

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659806

研究課題名(和文) 劇症肝炎の責任病態である肝局所DICの細胞・分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Interferon-gamma-mediated tissue factor expression contributes to T-cell-mediated fulminant hepatitis through induction of hyper coagulation 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：植物レクチンであるコンカナバリンAを投与すると、マウスは劇症肝炎を起こす。このマウス劇症肝炎がどのような仕組みで起こるのかを調べた。その結果、コンカナバリンAがリンパ球を活性化して、炎症を起こすたんぱく質を産生させ、このたんぱく質が肝臓の血管に微小血栓を多数生成して、血流を途絶えさせ、その結果、大量の肝細胞が急激に死滅することが分かった。事前に、血栓を作らないようにしておくと、コンカナバリンAを投与しても炎症を起こすたんぱく質が普通に作られるにもかかわらず、肝炎には成らなかった。このことから、ある種の劇症肝炎に対しては、血栓を作らないような治療が有効かもしれない。

研究成果の概要(英文)：Concanavalin A (Con A) treatment induces fulminant hepatitis in mice in a manner dependent on interferon (IFN)-gamma. As previously reported, treatment with the anticoagulant heparin protects against Con A hepatitis, despite healthy production of IFN-gamma. Here, we investigated the mechanisms for hypercoagulation-mediated hepatitis. Mice deficient in IFN-gamma were resistant to Con A hepatitis without induction of systemic and hepatic hypercoagulation. This suggests that IFN-gamma is necessary for the thrombus-associated changes. Neutralization of tissue factor, that is essential for the activation of coagulation cascade, resulted in the protection of this hepatitis despite normal induction of IFN-gamma. Responsiveness to IFN-gamma was required for both hepatic macrophages and endothelial cells, which expressed tissue factor after Con A challenge. Thus, proinflammatory signal elicited by IFN-gamma in various liver cells is necessary for the development of Con A hepatitis.

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：劇症肝炎 Concanavalin A 微小循環傷害 組織因子 interferon gamma Tumor necrosis factor Kupffer細胞 肝類洞内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

肝炎ウイルスの感染や薬剤投与により、致死率の高い劇症肝炎に至ることが少なからずある。しかし、その機序は現在でも分かっていない。

Concanavalin A (Con A) は植物由来のレクチンで、T 細胞のマイトジェンでもある。マウスに Con A を経静脈的に投与すると、24 時間以内にマウスは劇症肝炎を起こすことが知られている。これまでの研究で、Con A 投与により産生誘導される Interferon (IFN)- γ や Tumor necrosis factor (TNF) が Con A 肝炎に深く関与することが証明された。実際、中和抗体を単独あるいは同時に投与すると、Con A 肝炎は部分的或は大幅に軽減する。また、*Ifn γ ^{-/-}* マウスや *Tnf^{-/-}* マウスは Con A 肝炎抵抗性である。このことから、IFN- γ と TNF は炎症を惹起することで本劇症肝炎に関与すると考えられて来た。しかし、私たちは以前、抗凝固剤であるヘパリンを投与しておく、血清中の IFN- γ と TNF 濃度は対照群と遜色の無い上昇を示すにもかかわらず、Con A 肝炎を回避できることを報告した。この事実に着目し、次の作業仮説を組み立てた。すなわち、Con A 投与により産生される IFN- γ と TNF が、肝類洞内の異常凝固亢進を引き起こし、微小循環不全により劇症肝炎になる。当該研究では、この作業仮説を証明すると共に、その細胞・分子メカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

当該研究では、前項の「作業仮説」の証明と、その細胞・分子メカニズムの解明を目的とする。特に、血液凝固の先導因子である組織因子 (Tissue factor; TF) と線溶系を阻止することで凝固亢進に関わる Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) について着目した。

3. 研究の方法

- (1) Con A 肝炎の誘導；野生型 (WT) マウス、*Ifn γ ^{-/-}* マウス、*Tnf^{-/-}* マウス、*Ifn γ ^{-/-} Tnf^{-/-}* マウス、*Stat1^{-/-}* マウス、*Ifnar^{-/-}* マウス、*Rag2^{-/-}* マウスを用いた。マウスに事前に、抗 TF 中和抗体を投与したマウスも用いた。また、*Pai1^{-/-}* マウスも用いた。マウスの尾静脈から Con A を注射し、一定時間後に、血漿を採取した。血漿採取後に、経門脈的に肝臓を PBS で十分還流し、肝臓を摘出した。一部の実験では、Con 投与の直前に、組織換え (r) IFN- γ と rTNF を腹腔内に投与した。
- (2) 血栓性肝傷害の計測；肝傷害の程度を判定するために、肝逸脱酵素である ALT を測定した。肝組織片は通常の方法で HE 染色した。また、肝類洞内のフィブリンの析出を調べるために、抗フィブリン抗体を用いて染色した。肝細胞のアポトーシス死を調べるために Tunel 染色を実施した。
- (3) TAT の測定；全身性の凝固亢進の程度を測定するために、血漿中の不安定な

