

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25462100
研究課題名(和文) 脂質メディエーターによる肝再生・修復機構の解明

研究課題名(英文) Liver repair mediated by lipid mediators

研究代表者

伊藤 義也 (ITO, YOSHIYA)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40203187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝虚血再灌流障害後の肝修復過程が阻害されると、肝障害の遷延化や肝不全に至る。そこで、肝虚血再灌流障害後の肝組織制御機構におけるロイコトリエン(LT)B4とその受容体(BLT1)シグナルの役割を解明することを目的に本研究を遂行した。その結果、肝虚血再灌流後の肝組織修復過程にはBLT1受容体シグナルを介してマクロファージが障害肝に集積し、上皮増殖因子EGFを産生することで肝修復が促進していることが示唆された。このことから、内因性LTB4はBLT1受容体シグナルを介して肝障害後の肝修復に重要な役割を果たす脂質メディエーターである可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Liver injury elicited by ischemia and reperfusion is an important clinical problem after liver resection or transplantation, because the failure of liver to regenerate is considered a critical contributing factor in liver dysfunction and liver failure after liver surgery. The present study was conducted to examine whether or not leukotriene B4 (LTB4) and its receptor BLT1 are involved in liver repair and regeneration following hepatic ischemia/reperfusion in mice. BLT1 signaling facilitates liver repair during hepatic ischemia/reperfusion through production of epidermal growth factor in recruited macrophages in injured lesion. LTB4/BLT1 signaling pathway plays a critical role in liver repair after acute liver injury.

研究分野：消化器外科

キーワード：脂質メディエーター 肝修復 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

肝虚血再灌流障害は肝切除手術、肝移植、外傷、出血性ショックなどに起こりうる病態で、有効確実な対処法がまだにない。さらに肝障害が発生した後に、修復過程が阻害され肝再生が行われなくなると、肝不全に至る。我々は最近、障害肝からの組織修復にはマクロファージの集積が関与していることを示した。ロイコトリエン(Leukotriene, LT)B4とLTB4-1型受容体(BLT1)はマクロファージや好中球などの白血球を障害部位に動員させる走化因子として知られている。

2. 研究の目的

本研究は、脂質メディエーターであるLTB4がその受容体であるBLT1受容体に作用してマクロファージの炎症巣への遊走に関与していることに着目し、BLT1受容体シグナルが肝虚血再灌流障害後の肝修復に果たす役割を解明することである。

3. 研究の方法

肝組織修復機構におけるBLT1受容体シグナルの役割を解明するために、BLT1 deficient mice (BLT1^{-/-})ならびに野生型マウス(WT)を用い、70%肝部分温虚血(60分)をおこない、再灌流させる肝虚血再灌流障害モデルにおいて以下の項目について検討した。

- (1) BLT1受容体シグナルが肝組織修復に実際に関与していることを明らかにする。
- (2) 肝組織修復の作用機序を解析する。

4. 研究成果

(1) BLT1受容体シグナルの役割解明
血清ALT値はWTにおいて再灌流後6時間でピークとなり、以後減少した。BLT1^{-/-}では、各時点でWTよりもALT値が高く、48,96時間後のレベルは、それぞれ1.8倍と2.3倍有意に増加した。肝壊死面積はWTで24時間(32%壊死)、48時間(30%壊死)と推移した。BLT1^{-/-}において48時間後で41%壊死とWTより有意に高値を示した。細胞増殖因子(PCNA)発現はWTで24から96時間にかけて増強したが、BLT1^{-/-}では96時間後までその発現はみられなかった。肝組織mRNA発現は再灌流後24、48時間で、WTに比べBLT1^{-/-}においてVEGF、VEGFR1、EGFなどが減少した。障害肝への集積マクロファージMφを検討すると、CD11b、F4/80陽性細胞は48時間でBLT1^{-/-}において減少した。またVEGFR1陽性細胞はCD11b陽性であり、VEGFR1陽性細胞数はBLT1^{-/-}で減少した。さらにEGFを発現するVEGFR1陽性細胞数が67%減少した。EGF中和抗体をWTに投与したところ、再灌流後48時間の肝障害の増悪、肝修復の遷延、集積Mφ数の低下がみら

れた。腹腔MφをLTB4で刺激するとVEGF、VEGFR-1、EGFなどの発現がBLT1^{-/-}Mφにおいて抑制された。以上からBLT1受容体シグナルは肝虚血再灌流後の障害肝へMφを集積させこれらの細胞から肝再生因子(EGF)産生を介して肝組織修復を促進させる役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) 血管内皮増殖因子1型受容体(VEGFR1)の関与

上記の検証により、肝虚血再灌流後の肝修復にはVEGFR1陽性Mφが関与していることが示唆された。そこで、VEGFR1シグナルを介して集積したMφが虚血再灌流障害後の肝修復過程に関与する可能性とその制御機構を検討した。

VEGFR1ノックアウトマウス(VEGFR1^{-/-})と野生型マウス(WT)を用いて肝部分(70%)温虚血(60分)再灌流モデルを作成すると両群では再灌流6時間の肝障害レベルには差はなかった。しかしWTと比較してVEGFR1^{-/-}において再灌流障害後の肝修復は遅延し肝血管再生因子発現は減弱、肝微小循環障害、肝類洞内皮細胞機能の回復が障害された。VEGFR1陽性Mφの障害肝への集積は抑制され、肝増殖因子のEGF発現が減弱した。EGFの肝発現がVEGFR1Mφと共存したことから、集積VEGFR1MφがEGFを産生し肝修復に寄与している可能性が示唆された。そこで、EGFをVEGFR1^{-/-}に投与すると、肝修復が促進し肝血管新生関連因子が増強した。さらに骨髓移植実験において、集積VEGFR1Mφは骨髓から動員されたもので、この骨髓由来MφがEGFを発現し再灌流障害後の肝修復と類洞血管新生が促進することが判明した。

