同性に注目し、肝線維化に対するプロテイン S 補充療法の理論的裏付けを狙った。

以上の学術的背景から、本研究では、肝疾患ヒト血液を用いた臨床研究、プロテ

イン S 遺伝子改変マウスを利用した肝線維化モデルでの *in vivo* の実験、ラットおよびヒト由来肝星細胞を用いた *in vitro* の実験を並行して行い、プロテイン S の肝線維化抑制効果を検討し、さらに、プロテイン S-Axl 経路による抗炎症作用を介した線維化抑制効果を検証することとした。

## 2. 研究の目的

アルコール性肝障害は、エタノール自体による肝毒性のみではなく、リポ多糖(LPS)による Toll 様受容体(TLR)4 活性化などの免疫異常が発症要因となっている。ナチュラルキラー(NK)T 細胞は抗原提示細胞の MHC 様分子・CD1d を認識しインターフェロン(IFN)- $\gamma$  やインターロイキン(IL)-4 を分泌する免疫細胞であるが、アルコール性肝障害の病態形成への関与も推定されている。

一方、プロテイン S は肝で産生されるビタミン K 依存性蛋白であるが、凝固阻害の他、アポトーシス抑制作用が注目されている。

本研究では、プロテイン S が急性アルコール性肝障害においてアポトーシス抑制を介して肝保護的に働くという作業仮説に基づき臨床的・基礎的研究を施行した。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検討

アルコール性肝炎(肝炎所見が主体で線維化は軽微な症例、n=11)、正常肝に発症した肝腫瘍症例(n=3)、健常者(n=4)を対象に、肝生検、肝切除検体を用いたプロテイン S、CD1d の組織染色、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による発現量評価、血漿を用いたプロテイン S 濃度測定を行った。

### (2) 基礎検討

ヒトプロテインS過剰発現(TG)マウスに12時間毎に計3回25%エタノールを腹腔内投与する急性アルコール性肝障害モデルを作成した。同マウスの血清肝酵素、肝内サイトカインを測定し、肝組織のFlow Cytometry解析を行った。次に、同マウスから分離した単核細胞・MNCsを用い、エタノール添加後のNKT細胞の活性化、プロテインS、 $\alpha$ -Galactosylceramideを添加後の培養上清中のサイトカイン量、エタノール添加後の肝細胞におけるCD1dの発現量の測定など、*in vitro*の検討を施行した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 臨床検討

アルコール性肝炎、肝腫瘍、健常者の年齢、AST、 $\gamma$ -GTP値は、それぞれ57歳、87 IU/L、384 IU/L、62歳、17 IU/L、25 IU/L、50歳、12 IU/L、15 IU/Lで、アルコール性肝炎群でAST、 $\gamma$ -GTPが有意に高値であった。血漿プロテインSレベルはアルコール性肝炎で有意に高値、免疫染色ではプロテインSおよびCD1dの陽性肝細胞もアルコール性肝炎で有意な増加を示した。

さらに、VA24JAQ(NKT細胞マーカー)、IL-4、IL-13、IFN- $\gamma$ などの炎症性サイトカイン、Fas、FasL、caspase 3も強発現しており、アルコール性肝炎ではプロテインSの産生が増加し、NKT細胞が活性化し、肝細胞のアポトーシスが亢進していることが示唆された。

##### (2) 基礎検討

プロテインS-TGマウスへのエタノール投与によりALTなどの血清肝酵素の上昇、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ などの肝内炎症性サイトカインの上昇、著明な肝脂肪化が観察された。Flow Cytometry解析では、プロテインS-TGマウス/エタノール群で肝NKT細胞数

