

平成30年 5月17日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292152

研究課題名(和文) マクロファージ-筋線維芽細胞を基軸とした難治性線維化の臓器横断的発生機序の解明

研究課題名(英文) Based on the axis between macrophages and myofibroblasts, the organ-cross pathogenesis of incurable fibrosis

研究代表者

山手 丈至 (Yamate, Jyoji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50150115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝、腎、膵、心筋、皮膚に生じる実験的線維化に出現するマクロファージはM1/M2分極化によって評価できるとともに、その出現パターンは臓器間で違いがあった。基本的にはM1マクロファージ(炎症誘導)に続いてM2マクロファージ(抗炎症作用・線維化)が出現し、それぞれに関連するサイトカインの産生も確認された。またM2マクロファージの出現と関連して筋線維芽細胞が形成され、その筋線維芽細胞の起源として肝星細胞、膵星細胞、血管周皮細胞、毛根周囲幹細胞、未分化間質細胞があり、腎線維化では上皮-間葉転換を介して形成されることが分かった。マクロファージや筋線維芽細胞の形成を制御する方策が一つの治療法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Macrophages appearing in experimentally-induced rat fibrosis of liver, kidney, pancreas, myocardium and skin could be evaluated based on M1/M2 macrophage polarization. There are some differences in macrophage appearance among organs. Basically, M1 macrophages appeared followed by M2 macrophages, in relation to increased cytokines by each type. M2 macrophages are related to development of myofibroblasts. Myofibroblasts showed cytoskeletons/proteins such as vimentin, desmin, alpha-smooth muscle action, grail fibrillary acidic protein, nestin and Thy-1 in various degrees. It was considered that the myofibroblasts might be derived from hepatic stellate cells, pancreatic stellate cells, pericytes, follicular mesenchymal stem cells and immature mesenchymal cells; renal myofibroblasts might be formed partly via epithelial-mesenchymal transition. Regulation of such macrophage appearance and myofibroblast development might become a possible therapeutic strategy for incurable fibrosis.

研究分野：獣医病理学

キーワード：病理学 線維化 マクロファージ 筋線維芽細胞 肝線維化 腎線維化 皮膚線維化 臓器横断的

## 1. 研究開始当初の背景

線維化とは、組織傷害後に生じる生体の合目的な修復機転であるが、進行性に生じると肝硬変、腎線維化、肺線維症、心筋線維化や皮膚硬化症など難治性線維化となる。このような線維化は、臓器の機能不全を惹起し、個体に死を招来する。線維化の発生機序の全貌の解明と治療法が求められている。ラット腎線維化モデルを解析し、線維化は、「組織傷害 マクロファージ反応及び線維原性因子放出 筋線維芽細胞誘導と細胞外基質蓄積 線維化進展」の機序を提唱した。また、マクロファージは M1 (傷害・炎症作用)/M2 (抗炎症・修復性線維化) 分極化に基づいて病期毎 (初期・進展期・末期) により異なる機能を現わすこと、筋線維芽細胞も病期や臓器毎でその特性が異なり、かつ起源についても多様であることが分かってきた。臓器毎の線維化に係るマクロファージと筋線維芽細胞の特性と関連する因子の追究を臓器横断的に比較解析した。この課題は難治性線維化の治療法探索に繋がる基盤研究に繋がると考えている。

## 2. 研究の目的

様々な臓器の線維化病変に出現するマクロファージと筋線維芽細胞の免疫細胞学的な特性を臓器横断的に解析することを目的とする。特に、マクロファージの機能特性は M1/M2 分極化の概念により評価し、その誘導因子を分子病理学的に解明する。さらに、筋線維芽細胞については、免疫組織化学的な特性の解明に加え、その起源細胞を体性幹細胞との関連で追究する。

## 3. 研究の方法

ラットの肝線維化/肝硬変、腎線維化、肺線維症、心筋線維化、皮膚線維化/硬化症モデルを用いて、出現するマクロファージの機能特性を M1/M2 分極化に基づいて免疫細胞学的に解析し、かつ誘導・産生因子を遺伝子レベルで明らかにすることで、病期毎のマクロファージの機能多様性を解明する。筋線維芽細胞の特性を細胞骨格と表面マーカーの発現を指標に免疫細胞学的に病期毎に解析し、その起源と形成機序を幹細胞マーカーを用いて解明する。上記データを基に、臓器間の類似性・相異性を解析し、線維化の形成を比較病理学的な観点から横断的に解析する。線維化の改善策を追究する目的で、マクロファージの出現を抑制する薬剤を用いた実験を線維化モデルを用いて実施する。以上の *in vivo* の実験に加え、ラットマクロファージ株 (HS-P) と筋線維芽細胞株 (MT-9) を用い、マクロファージと筋線維芽細胞の機能発現を *in vitro* で追究する。

