

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462040

研究課題名(和文) 肝免疫、肝再生を視点とした肝類洞機能を重視した人工肝臓補助システムの開発

研究課題名(英文) Development of artificial liver support system from view of liver immunity and liver regeneration

研究代表者

藤井 秀樹 (FUJII, Hideki)

山梨大学・その他部局等・理事

研究者番号：30181316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工肝補助装置の開発にあたって、いかなる病態肝に適応があるかを、その病態の機序を解明らかにすることは極めて重要である。肝細胞癌、肝炎、肝再生の3つの病態につき検討した。肝細胞癌に関してはIL-17Aが炎症を通じた酸化ストレスによるDNA損傷によりDEN化学発癌を増強すること、さらに、M-CSFが肝内のクッパー細胞を活性化することにより誘導される血管新生を通じて癌の増殖に関与することが明らかになった。肝炎に関しては、IL-17AがLPS/GaIN誘発劇症肝炎を重症化することが明らかになった。肝再生に関しては、CLEC-2が血小板と肝類洞との相互作用により、肝再生を促進することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It is very important to clarify the mechanism of the liver diseases for considering an indication of artificial liver support system to the liver diseases such as HCC, hepatitis and liver regeneration. As HCC, IL-17A plays a pivotal role in chemically induced hepatic carcinogenesis, which is most likely through inflammation-initiated oxidative DNA damage and cell proliferation. And M-CSF increases hepatocarcinogenesis, most likely by enhancing an angiogenic factor derived from hepatic M. As hepatitis, IL-17A is a key regulator in hepatic injury caused by neutrophil-induced inflammatory responses after LPS/GaIN injection. As liver regeneration C-type lectin receptor-2 (CLEC-2) accelerates the liver regeneration after hepatectomy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：人工肝補助装置 肝クッパー細胞 肝細胞癌 肝炎 肝再生 IL-17A M-CSF CLEC-2

1. 研究開始当初の背景

肝機能補助を必要とする肝機能不全の病態には、薬剤性肝炎、原発性胆汁性肝硬変などとともに、申請者が専門とする慢性肝疾患を背景にした外科手術後、あるいは大量肝切除を余儀なくされる悪性腫瘍手術後の急性肝不全があり、これらはいまだ頻度の高いまた致命的な病態であり、早急な治療法の確立が望まれる。血漿交換療法、近年では生体肝移植などが施行されるが、前者の有効性は確定されておらず、後者ではドナー不足などの問題は解決されていない。このような現状を背景に人工肝臓システムの開発とその臨床応用が期待される。海外では分離肝細胞を工学装置に組み込んだハイブリッド型人工肝臓が開発され臨床応用されているが、いまだ充分には普及していない。一方、肝臓は蛋白合成や糖質、鉄の貯蔵などの多くの働きをもつ肝臓の85%を占める肝細胞と、残る15%を占める肝臓の炎症、免疫の中核を担う肝類洞壁細胞からなっている。肝臓そのものの機能を考えるとき、この15%を占める肝類洞壁細胞の機能を有効に利用することがきわめて重要なことと考えられる。一方でiPS細胞の発見により、この人工肝臓補助システムの作成に当たっては発想を新たに必要性が生じてきた。しかしながらどのような方法で人工肝補助システムが作成されようと、逆にどのような病態肝に適應されるべきかの決定が極めて重要になってくるものと考えられる。そこで本邦では頻度の高くかつ重要な肝疾患である、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) 劇症肝炎 (fulminant hepatitis) そして治療効果の判定に重要な肝再生 (liver regeneration) の病態解明が必要と考えたのが背景である。

2. 研究の目的

背景にも既述したように、研究の目的は肝細胞癌、劇症肝炎、肝再生の病態解明である。以下、個別に記述する。

(1) 肝細胞癌の発生、増殖に関する検討：肝類洞に存在する肝マクロファージが刺激されることによって肝炎から肝発癌に到ることをすでに明らかにしているが、肝マクロファージを刺激する因子を特定し、新規治療法を開発する。その候補として macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と interleukin 17 A (IL-17A) の肝細胞癌の発生進展に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

(2) 劇症肝炎の機序解明：マウスの劇症肝炎モデルを lipopolysaccharide/D-galactosamine (LPS/GalN) 投与にて作成し、種々のサイトカインの動態、特に IL-17A の関与を解明することを目的とした。

(3) 肝再生の機序解明：肝再生に肝クッ

パー細胞の関与が重要であることを、これまで明らかにしてきた。一方、脾臓摘出により肝再生が促されることが他グループの研究で明らかになっている。血小板に発現されている C-type lectin receptor-2 (CLEC-2) が肝類洞内でどのように作用しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌の発生、増殖に関する検討：