Thrombin の代わりに、安定な Thrombin anti-thrombin III complex (TAT) 濃度を ELISA で測定した。

- (4) 定量性 RT-PCR (q-RT-PCR)；肝臓の total RNA を採取し、*Ifn γ* 、*Tnf*、*Tf*、*Pai1* の濃度を q-RT-PCR で測定した。
- (5) マクロファージ (M ϕ) の除去；マウスに Clodronate liposome を尾静脈から投与して、肝臓のクッパー細胞などの M ϕ を除去した。
- (6) 肝臓の各種細胞種の単離；肝臓を型通り、コラーゲンを含んだ溶液で還流し、肝実質細胞と肝非実質細胞を得た。肝実質細胞は肝細胞として用いた。非実質細胞分画から、MACS を用いて、CD11b 陽性のクッパー細胞分画と CD146 陽性の肝類洞内皮細胞を得た。星細胞を通常の方法で分離した。
- (7) キメラマウスの作製；クッパー細胞は通常の照射抵抗性であるため、(5)の方法でこれをあらかじめ除去した。このマウスを通常通り照射し、その後にドナーマウスの骨髄細胞を移植した。WT マウスと *Stat1^{-/-}* マウスを用いて、キメラマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) IFN- γ ・TNF を介した血栓性肝炎

野生型マウスに Con A を投与すると肝類洞内にフィブリン沈着を伴う、広範な Tunel 陽性肝細胞死を観察した。血漿 TAT 値も、Con A 投与により著しく上昇した。また、肝臓の *Ifn γ* 並びに *Tnf* は、Con A 投与後速やかに発現誘導された。一方、*Ifn γ ^{-/-}* マウス、*Tnf^{-/-}* マウス、並びに、*Ifn γ ^{-/-} Tnf^{-/-}* マウスは Con A を投与しても、血漿 TAT 濃度は有意に低値に留まり、肝障害の軽減、あるいは、肝類洞内のフィブリン沈着の回避を示した (図 1 [雑誌論文]①参照)。以上のことから、Con A 投与により速やかに産生される IFN- γ と TNF が、全身性の血液凝固亢進を伴う病的な肝類洞内血栓形成に関与し、劇症肝炎に至る可能性が示唆された。