## 4. 研究成果

4 - 1 . 皮膚線維化/硬化症：皮膚線維化に出現するマクロファージの多様な機能的性状及び筋線維芽細胞の特性と由来については不明な点が多い。異なる 2 つの皮膚線維化ラットモデル (パンチ創傷線維化とブレオマイシン誘発皮膚硬化症) を作製し解析した。

皮膚パンチ創傷線維化：このモデルでは、炎症相、肉芽組織相、修復相の線維化の病態が観察された。CD68 発現 M1 マクロファージは炎症相で最も増加しその後減少すること、CD163 発現 M2 マクロファージは肉芽組織相で一過性に増加すること、MHC クラス II 発現抗原提示マクロファージは主に修復相で出現することを示した。CD68 細胞が galectin-3 (TGF- $\beta$ 1 誘導因子) を高発現するこ

と、マクロファージ遊走関連因子 (MCP-1、CSF-1) の発現が CD68 と CD163 細胞の出現と関連することが分かった。線維原性因子 (TGF- $\beta$ 1) の上昇と一致して筋線維芽細胞が形成され、その筋線維芽細胞は  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) とビメンチンの発現に加え、組織幹細胞マーカーである Thy-1 を発現した。Thy-1 発現は、新生血管周皮細胞と毛嚢周囲細胞にも認められ、これら細胞は A3 蛋白 (幹細胞マーカー) も発現していた。以上より、皮膚線維化の病態に依存し異なる特性を有するマクロファージが出現すること、筋線維芽細胞は線維原性因子により誘導され、それは血管周皮細胞や毛嚢周囲細胞に由来することが分かった。

ブレオマイシン誘発皮膚硬化症モデル：このモデルは持続する皮膚線維化により特徴付けられた。CD68 発現 M1 マクロファージ、CD163 発現 M2 マクロファージそして MHC クラス II 発現抗原提示マクロファージが持続的に増加した。これらマクロファージは galactin-3 を常に発現していた。その出現と関連しマクロファージ誘導因子 (MCP-1、CSF-1、TGF- $\beta$ 1 など) も恒常的に高発現することが分かった。さらに、進行する線維化部位には  $\alpha$ -SMA、ビメンチン、Thy-1 を発現する筋線維芽細胞が高頻度で出現し、血管周皮細胞と萎縮した毛根の周囲細胞にはビメンチン、Thy-1、A3 が漸次高発現することが分かった。

皮膚線維化と硬化症の比較：皮膚硬化症では各種のマクロファージ群と誘導因子が常に高発現していること、galactin-3 の発現が、創傷治癒では CD68 細胞のみであったが、硬化症では CD68、CD163、MHC クラス II 細胞や筋線維芽細胞にも発現することを見出した。また、どちらにおいても血管周皮細胞と毛根周囲細胞における幹細胞が筋線維芽細胞に変換する可能性が示された。なお、デスミン陽性の筋線維芽細胞の出現は皮膚の線維化/硬化症の病変ではみられなかった。

4 - 2 . 肝線維化と胆管周囲線維化：進行性の肝線維化は重大な健康障害をもたらす。その進展した病型である肝硬変は、肝炎ウイルス感染、アルコール中毒、非アルコール性脂肪性肝炎、化学物質による中毒などが原因となり生じる難治性疾患である。チオアセトアミド (TAA) 誘発肝線維化と  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) 誘発胆管周囲線維化病変を作製し、マクロファージと筋線維芽細胞の特徴を追究した。

肝線維化/肝硬変でのマクロファージの特性：TAA 単回投与による急性肝細胞傷害における線維化病変を用いて解析した。その結果、M1 マクロファージ誘導に関わる INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 と、M2 マクロファージ誘導に関わる IL-4 の発現が、肝線維化が生じる前にすでに増加していること、この初期反応に続いて、CD68 発現 M1 マクロファージと CD163 発現 M2 マクロファージが、肝小葉中心部の傷害部位に誘導され、それに一致して M2 マクロファージから線維化に係わる TGF- $\beta$ 1 や IL-10 が産生されることが分かった。さらに M1 マクロファージは、CD68 に加えて MHC クラス II と Iba1 を発現すること、M2 マクロファージは、CD163 に加えて CD204 と galectin-3 を発現することを見出した。