M-CSF 欠損マウス (op/op) とコントロールマウスに diethylnitrosamine (DEN) を投与し、28 週目の肝細胞癌の発生頻度と血清 M-CSF の関係を検討する。併せて活性化マクロファージの肝臓内での分布を、さらには、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を ELISA で検討し腫瘍内の血管新生の程度を検索した。

ヒト肝細胞癌の検体を使用し、肝臓内の腫瘍部、非腫瘍部の M-CSF の発現、M2 マクロファージの分布、血管新生の程度を検討し、肝細胞癌切除後の予後との相関をみた。マウスでは、分離した肝マクロファージを M-CSF と共培養し、培地中の VEGF の濃度を測定する。さらに、肝マクロファージを M-CSF で培養し、血管内皮 (vascular endothelial cell: VEC) の増殖を検討した。

IL-17A ノックアウトマウスと野生型マウスに DEN を投与し 38 週目の肝細胞癌発生率を検討する。さらに DEN の急性肝障害の影響を検討するために、経時的に発癌も含めた肝臓の状況を検討した。

(2) 劇症肝炎の機序解明：LPS/GalN を 3 種のマウスモデル、野生型 (WT)、IL-17A ノックアウトマウス (IL-17A KO)、recombinant mouse IL-17A homodimer で処理された IL-17A ノックアウトマウス (KO+rmIL-17A) を投与し、s4 時間後の生存率を検討した。さらに、好中球浸潤の程度、肝細胞のアポトーシスの程度を病理組織学的に観察した。また、種々の血清中の炎症性サイトカインである、TNF- α 、IL-6、monocyte chemotactic protein 1 (MCP1)、IL-17A、high-mobility group box 1 (HMGB1)、soluble intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1) を ELISA で検討した。

(3) 肝再生の機序解明：野生型マウス (WT) の胎児肝細胞を移植したのちに放射線を照射したキメラマウス、CLEC-2 ノックアウトマウス (KO)、特異的に血小板のみに CLEC-2 を欠損しているマウス (fIKO) の 3 種類のマウスを作成し、それぞれに 70% 肝切除を施行した。免疫組織学的に CLEC-2 の内因性のリガンドである podoplanin の発現を検討した。また、肝内での血小板の集積状態も評価した。さらに肝臓での IL-6gp130、STAT3、Akt、ERK1/2 の発現も検討した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞癌の発生、増殖に関する検討:

肝腫瘍の頻度はコントロール群と比較して、M-CSF 欠損マウスで明らかに低率であった。また血清中の MCSF のレベルは肝腫瘍発生の頻度が高いコントロール群で高値であった。肝マクロファージはコントロール群では癌部、悲癌部ともに認められたが、M-CSF 欠損マウスでは癌部のみに認められた。炎症性サイトカインの mRNA の発現は M-CSF 欠損マウスでコントロール群と比較して有意に低値であった。腫瘍のアポトーシスはコントロール群と比較して、M-CSF 欠損マウスで有意に高率であった。腫瘍内の血管新生の程度は、M-CSF 欠損マウスと比較してコントロール群で有意に高かった。また肝マクロファージを MCSF 添加培養すると、無添加培養と比較して有意に VEGF 産生が増加した。この結果、MCSF は肝細胞癌の発癌ならびに増殖・進展に大きく関与していることが明らかになった。

ヒト肝細胞癌では、癌の周囲の領域では M-CSF と CD163 の間に強い相関が認められた。そして M-CSF、CD163、CD31 の免疫染色で強染される症例は、染色度が弱い症例より、肝切除後の再発までの期間が有意に短かった。多変量解析では、癌周囲の M-CSF の発現と肝マクロファージの浸潤が最も有効な肝切除後再発のマーカーであり、また予後不良因子であった。VEGF の培養中の濃度は、肝マクロファージの培養でのほうが、単球の培養でよりも有意に高値であった。

発癌率は野生型で 65%、IL-17A ノックアウトマウスで 20% であり、腫瘍の個数もノックアウトマウスで有意に少なかった。DEN 投与 7 日目の血清 ALT 値は野生型で高値で、浸潤好中球、クッパー細胞、TNF- α 、IL-6 も野生型で高値で、炎症の程度が野生型で強いことが明らかになった。また酸化ストレスによる DNA 損傷のマーカーである 8-OHdG はノックアウトマウスで抑制されていた。さらに Ki-67 による免疫染色では、細胞分裂は野生型で増加していた。このことから、IL-17A は肝細胞癌の発生に中心的な役割をになっており、炎症によって誘発される酸化ストレスを介した DNA 損傷を促進させることが明らかになった。

(2) 劇症肝炎の機序解明: LPS/GaIN 投与による生存率は IL-17A ノックアウトマウスで高かった。さらに好中球浸潤、アポトーシスの程度は野生型で高かった。また、炎症性サイトカインである、TNF- α 、IL-6、MCP1、IL-17A、HMGB1、ICAM1 はすべて野生型で高発現していた。これらのことから、IL-17A が、LPS/GaIN 投与後の好中球に誘発される炎症反応を介した肝障害を制御する重要な因子であることが明らかになった。