が増加し、これらはAnnexin-V陽性細胞の減少、FasL陽性細胞の増加を呈したことから、数の増加はNKT細胞自体のアポトーシス抑制の結果と考えられた。

本モデルの肝から分離した単核細胞・MNCsを用いた検討では、FasL陽性NKT細胞の有意な増加、プロテインSにて処理後に $\alpha$ -Galactosylceramideにて刺激した培養上清中のサイトカインの上昇、プロテインS処理後にエタノールが添加された肝細胞におけるCD1dの発現の増強などの結果が得られた。この様に*in vitro*でも肝NKT細胞のアポトーシスの抑制、NKT細胞の活性化亢進を示唆する所見が示され、プロテインSとの共培養でこれらが増強したことより、アルコール性肝障害にはプロテインSを介したNKT細胞のアポトーシスの抑制が密接に関与しているものと考えられた。

次に、NKT細胞のプロテインS受容体がMerであることを新たに証明、Mer抗体によりNKT細胞のアポトーシス抑制が生じないこと、プロテインSがAkt経路を活性化させることを確認した。さらに、単核細胞・MNCsとエタノールで前処理した肝細胞の共培養により増強される肝NKT細胞の活性化は、CD1d抗体の投与で抑制されたことから、エタノール自体による肝細胞のCD1d発現亢進がアルコール性肝障害に関与していると結論付けた。

以上の臨床的、基礎的知見から、急性アルコール性肝障害では、プロテインSの産生亢進、エタノールによる肝細胞のCD1dの発現亢進、過剰なプロテインSによるNKT細胞のアポトーシス抑制が相互に作用して病態を形成していると考えられた。

慢性期におけるプロテインSの関与が課題に残るが、プロテインSの制御がアルコール性肝障害の新たな治療ターゲットとなり得ると結論付けた。

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 1件)

1. Protein S exacerbates alcoholic hepatitis by stimulating liver natural killer T cells.  
Chelakkot-Govindalayathil AL, Mifuji-Moroka R, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Matsuda Y, Gil-Bernabe P, Roegen Z, Yasuma T, Yano Y, Gabazza EC, Iwasa M, Takei Y.  
J Thromb Haemost. 2015 Jan;13(1):142-154. doi: 10.1111/jth.12789.

[学会発表](計 5件)

1. アルコール性肝障害における Protein S の肝 NKT 細胞活性化を介した病態への関与  
諸岡留美, 岩佐元雄, 長谷川浩司, ガバザ・エステバン, 竹井謙之  
第 51 回日本肝臓学会総会  
平成 27 年 5 月 21 日~22 日(ホテル日航熊本)
2. Protein S は NKT 細胞の活性化を介して急性アルコール性肝障害を増悪させる  
諸岡留美, 岩佐元雄, 杉本龍亮, 宮地洋英, 田中秀明, 藤田尚己, 小林由直, ガバザ・エステバン, 竹井謙之  
第 50 回日本肝臓学会総会  
平成 26 年 5 月 29 日~30 日(ホテルニューオータニ東京)

3. Protein S exacerbates activation of liver natural killer T(NKT) cells during alcohol-induced liver injury.  
Miyachi H, Moroka R, Fujita N, Kobayashi Y, Iwasa M, Gabazza EC, Takei Y.  
The Liver Meeting 2013: American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)  
November 1-5, 2013 (Washington, DC; United States of America)

4. 急性アルコール性肝障害における自然免疫、特に NKT 細胞の関与 Protein S を用いた検討  
諸岡留美, 岩佐元雄, 杉本龍亮, 宮地洋英, 田中秀明, 藤田尚己, 小林由直, ガバザ・エステバン, 竹井謙之  
第 49 回日本肝臓学会総会  
平成 25 年 6 月 6 日~7 日(京王プラザホテル、東京)

5. Protein S は NKT 細胞の活性化を介して急性アルコール性肝障害を増悪する  
諸岡留美, 岩佐元雄, 藤田尚己, ガバザ・エステバン, 竹井謙之  
第 32 回アルコール医学生物学会学術集会  
平成 25 年 1 月 25 日~26 日(都市センターホテル、東京)

[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：  
出願年月日：  
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

岩佐 元雄 (Iwasa, Motoo)  
三重大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80378299

### (2)研究分担者

Gabazza Esteban (Gabazza, Esteban)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：00293770

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：