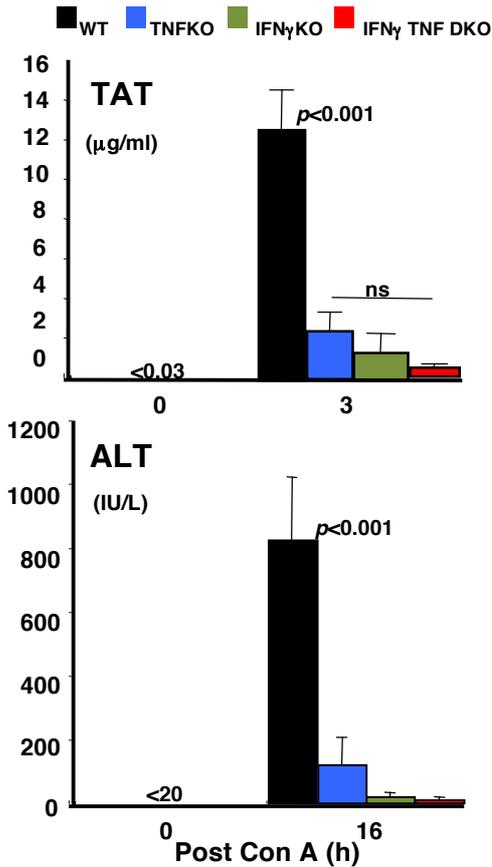


図 1 血栓性肝炎での IFN- γ と TNF の重要性

(2) 肝 *Tf/Pai1* 発現誘導には IFN- γ ・TNF が不可欠

血液凝固の先導因子である TF と、線溶系を阻止することで凝固亢進に寄与する PAI-1 の mRNA レベルでの発現が、Con A 投与により誘導された。また、*Tf* と *Pai1* の発現は *Ifny* と *Tnf* 発現に遅れて、誘導された。*Pai1* の発現誘導が、線溶系亢進により惹起されるかどうかを判定するために、肝臓における Tissue plasminogen activator (tPA) の mRNA を測定したところ、Con A 投与により、*tpa* 発現は軽微な上昇を示すに留まった。*Ifny*^{-/-}マウス、*Tnf*^{-/-}マウス、並びに、*Ifny*^{-/-} *Tnf*^{-/-}マウスでは、肝臓の *Tf* 並びに *Pai1* 発現誘導が著しく減弱していた。特に、*Tnf*^{-/-}マウスに比べて、*Ifny*^{-/-}マウスの方が、より強い発現抑制を示した。以上のことから、TF と PAI-1 の発現誘導には内在性の IFN- γ と TNF が必須であることが示唆された。

(3) PAI-1 ではなく TF が重要

TF 欠損マウスは胎生致死であるため抗 TF 中和抗体を用いて検討した。野生型マウスに事前に抗 TF 中和抗体を投与した後に、Con A を投与すると、抗体量に比例して肝炎阻止が観察された (図 2 上図、[雑誌論文]①参照)。また、血漿 TAT 量も低下し、肝類洞内のフィブリン沈着も軽減し

た。本抗体の投与は、Con A 投与による肝 *Ifny* と *Tnf* 発現誘導を抑制しなかった。一方、*Pai1*^{-/-}マウスは、野生型マウスと遜色の無い血栓性肝傷害を示した (図 2 下図、[雑誌論文]①参照)。これらのことから、Con A 投与による血栓性劇症肝炎には、TF は不可欠であるが、PAI-1 は不要であることが判明した。

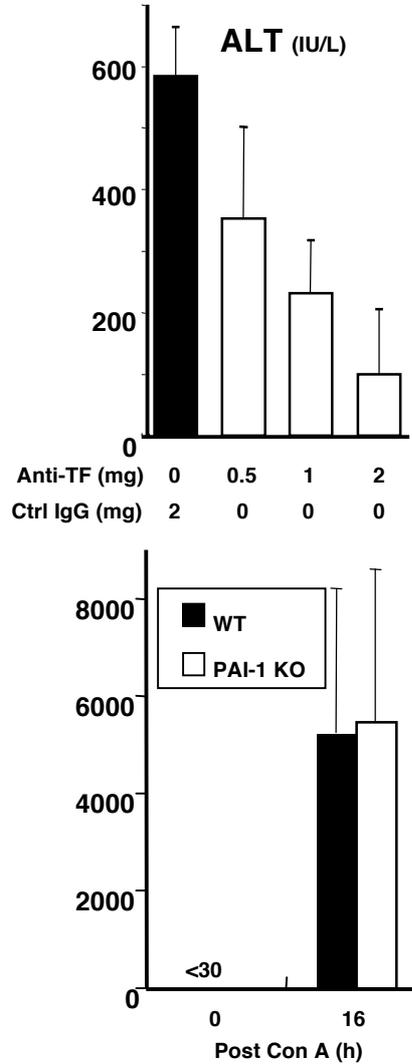


図 2 組織因子の重要性

(4) 肝類洞内細胞、並びに類洞外細胞も *Tf* を発現

血液が流れる肝類洞は主として類洞内皮細胞と組織 M ϕ であるクッパー細胞から成る。肝細胞と星細胞は、肝類洞内に存在せず、類洞とは Disse 腔を介して位置する。従って、定常状態でも類洞内皮細胞とクッパー細胞は血液と常に接するが、肝細胞と星細胞は血液に接触することは無い。Con A を投与すると、いずれの細胞腫も *Tf* の発現を著しく増強していた。クッパー細胞の重要性を明らかにするために、M ϕ 除去マウスを用いて検討した。その結果、クッパー細胞を除去しても、肝臓の *Ifny* や *Tnf* 発現誘導には影響を与えないが、*Tf* 発現誘

導は有意に低下した。これらのことから、血液に恒常的に接するクッパー細胞が TF を発現することで病的な血栓の形成に重要な働きをすることが示唆された。

(5) 血栓誘導に必要な IFN- γ /STAT1 シグナルはクッパー細胞と内皮細胞に等しく重要

IFN- γ シグナルの重要性を、更に詳しく調べるために、そのシグナルに不可欠な転写因子である STAT1 欠損マウスを用いて調べた。Stat1^{-/-}マウスは、Ifn γ ^{-/-}マウスと同程度に Con A 肝炎抵抗性であった。STAT1 は、I 型 IFN のシグナルでも重要であるため、IFN- γ ではなく I 型 IFN が STAT1 の上流で重要な働きをする可能性が否定できない。このことを否定するために、I 型 IFN の受容体を欠損する Ifnar^{-/-}マウスに Con A を投与した。その結果、Ifnar^{-/-}マウスは野生型マウスと同様に Con A 肝炎感受性であることが判明した。