TAA を 35 週間週 2 回投与することで誘発された肝硬変の多様な病態を解析した。偽小葉と線維性架橋との比較、アディポフィリン発現 (脂肪性肝炎状態) と非発現の偽小葉との比較、胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST-P) 発現 (前腫瘍性病変) と非発現の偽小葉との比較では、

線維性架橋、アディポフィリン陽性偽小葉、GST-P陽性偽小葉において、それぞれの比較対照に比べ、より多くのマクロファージが出現すること、また、それらのマクロファージは M1 マクロファージと M2 マクロファージの双方の特性を同時に発現し、かつ M1 マクロファージと M2 マクロファージ関連因子も連動して増加していることが分かった。以上より、肝硬変は、M1 と M2 マクロファージが複雑に関連することで形成されることが分かった。肝線維化/肝硬変での筋線維芽細胞の特性：筋線維芽細胞は、その形成過程においてビメンチン、デスミンや  $\alpha$ -SMA などの細胞骨格を発現する。グリア線維性酸性蛋白質 (GFAP) も細胞骨格のひとつで、正常な肝星細胞にも発現する。

TAA 単回投与による急性肝細胞傷害における GFAP 発現細胞の動態を中心に検討した。筋線維芽細胞は、線維化の形成に伴い徐々に増加し、ビメンチン、デスミンそして  $\alpha$ -SMA などの細胞骨格を発現するとともに、GFAP を共発現することが分かった。TAA を 25 週間週 2 回投与することで生じる肝硬変に出現する筋線維芽細胞の特性を解析した。筋線維芽細胞は、GFAP に加え、ビメンチン、デスミンや  $\alpha$ -SMA などを様々な割合で共発現すること、また一部の GFAP 発現細胞は間葉系幹細胞マーカーであるネスチン、A3 蛋白質や Thy-1 を発現することを明らかにした。以上より、肝線維化での筋線維芽細胞は、肝星細胞や間葉系幹細胞から持続的に誘導されることを明らかにした。

胆管周囲線維化でのマクロファージと筋線維芽細胞の特性：ANIT を投与することで作出した急性と慢性の胆管線維化モデルを用いて解析した。ANIT の単回投与による急性の胆管周囲線維化では MHC クラス II 発現マクロファージは初期から後期まで常に増加し、CD68 発現 M1 マクロファージと CD204 発現マクロファージがやや遅れて増加した。なお、CD163 発現 M2 マクロファージは一過性に増加した。筋線維芽細胞は、前半はビメンチンとデスミンを、後半からは  $\alpha$ -SMA を発現することが分かった。また、傷害後に再生する胆管上皮と周囲の筋線維芽細胞は幹細胞のマーカーであるネスチンを発現することが分かった。

次に、ANIT を 19 週間に亘って投与する慢性的な線維化病変を解析した。その結果、MHC クラス II 発現マクロファージは常に高頻度で出現し、CD68 発現 M1 マクロファージと CD204 発現マクロファージがそれに続いて増加し、CD163 発現マクロファージは後期のみ出現することが示された。また、デスミン陽性の筋線維芽細胞の出現は少なく、ビメンチンと  $\alpha$ -SMA 陽性の筋線維芽細胞が慢性的な胆管周囲の線維化病変の形成に深く関わることが分かった。

急性の肝線維化と胆管周囲線維化の比較解析：TAA 誘発肝線維化と ANIT 誘発胆管線維化病変に出現するマクロファージの特性を比較した。肝線維化では CD68 発現 M1 マクロファージと CD163 発現 M2 マクロファージが主体となるのに対し、ANIT 誘発の胆管線維化では MHC クラス II 発現マクロファージが中心的な役割を演じることが分かった。また、肝線維化では GFAP 発現肝星細胞由来の筋線維芽細胞が出現し、胆管周囲線維化では傷害胆管周囲のネスチン発現幹細胞由来の筋線維芽細胞が関与すること、デスミン陽性の筋線維芽細胞は肝線維化ではみられたが、胆管線維化では殆どみられなかった。

4 - 3 . 腎線維化：慢性腎臓病は尿細管間質の線

維化の病態である。シスプラチン誘発腎線維化モデルを作製した。

マクロファージの特徴：この腎線維化モデルでは、CD68 発現 M1 マクロファージと M1 マクロファージ関連因子が初期に増加し、その後線維化の進展に伴い減少した。一方、CD163 発現 M2 マクロファージは、線維化の進行に伴い経常的に増数し、TGF- $\beta$ 1 は M2 マクロファージの増加とほぼ一致した。興味ある点として、MHC クラス II と CD204 発現マクロファージが病変部に多数出現し、MHC クラス II 発現マクロファージは M1 型に、CD204 発現マクロファージは M2 型に極性を獲得する傾向がみられた。