以上から、VEGFR1シグナルはVEGFR1陽性Mφを骨髓から動員して再灌流障害肝に集積させ、EGFを産生することで肝類洞を再構築させて肝虚血再灌流障害からの肝修復を促進させる作用があることが示された。従って、VEGF/VEGFR1シグナルを介して骨髓から肝修復作用のあるマクロファージを動員、集積させることは肝虚血再灌流障害の治療的対策となりうる可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計7件)

Minamino T. Ito Y. Ohkubo H. Shimizu Y. Kojo K. Nishizawa N. Amano H. Narumiya S. Koizumi W, Majima M. Platelet adhesion through thromboxane A2 receptor signaling facilitates liver repair and sinusoidal restoration during acute chemical-induced

hepatotoxicity. *Life Sci.* 査読有、2015 Jul 1;132:85-92.
DOI: 10.1016/j.lfs.2015.03.015.
Matsui Y, Amano H, Ito Y, Eshima K, Tamaki H, Ogawa F, Iyoda A, Shibuya M, Kumagai Y, Satoh Y, Majima M. The role of vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling in compensatory contralateral lung growth following unilateral pneumonectomy. *Lab Invest.* 査読有、2015 May;95(5):456-68.
DOI:10.1038/labinvest.2014.159.
Oba K, Hosono K, Amano H, Okizaki S, Ito Y, Shichiri M, Majima M. Downregulation of the proangiogenic prostaglandin E receptor EP3 and reduced angiogenesis in a mouse model of diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 査読有、2014 Oct;68(8):1125-33.
DOI: 10.1016/j.biopha.2014.10.022.
Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, Eshima K, Kojo K, Okizaki S, Hirata M, Shibuya M, Watanabe M, Majima M. VEGFR1-positive macrophages facilitate liver repair and sinusoidal reconstruction after hepatic ischemia/reperfusion injury. *PLoS One* 査読有、2014 Aug 27;9(8):e105533
DOI: 10.1371/journal.pone.0105533.
Sato T, Amano H, Ito Y, Eshima K, Minamino T, Ae T, Katada C, Ohno T, Hosono K, Suzuki T, Shibuya M, Koizumi W, Majima M. Vascular endothelial growth factor receptor 1 signaling facilitates gastric ulcer healing and angiogenesis through the upregulation of epidermal growth factor expression on VEGFR1(+)CXCR4 (+) cells recruited from bone marrow. *J Gastroenterol.* 査読有、2014 Mar;49(3):455-69.
DOI:10.1016/j.biopha.2013.01.009.
Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, Mishima T, Hirata M, Hosono K, Shibuya M, Yokomizo T, Shimizu T, Watanabe M, Majima M. Leukotriene B4 type-1 receptor signaling promotes liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury through the enhancement of macrophage recruitment. *FASEB J.* 査読有、2013 Aug;27(8):3132-43.
DOI: 10.1096/fj.13-227421.
Kato T, Ito Y, Majima M. VEGF/VEGFR signaling in the liver repair from acetaminophen hepatotoxicity. *Mini-review Inflammation and Regeneration* 査読有、33(1); 66-71, 2013
<http://doi.org/10.2492/inflammregen.33.066>

〔学会発表〕(計 7 件)

伊藤義也 血管内皮増殖因子1型受容体(VEGFR1)陽性マクロファージは肝虚血再灌流障害後の類洞再構築を増強させて肝修復を促進する 第115回日本外科学会定期学術集会 2015年4月16-18日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

K Kojo, Y Ito, N Nishizawa, H Ohkubo, M Watanabe, M Majima Signaling of LTB4 receptor type 1 (BLT1) inactivates hepatic neutrophils to restore acetaminophen-induced liver injury 第88回日本薬理学会年会 2015年3月18-20日 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

K Kojo, Y Ito, N Nishizawa, H Ohkubo, M Watanabe, M Majima Leukotriene B4 (LTB4) receptor type 1 (BLT1) attenuates acetaminophen-induced liver injury through inhibiting hepatic neutrophil activation. 10th World Congress for Microcirculation 2015.9.25 京都国際会議場 (京都府京都市)

H Ohkubo, Y Ito, K Hosono, M Watanabe, M Majima Role of leukotriene B4 (BLT1) in liver injury and repair following hepatic ischemia/reperfusion injury in mice

THIRTY-SEVENTH ANNUAL CONFERENCE ON SHOCK, JUNE 7 - 10, 2014 The Westin Charlotte (CHARLOTTE, NORTH CAROLINA) Ito Y. Mechanisms of liver repair and sinusoidal reconstruction after acute liver injury and implications for therapy 第87回日本薬理学会年会 2014年3月19-21日、仙台国際会議場 (宮城県仙台市)

Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, Kojo K, Watanabe M, Majima M. Role of leukotriene B4 receptor 1 (BLT1) signaling in liver repair after hepatic ischemia reperfusion injury 第39回日本微小循環学会 2014年2月7-8日、北里大学薬学部コンベンションホール (東京都港区白金)

大久保 博世, 伊藤 義也, 渡邊 昌彦, 馬嶋 正隆 肝虚血再灌流後肝修復過程に果たすロイコトリエン B4 受容体 (BLT1) の役割 第28回日本 Shock 学会総会 2013年5月17-18日 北里大学薬学部コンベンションホール (東京都港区白金)

〔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

伊藤 義也 (ITO YOSHIYA)
北里大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：40203187

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：