

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462050

研究課題名(和文) 劇症肝炎におけるキマーゼ阻害剤の有効性の検討

研究課題名(英文) Effect of chymase inhibitor on fulminant hepatitis

研究代表者

林 道廣 (Hayashi, Michihiro)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：90314179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン誘発劇症肝炎ハムスターに対するキマーゼ阻害薬の効果を検討した。リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後、肝臓のキマーゼ活性、MMP-9活性、TNF- α 濃度が著しく増加し、肝臓壊死および血漿中のASTとALTが増加した。キマーゼ阻害薬は肝臓のキマーゼ活性を抑制するだけでなくMMP-9活性やTNF- α 濃度を抑制し、肝臓壊死を予防した。キマーゼ阻害薬は劇症肝炎の増悪を予防するのに有用であった。

研究成果の概要(英文)：The effect of chymase inhibitor was investigated in fulminant hepatitis induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine in hamsters. Hepatic chymase activity, MMP-9 activity and TNF- α concentration were extremely increased, and increases of hepatic necrosis and plasma AST and ALT were observed. Chymase inhibitor reduced not only hepatic chymase activity but also hepatic MMP-9 activity and TNF- α concentration, resulting in prevention of hepatic necrosis. Chymase inhibitor was useful to prevent the progression of fulminant hepatitis.

研究分野：一般・消化器外科学

キーワード：劇症肝炎 キマーゼ MMP 阻害薬 肥満細胞 ハムスター

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎の内科的治療法は限られており、肝移植による外科的治療法のみが確立された治療法であった。現在も大きな進展はなく、新たな治療法の確立が望まれている。

私は「非アルコール性脂肪肝炎におけるキマーゼの役割」の研究課題(科研費基盤研究(C):研究課題番号 23591999、平成 23-25 年度)の成果より、肥満細胞由来のキマーゼがマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9 の活性化を介して肝臓の炎症に重要な役割を担っている可能性を報告した。しかし、劇症肝炎におけるキマーゼの役割やその阻害薬を用いた効果については不明であった。

2. 研究の目的

劇症肝炎モデルをハムスターで作製し、劇症肝炎におけるキマーゼの役割を明らかにすると共にキマーゼ阻害薬の効果を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・劇症肝炎モデル作製および解析時点

7 週齢の雄性ハムスター(日本エスエルシーより購入)にリポポリサッカライド(Escherichia coli, 0111:B4)の 160 µg/kg と D-ガラクトサミンの 400 mg/kg を腹腔内に投与することで劇症肝炎モデルを作製した。リポポリサッカライドと D-ガラクトサミン投与後 1、2、4、24 時間の時点で血液および肝臓組織を解析してキマーゼおよびその関連因子と肝炎症関連因子を解析した。

・薬物投与方法

キマーゼ阻害薬の影響を検討するために、特異的キマーゼ阻害薬(トーアエイヨーより提供)の 10 mg/kg または 30 mg/kg をリポポリサッカライドと D-ガラクトサミン腹腔内投与の 1 時間前に投与した。

・血漿および肝臓の採取方法

採血後、冷蔵遠心機を用いて 4 度、3,000 回転にて 15 分間遠心して血漿を採取し、AST 活性および ALT 活性を測定用として使用するまで -30 度で冷凍保存した。

肝臓組織の一部は、キマーゼ活性、MMP-9 活性および炎症マーカーの Tumor Necrosis Factor (TNF)- α 濃度、過酸化脂質代謝産物のマロンジアルデヒド(MDA)の測定用に摘出直後に液体窒素にて凍凍し、-80 度のディープフリーザーにて保存した。また、別途、肝臓の一部をキマーゼ、MMP-2、MMP-9、TNF- α 、Interleukin (IL)-1、ミエロペルオキシダーゼの遺伝子発現レベルを測定するため、摘出直後に液体窒素にて凍凍し、-80 度のディープフリーザーにて保存した。

肝臓組織切片を用いて組織学的解析を行うため、肝臓の一部を摘出したのち速やかにカルノア固定液に浸漬し、24 時間後にエタノール置換して組織ブロックを作製した。

・生化学的解析

血漿中の AST 活性および ALT 活性の測定は

エスアールエルに依頼した。

肝臓組織の抽出液は、肝臓組織に対して 10 倍量の 20 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)にてホモジネートしたのち冷蔵遠心機を用いて 4 度、10,000 回転にて 30 分間遠心した。その上清液を TNF- α の濃度測定用に用いた。一方、沈殿物は 0.1%Nonidet™ P-40 と 2 M 塩化カリウムを含有する 10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)を用いて再度ホモジネートした。その後、冷蔵遠心機を用いて 4 度、10,000 回転にて 30 分間遠心し、その上清液を用いてキマーゼ活性、MMP-9 活性、MDA 濃度の測定に用いた。