筋線維芽細胞の特徴：膜糖タンパク質である Thy-1 の発現が線維芽細胞からの筋線維芽細胞への分化を規定しているとの報告がある。腎線維化にみられる筋線維芽細胞と Thy-1 発現との関連性については解析した。

シスプラチン誘発ラット腎線維化において、線維化部位にみられる Thy-1 発現間質細胞は、ビメンチンとデスミンを共発現したが、 $\alpha$ -SMA は発現していなかった。Thy-1 は形成初期の筋線維芽細胞に限って発現することが示された。さらに、カルボニンの発現は傷害尿細管周囲の筋線維芽細胞にみられ、ビメンチンや  $\alpha$ -SMA を共発現するが、Thy-1 発現細胞とは一致しなかった。カルボニンは、比較的高分化型の筋線維芽細胞に発現した。また、後腎芽体には Thy-1 発現の間葉系細胞が存在することから、腎線維化の進行に関わる Thy-1 発現の筋線維芽細胞は、未分化な後腎芽体細胞に由来することが示唆された。

さらに、シスプラチン誘発腎線維化においては、TGF- $\beta$ 1、オステオポンチン、骨形成因子である BMP-1 と BMP-6 の増加が観察され、これら因子が線維化に係わることが示された。特に、オステオポンチンは増殖活性のある再生尿細管上皮に発現し、BMP-6 は筋線維芽細胞に発現しその作用は TGF- $\beta$ 1 を非機能性の潜在型に変換するとされることから、腎線維化で発現が確認されたオステオポンチンと BMP-6 は線維化の進行を抑制している可能性が示された。また、腎線維化で傷害され再生しつつある近位尿細管には新たに  $\beta$ -カテニンが発現し、その発現は胎児期の正常な発達段階の尿細管の特徴に類似することから、 $\beta$ -カテニンの発現は尿細管の良好な再生に係わることが示された。一方、異常再生を示す尿細管では  $\beta$ -カテニンの発現はみられず、周囲の筋線維芽細胞に類似する  $\alpha$ -SMA やビメンチンなどを発現したことから、異常な尿細管には上皮 - 間葉転換が生じていることが示唆された。

4 - 4 . 膵線維化：慢性膵炎は膵線維化の病態である。

イヌ・ネコの自然発生性膵線維化の解析：自然発生性膵線維化において、Iba-1 発現浸潤マクロファージが増加し、同様にビメンチンや GFAP 及び  $\alpha$ -SMA 発現の筋線維芽細胞も増加した。肝星細胞と同様に膵線維化においても GFAP 発現膵星細胞が膵線維化における筋線維芽細胞の形成に係ることが分かった。

ジプチルスズクロリド誘発膵線維化モデル：この膵線維化モデルでは、傷害後 CD68 発現 M1 マクロファージがまず出現し、その後遅れて CD163 発現 M2 マクロファージが増加することが分かった。さらに、Iba1、MHC クラス II と CD204 発現マクロファージも同様に線維化に伴い増加した。このうち、特に MHC クラス II 発現マクロファ

ジは M1 型に、CD204 発現マクロファージは M2 型に分極化することが示された。また、ビメンチン、デスミン、GFAP と  $\alpha$ -SMA を発現する筋線維芽細胞が出現し、自然例と同様に、GFAP 発現星細胞が筋線維芽細胞の一つの起源と考えられた。

4 - 5 . 心筋線維化：心筋線維化は心筋組織の硬度的上昇や心収縮の統合性の障害などを導き、心不全を惹起する。イソプロテレノール誘発ラット心筋線維化病変を作製した。  
マクロファージの特性解析：イソプロテレノール誘発心筋線維化では、CD68 発現 M1 マクロファージが傷害早期に一過性に増加した。それに続く線維化に伴い CD163 発現 M2 マクロファージが増加した。さらに、MHC クラス II、CD204、Iba-1 発現マクロファージは傷害早期に一過性に増加し、そのうち MHC クラス II 発現マクロファージは M2 型に、CD204 発現マクロファージは M1 型に分極化することが分かった。さらにこの心筋線維化モデルでは、M1 マクロファージ関連因子である MCP-1、IL-1 $\beta$  と IL-6、M2 マクロファージ関連因子である IL-10 は投与直後に一過性に増加し、M2 マクロファージ産生の線維原性因子である TGF- $\beta$ 1 は傷害早期から持続的に増加しており、線維化の進行に係ることが示された。