(3) 肝再生の機序解明: 肝切除後の肝・

体重比ならびに肝細胞増殖の程度はキメラマウス群と比較して、特異的に血小板のみに CLEC-2 を欠損しているマウス (fIKO) 群で低値であった。また、リン酸化 (p)Akt、リン酸化 (p)ERK1/2 にはキメラマウス群と fIKO 群との間に差は認められなかった。一方、リン酸化 (p)STAT3 ならびに IL-6 の発現はキメラマウス群が fIKO 群と比較して強発現していた。ポドプラニンの発現はキメラマウス群、fIKO 群の双方で肝類洞に認められた。しかしながら、肝類洞に集積している血小板数はキメラマウス群で、fIKO 群と比較して有意に多かった。これらの結果から、CLEC-2 は肝切除後の肝再生に強く関与していることが明らかになり、この機序には血小板と肝類洞内皮との相互作用が考えられた。

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 28 件) 11 件を表記

Shirai T, Inoue O, Tamura S, Tsukiji N, Sasaki T, Endo H, Satoh K, Osada M, Sato-Uchida H, Fujii H, Ozaki Y, Suzuki-Inoue K. C-type lectin-like receptor 2 promotes hematogenous tumor metastasis and prothrombotic state in tumor-bearing mice. *J Thromb Haemost.* 2017 (査読有);15(3):513-525. DOI: 10.1111/jth.13604.

Kono H, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Furuya S, Hirayama K, Akazawa Y, Nakata Y, Sun C, Tsukiji N, Shirai T, Ozaki Y. The platelet-activating receptor C-type lectin receptor-2 plays an essential role in liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Thromb Haemost.* 2017 (査読有);15(5):998-1008. DOI: 10.1111/jth.13672.

Sano K, Ichikawa T, Motosugi U, Ichikawa S, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H. Outcome of hypovascular hepatic nodules with positive uptake of gadoxetic acid in patients with cirrhosis. *Eur Radiol.* 2017 (査読有);27(2):518-525. DOI: 10.1007/s00330-016-4423-2.

Sano K, Ichikawa T, Motosugi U, Ichikawa S, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H. Outcome of hypovascular hepatic nodules with positive uptake of gadoxetic acid in patients with cirrhosis. *Eur Radiol.* 2017 (査読有);27(2):518-525. DOI: 10.1007/s00330-016-4423-2.

Kono H, Fujii H, Furuya S, Hara M, Hirayama K, Akazawa Y, Nakata Y, Tsuchiya M, Hosomura N, Sun C. Macrophage colony-stimulating factor expressed in non-cancer tissues provides predictive powers for recurrence in hepatocellular ca

rcinoma. World J Gastroenterol. 2016 (査読有);22(39):8779-8789.

Sun C, Kono H, Furuya S, Hara M, Hirayama K, Akazawa Y, Nakata Y, Fujii H. Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Chemically Induced Hepatocellular Carcinoma in Mice. Dig Dis Sci. 2016 (査読有);61(2):474-88.

Okamoto H, Kusama T, Fujii H. Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Anchoring Proteins Enhances Human Pancreatic Cancer Cell Invasion. Pancreas. 2016 (査読有);45(7):e37-9. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000629.

Shiraishi K, Mimura K, Kua LF, Koh V, Siang LK, Nakajima S, Fujii H, Shabbir A, Yong WP, So J, Takenoshita S, Kono K. Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility. J Gastroenterol. 2016 (査読有);51(12):1101-1111.

Furuya S, Kono H, Hara M, Hirayama K, Sun C, Fujii H. Interleukin 17A plays a role in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatic injury in mice. J Surg Res. 2015 (査読有);199(2):487-93. DOI: 10.1016/j.jss.2015.05.060.

Hara M, Kono H, Furuya S, Hirayama K, Tsuchiya M, Fujii H. Macrophage colony-stimulating factor plays a pivotal role in chemically induced hepatocellular carcinoma in mice. Hepatol Res. 2014 (査読有);44(7):798-811. DOI: 10.1111/hepr.12174.

Ichikawa S, Ichikawa T, Motosugi U, Sano K, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, Fujii H, Araki T. Presence of a hypovascular hepatic nodule showing hypointensity on hepatocyte-phase image is a risk factor for hypervascular hepatocellular carcinoma. J Magn Reson Imaging. 2014 (査読有);39(2):293-7. DOI: 10.1002/jmri.24164.

〔その他〕

ホームページ等

・山梨大学 研究者総覧

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Index_Main

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤井 秀樹 (FUJII, Hideki)

山梨大学・その他部局等・理事

研究者番号 : 30181316

(2)研究分担者

河野 寛 (KONO, Hiroshi)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号 : 40322127