ついで、クッパー細胞と肝内皮細胞のいずれが、IFN- γ シグナルによる血栓性肝炎に寄与するかを検討した。そのために、Stat1^{-/-}マウスと野生型マウスのキメラマウスを作製した。クッパー細胞が野生型で肝類洞内皮細胞が Stat1^{-/-}のキメラマウスでも、その逆の組み合わせのキメラマウスでも、いずれも、野生型マウスと Stat1^{-/-}マウスの中間の表現型を示した。すなわち、肝臓の Tf 発現程度、血漿 ALT のいずれもが中間の値であった。このことから、IFN-g/STAT1 シグナルは、クッパー細胞でも肝類洞内皮細胞でも重要で、等しく病的凝固亢進に関与することが示唆された。

(6) 非 T、非 B 細胞における Con A シグナルは IFN- γ /TNF シグナルと共同して血栓性劇症肝炎に貢献

これまで、T 細胞が Con A 肝炎に必須であることが証明されて来た。同様に、T 細胞も B 細胞もない Rag2^{-/-}マウスは Con A 劇症肝炎抵抗性で、肝 Tf 発現誘導、血漿 TAT 値上昇、ALT 上昇、並びに肝臓の組織学的変化が全く認められなかった。加えて、Con A を投与しても、Rag2^{-/-}マウスの肝臓には Ifn γ と Tnf 発現誘導が観察されなかった。そこで、組換え(r)IFN- γ と TNF を Con A 投与と同時に Rag2^{-/-}マウスに注射したところ、野生型マウスに観られる Con A 肝炎症状・兆候がすべて観察された(図3 [雑誌論文]①参照)。この病態は抗 TF 中和抗体でも阻止できることが判明した。以上のことから、非 T 細胞、非 B 細胞において、Con A、IFN- γ 並びに TNF がシグナリングされると、血栓性劇症肝炎に至ることが示唆された。

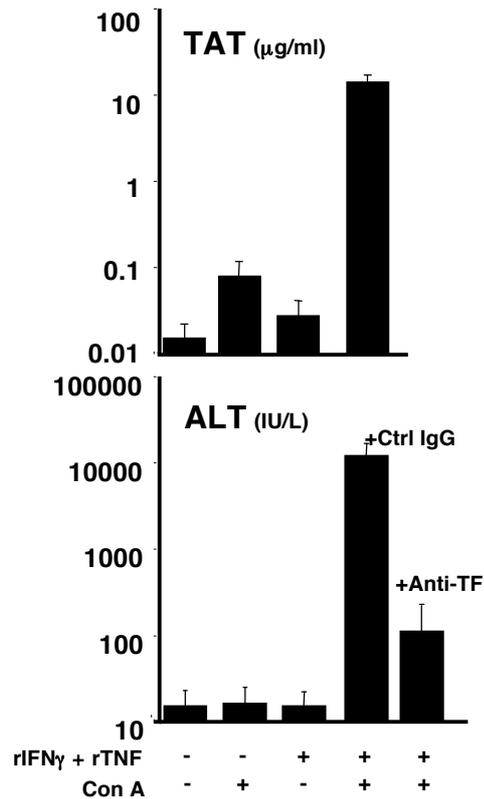


図3 IFN γ 、TNF、Con A の重要性

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)

- ① Tsutsui H, Nishiguchi S. Importance of Kupffer cells in the development of acute liver injuries in mice. *Int J Mol Sci.* 2014;5:7711-7730. Doi: 10.3390/ijms15057711. <査読有り>
- ② Kato J, Okamoto T, Motoyama H, Uchiyama R, Kirchhofer D, van Rooijen N, Enomoto H, Nishiguchi S, Kawada N, Fujimoto J, Tsutsui H. Interferon-gamma-mediated tissue factor expression contributes to T-cell-mediated hepatitis through induction of hypercoagulation in mice. *Hepatology.* 2012;57:362-372. <査読有り>

[学会発表] (計1件)

- ① Tsutsui H. Contribution of IFN- γ /STAT1 signaling to T cell-mediated hepatitis though induction of hepatic hypercoagulation status. IEIIS 2012. 2012 10 26. 東京

[その他]

ホームページ :

http://www.hyo-med.ac.jp/research_facilities/output/gyoseki/20131002.html

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) 連携研究者

内山 良介 (Uchiyama Ryosuke)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：20456891