筋線維芽細胞の特性解析：この心筋線維化において、 $\alpha$ -SMA およびビメンチンを発現する筋線維芽細胞が傷害早期に増加し始めることが分かった。また、Thy-1 発現未分化間葉系細胞が傷害後持続的に出現しており、筋線維芽細胞の由来が Thy-1 発現の未分化間葉系細胞である可能性が示された。なお、肝線維化でみられたデスミン発現筋線維芽細胞は、皮膚線維化と同様に、心筋線維化ではみられなかった。

4 - 6 . 培養系を用いたマクロファージと筋線維芽細胞の特性解析：

マクロファージ株 HS-P を用いた解析：HS-P は、ラットの自然発生組織球性肉腫から確立したマクロファージ株である。M1 マクロファージ誘導因子である IFN- $\gamma$  を HS-P に添加したところ、マクロファージの誘導や分化に関わる因子 MCP-1、CSF-1、CSF-2、そして炎症誘起に係る TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10 が増加した。さらに、抗原提示マクロファージの機能特性である TLR-4 や RT1Ba の発現が増加した。一方、M2 マクロファージを誘導する IL-4 を添加すると IL-10 や IL-12a が増加した。さらに、INF- $\gamma$  の刺激により galectin-3 と Iba-1 の発現が増加した。

筋線維芽細胞株 MT-9 を用いた解析：筋線維芽細胞は Thy-1 発現の体性幹細胞に由来する。筋線維芽細胞への分化能 ( $\alpha$ -SMA 発現) を有する Thy-1 発現の MT-9 を用いて解析した。MT-9 は、ラット MHF 由来の未分化間葉系幹細胞株である。TGF- $\beta$ 1 を MT-9 に添加すると、MT-9 にもともと発現している Thy-1 は低下したが、逆に  $\alpha$ -SMA 発現が増加することが分かった。また、Thy-1 発現をノックダウンすると TGF- $\beta$ 1 誘導性の  $\alpha$ -SMA 発現は抑制され、一方 Thy-1 過剰発現では TGF- $\beta$ 1 による  $\alpha$ -SMA 発現が増強された。この成績は、Thy-1 は、筋線維芽細胞の分化に伴いその発現は消失するものの、 $\alpha$ -SMA の発現誘導において重要な促進因子である可能性が示された。

4 - 7 . 臨床応用を目指したマクロファージ枯渇実験：

クロドロネート投与による肝マクロファージ枯渇条件下での TAA 誘発の肝小葉中心性肝細胞傷害後の線維化の病態解析：クロドロネート投与によ

り CD68 発現 M1 マクロファージや CD163 発現 M2 マクロファージが著しく減少することが分かった。そのために M1 マクロファージによる残屑組織の排除能の低下により肝小葉中心部の凝固壊死が遅延し、一方修復においては、M2 マクロファージから産生される TGF- $\beta$ 1 が減少していることから線維化の代わりに異栄養性石灰沈着が生じた。結果として、組織修復が遅延することが分かった。  
クロドロネート投与による肝マクロファージ枯渇条件下での ANIT 誘発の小葉間胆管周囲線維化の病態解析：クロドロネートを投与すると、グリソン鞘に浸潤する CD68 発現 M1 マクロファージと CD163 発現 M2 マクロファージが減少し、さらに MHC クラス II、Iba-1、galectin-3 そして CD204 発現マクロファージも同様に減少した。また、M1 関連因子や線維化(修復)に関連する M2 因子も、クロドロネート投与により低下した。ANIT によりマクロファージが枯渇していることから、TGF- $\beta$ 1 により誘導される筋線維芽細胞が減少したためにグリソン鞘に生じる線維化は軽減していた。

マクロファージの影響を軽減することは、肝線維化では病態を増悪させ、一方胆管周囲線維化では病態を軽減させた。逆の効果が示された。

4 - 8 . まとめと総括：

マクロファージと筋線維芽細胞に焦点を置いて臓器間の線維化を比較した。

マクロファージの特性：マクロファージ機能は M1 型(炎症性)と M2 型(抗炎症性・修復性)に大きく分極化するとされる。肝線維化では M1 マクロファージと M2 マクロファージは組織傷害後にほぼ同時に出現することで線維化が進行した。一方、皮膚線維化と脾線維化では、M1 マクロファージの発現にやや遅れて M2 マクロファージの出現があった。さらに、心筋線維化と腎線維化では、初期に M1 マクロファージが一過性に出現し、その後遅れて M2 マクロファージが持続的に出現することが分かった。また、胆管周囲線維化では、MHC クラス II 発現マクロファージが主体として出現し、その後 M1 マクロファージと M2 マクロファージが出現し線維化に係ること、肝硬変や皮膚硬化症などの慢性的な線維化では、M1 マクロファージと M2 マクロファージが、どちらも高い頻度で出現し、複雑な病変を形成することが示された。興味ある点として、肝線維化、脾線維化、腎線維化では MHC クラス II 発現マクロファージは M1 型に、CD204 発現マクロファージは M2 型に分極する傾向にあったが、心筋線維化では逆の分極化を示した。

筋線維芽細胞の特性：筋線維芽細胞はビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -SMA を様々な割合で発現することで線維化の進行に係る。その筋線維芽細胞は、既存の線維芽細胞や体性幹細胞由来、あるいは上皮間葉転換を介して形成されるとされる。皮膚線維化、肝線維化、胆管周囲線維化、脾線維化、心筋線維化に出現する筋線維芽細胞はビメンチンや  $\alpha$ -SMA を発現したが、デスミンの発現は、肝線維化や脾線維化ではみられなかった。起源としては、肝線維化と脾線維化では、GFAP 発現の肝星細胞や脾星細胞に由来することが示され、かつ、肝線維化や胆管周囲線維化ではネスチンや A3 を発現する未分化な幹細胞に由来する可能性も示された。興味ある所見としては、Thy-1 発現筋線維芽細胞がみられ、その発現の特徴から皮膚線維化では血管周皮細胞や毛根周囲幹細胞、脾線維化と心筋線維化では間質の未分化間葉系細胞、腎線維化では後腎芽体細

胞由来の未分化間葉系細胞に起源があることが示唆された。さらに、腎線維化では傷害後の不十分な再生尿細管による上皮 - 間葉転換が筋線維芽細胞の形成に係っていることが示された。

総括：各臓器間の線維化病変に出現するマクロファージの特性は M1/M2 分極化によって評価できるとともに、その出現パターンは臓器間で違いがあった。しかし、基本的には M1 マクロファージに続いて M2 型マクロファージが出現した。また、各臓器において M2 マクロファージの出現と関連して筋線維芽細胞が出現し、その起源として肝線維化では肝星細胞、脾線維化では脾星細胞、皮膚線維化では血管周皮細胞や毛根周囲幹細胞、脾線維化と心筋線維化では間質の未分化間葉系細胞、腎線維化では後腎芽体細胞由来の未分化間葉系細胞と上皮 間葉転換を介して形成されることが分かった。さらなる検討が必要であるが、線維化の治療あるいは改善法としてマクロファージや筋線維芽細胞の形成を制御する方策が有効と考えられた。

## 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 24 件)(すべて査読有り)

1. Pervin M, Karim MR, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Macrophage populations and expression of regulatory inflammatory factors in hepatic macrophage-depleted rat livers under lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Toxicol Pathol* (in press)
2. Atarashi M, Izawa T, Miyagi R, Ohji S, Hashimoto A, Kuwamura M, Yamate J. Dietary iron supplementation alters hepatic inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutrients* 10(2): E175, 2018
3. Bondoc A, Golbar HM, Pervin M, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Participation of tumor-associated myeloid cells in progression of amelanotic melanoma (RMM tumor line) in F344 rats, with particular reference to MHC class II- and CD163-expressing cells. *Cancer Microenviron* 10(1-3):9-24, 2017
4. Hashimoto A, Karim MR, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Immunophenotypical analysis of pancreatic interstitial cells in developing rat pancreas and myofibroblasts in fibrotic pancreas in dogs and cats. *J Vet Med Sci* 79(12):1920-1926, 2017
5. Terada N, Karim MR, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Immunolocalization of beta-catenin, E-cadherin and N-cadherin in neonate and adult rat kidney. *J Vet Med Sci* 79(11):1785-1790, 2017
6. Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, Bondoc A, Kuwamura M, LaMarre J, Yamate J. Attenuation of thioacetamide-induced hepatocellular injury by short-term repeated injections associated with down-regulation of metabolic enzymes and relationship with MHC class II-presenting cells. *Exp Toxicol Pathol* 69(8):589-597, 2017
7. Kato Y, Masuno K, Fujisawa K, Tsuchiya N, Torii M, Hishikawa A, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Characterization of pancreatic islet cell tumors and renal tumors induced by a combined treatment of streptozotocin and nicotinamide in male SD rats. *Exp Toxicol Pathol* 69(7):413-423, 2017
8. Golbar HM, Izawa T, Bondoc A, Wijesundera KK, Tennakoon AH, Kuwamura M, Yamate J. Attenuation of alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced biliary fibrosis by depletion of hepatic macrophages in rats. *Exp Toxicol Pathol* 69(4):221-230, 2017
9. Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, Bondoc A, Kuwamura M, Yamate J. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and Toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol* 68(8):471-7, 2016

10. Bondoc A, Katou-Ichikawa C, Golbar HM, Tanaka M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Establishment and characterization of a transplantable tumor line (RMM) and cell line (RMM-C) from a malignant amelanotic melanoma in the F344 rat, with particular reference to galectin-3 expression in vivo and in vitro. *Histol Histopathol* 31(11):1195-207, 2016
11. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Golbar HM, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1-/M2-macrophage polarization in pseudobulbs consisting of adipophilin-rich hepatocytes in thioacetamide (TAA)-induced rat hepatic cirrhosis. *Exp Mol Pathol* 101:133-42, 2016
12. Pervin M, Golbar HM, Bondoc A, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Transient effects of empty liposomes on hepatic macrophage populations in rats. *J Toxicol Pathol* 29(2):139-144, 2016
13. Pervin M, Golbar HM, Bondoc A, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Immunophenotypical characterization and influence on liver homeostasis of depleting and repopulating hepatic macrophages in rats injected with clodronate. *Exp Toxicol Pathol* 68(2-3):113-24, 2016
14. Golbar HM, Izawa T, Wijesundera KK, Bondoc A, Tennakoon A, Kuwamura M, Yamate J. Depletion of hepatic macrophages aggravates liver lesion induced in rats by thioacetamide (TAA). *Toxicol Pathol* 44(2):246-58, 2016
15. Tennakoon AH, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Pathogenesis of the type 2 of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal and hepatic fibrosis. *J Clin Med* 5(1):4, 2016
16. Yamate J, Izawa T, Kuwamura M. Histopathological analysis of rat hepatotoxicity based on macrophage functions; in particular, an analysis for thioacetamide-induced hepatic lesions. *Food Safety* 3:61-73, 2016
17. Kotera T, Ichikawa-Katou C, Tennakoon A, Tanaka M, Tanaka N, Izawa T, Kuwamura M, Ochi S, Yamate J. Rat malignant fibrous histiocytoma (MFH)-derived cloned cell lines (MT-8 and MT-9) show different differentiation in mesenchymal stem cell lineage. *Exp Toxicol Pathol* 67(10):499-507, 2015
18. Anayama H, Fukuda R, and Yamate J. Adipose progenitor cells reside among the mature adipocytes: Morphological research using an organotypic culture system. *Cell Biology International* 39(11):1288-98, 2015
19. Wijesundera KK, Izawa T, Tennakoon AH, Golbar HM, Tanaka M, Kuwamura M, Yamate J. M1-/M2-macrophages contribute to the development of GST-P-positive preneoplastic lesions in chemically-induced rat cirrhosis. *Exp Toxicol Pathol* 67(9):467-75, 2015
20. Izawa T, Horiuchi T, Atarashi M, Kuwamura M, Yamate J. Anti-fibrotic role of miR-214 in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Toxicol Pathol* 43(6):844-51, 2015
21. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. Analysis of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing ductular cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Exp Mol Pathol* 98:476-85, 2015
22. Ogata K, Sumida K, Miyata K, Kushida M, Kuwamura M, Yamate J. Circulating miR-9 and miR-384-5p as potential indicators for trimethyltin-induced neurotoxicity. *Toxicol Pathol* 43(2):198-208, 2015
23. Yano R, Golbar HM, Izawa T, Sawamoto O, Kuwamura M, Yamate J. Participation of bone morphogenetic protein (BMP)-6 and osteopontin in cisplatin (CDDP)-induced rat renal fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 67(2):99-107, 2015
24. Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, Murakami H, Katou-Ichikawa C, Tanaka M, Golbar HM, Kuwamura M, Yamate J. Immunohistochemical characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing cells in a rat liver cirrhosis model induced by repeated injections of thioacetamide (TAA). *Exp Toxicol Pathol* 67(1):53-63, 2015

〔学会発表〕(計 15 件)

国際学会:

1. Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, Bondoc A, Karim MR, Kuwamura M, Yamate J. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) and MHC class II-expressing cells in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. STP (Society of Toxicologic Pathology) 36th Annual Symposium (Montreal, Canada). 24th-29th, June, 2017. (ポスター発表)
2. Karim MR, Pervin M, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Lipopolysaccharide-mediated autophagy protects against thioacetamide-induced acute liver injury in rats. STP (Society of Toxicologic Pathology) 36th Annual Symposium (Montreal, Canada). 24th-29th, June, 2017. (ポスター発表)
3. Juniantito V, Izawa T, Kuwamura M, Priosoeryanto BP, Harlina E, Yamate J. Pathogenic role and regulation of galectin-3 expression in renal fibrosis and TGF-beta 1 induced fibrogenesis. 2015 ACVP/ASVCP/STP Combined Annual Meeting. Minneapolis, USA. 16th-22th, Oct, 2015. (口頭発表)
4. Izawa T, Atarashi M, Miyagi R, Kuwamura M, Yamate J. Dietary iron overload alters hepatic inflammation in a rat model of nonalcoholic steatohepatitis. 2015 ACVP/ASVCP/STP Combined Annual Meeting. Minneapolis, USA. 16th-22th, Oct, 2015. (ポスター発表)
5. Kotera T, Katou-Ichikawa C, Tennakoon AH, Tanaka M, Tanaka N, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Characterization of rat malignant fibrous histiocytoma (MFH)-derived cloned cell lines (MT-8 and MT-9) based on the tumor stem cell theory. 2015 ACVP/ASVCP/STP Combined Annual Meeting. Minneapolis, USA. 16th-22th, Oct, 2015. (ポスター発表)

国内学会:

1. Time dependent cytoprotective phenomenon of lipopolysaccharide in TAA-induced acute liver injury in rats. Karim MR, Pervin M, 倉持瑞樹, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 34 回日本毒性病理学会学術集会(沖縄県那覇市). 2018 年 1 月 25 日~26 日.(ポスター発表)
2. 炎症誘導因子(DAMPs)と関連シグナルを介したチオアセトアミド(TAA)誘発ラット急性肝障害における進展機序の解析. 倉持瑞樹, 井澤武史, Pervin M, Karim MR, 桑村 充, 山手丈至. 第 34 回日本毒性病理学会学術集会(沖縄県那覇市). 2018 年 1 月 25 日~26 日.(ポスター発表)
3. 高脂肪食誘発性肝疾患に対するラットの週齢感受性の解析. 大地祥子, 稲井洋平, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 160 回日本獣医学会学術集会(鹿児島県鹿児島市). 2017 年 9 月 13 日~15 日.(口頭発表)
4. トリメチルスズ誘発神経毒性ラットモデルにおける血清 miRNA バイオマーカー探索. 緒方敬子, 武田周二, 串田昌彦, 桑村 充, 井澤武史, 山手丈至. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(口頭発表, シンポジウム)
5. デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発ラット結腸病変における体性幹細胞認識抗体 A3 陽性細胞の動態. 仁科嘉修, 市川(加藤)智彩, 倉持瑞樹, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(ポスター発表)

6. Effect of lipopolysaccharide on autophagy and autophagic response in liver homeostasis in rats. Karim MR, Pervin M, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(ポスター発表)
7. チオアセトアミド反復投与ラット肝障害モデルにおける肝細胞傷害の軽減効果の解析. 倉持瑞樹, 井澤武史, Pervin M, Karim MR, Bondoc A, 桑村 充, 山手丈至. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(ポスター発表)
8. 高脂肪食誘発 NASH モデルラットにおける背景飼料の影響. 稲井洋平, 大地祥子, 新真智, 桑村 充, 山手丈至, 井澤武史. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(ポスター発表)
9. M1/M2 分極化に基づいたイソプロテレノール誘発ラット心筋傷害におけるマクロファージの特性解析. 古賀真昭, Karim MR, 倉持瑞樹, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(ポスター発表)
10. ジブチル二塩化スズ誘発ラット臍線維化におけるマクロファージと間葉系細胞の動態. 橋本 愛, Bondoc A, Karim MR, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会(大阪府堺市). 2017 年 1 月 26 日~27 日.(ポスター発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/path/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山手 丈至

(大阪府立大学生命環境科学研究科・教授)  
研究者番号: 50150115

(2) 研究分担者

桑村 充

(大阪府立大学生命環境科学研究科・  
准教授)

研究者番号: 20244668

(3) 研究分担者

竹中 重雄

(大阪府立大学総合リハビリテーション学  
研究科・教授)

研究者番号: 10280067

(4) 研究分担者

秋吉 秀保

(大阪府立大学生命環境科学研究科・教授)  
研究者番号: 50420740

(5) 研究分担者

井澤 武史

(大阪府立大学生命環境科学研究科・  
准教授)

研究者番号: 50420740