TNF- α の濃度測定は、TNF- α 測定用 ELISA キット(R&D 社)にてマニュアルに従って実施した。

キマーゼ活性は、4 mM のアンジオテンシン I を基質としてキマーゼ阻害薬非存在下で産生されるアンジオテンシン 量とキマーゼ阻害薬(5 mM キモスタチン)存在下で産生されるアンジオテンシン 量より算出した。

MMP-9 活性は、MMP-9 の徳的抗体(R&D 社)と MMP 活性測定用の合成基質である QXL520TM- α -Abu-Pro-Cha-Abu-Smc-His-Ala-Dab(5-FAM)-Ala-Lys-NH₂(AnaSpec Inc)を用いて測定した。

MDA 濃度は、20 mM チオバルビツール酸と 100 度、1 時間インキュベートしたのち冷却し、4 度、10,000 回転にて 30 分間遠心した上清液の吸光度(532 nm)を測定してスタンダードから定量した。

肝臓組織中の遺伝子発現量を定量するため、肝臓組織を TRIzol (Life technologies)を用いてホモジネートし、組織中より mRNA を抽出した。次に SuperScript VIL0(Life technologies)を用いて mRNA から cDNA を作製した。キマーゼ、MMP-2、MMP-9、TNF- α 、IL-1、ミエロペルオキシダーゼ、18S ribosomal RNA (18S rRNA)のプライマーおよびプライマーはロシュ・ダイアグノスティクスにより設計した。TaqMan 法にてリアルタイム PCR(Stratagene Mx3000P)を行った。各遺伝子の発現量は 18S rRNA を用いて補正した。

・組織学的解析

カルノア固定して作製したブロックより 5 µm の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色したのち、壊死面積と全肝臓組織面積より壊死面積率を算出した。また、キマーゼの発現細胞である肥満細胞の単位面積あたりの細胞数を定量するため、トルイジンブルー染色を行った。

4. 研究成果

・ハムスター劇症肝炎モデル

リポポリサッカライドと D-ガラクトサミン投与後 1、2、4、24 時間の時点における血漿中の AST および ALT を図 1 に示す。投与後 24 時間において AST 活性および ALT 活性が著増した。

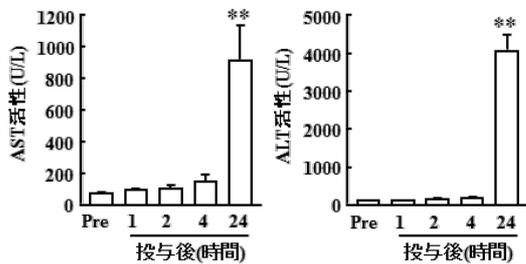


図1. 血漿中のAST活性およびALT活性の経時的変化 (**P<0.01 vs. Pre)

肝臓組織中のキマーゼ活性およびキマーゼにより活性化されるMMP-9活性のリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後1、2、4、24時間の時点の結果を図3に示す。

キマーゼ活性はリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後1時間後より有意な増加を認め、投与後2時間をピークに24時間まで高値を示した。

MMP-9活性も有意差はなかったが、リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後1時間後に明らかな増加傾向を認め、投与後2時間では有意な高値を示した。その後、投与後24時間にかけて低下傾向を示した。

これらの結果は、リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後直後より肝臓組織中のキマーゼ活性およびMMP-9活性が著明に増加することを示す。

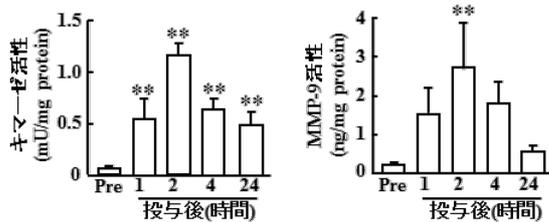


図2 肝臓組織中のキマーゼ活性とMMP-9活性の経時的変化 (**P<0.01 vs. Pre)

肝臓組織中の炎症マーカーのTNF- α 濃度と過酸化脂質代謝産物のMDA濃度のリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後1、2、4、24時間の時点の結果を図3に示す。

TNF- α 濃度はリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後1時間後には著増し、投与後2時間でピークを示したのち急激に低下し、投与後4時間においては有意な高値を示さず、投与後24時間には投与前とほぼ同じ濃度になった。TNF- α は炎症を惹起することが知られていることよりリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与直後より強力な炎症が惹起されていることが示唆された。

MDA濃度はリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後4時間まで変化がなかったが、投与後24時間において有意な高値を示した。MDAは過酸化脂質代謝産物であるので、この結果はリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後24時間までに肝臓が強力

な酸化ストレスを受け、肝臓組織が酸化されたことを示唆する。

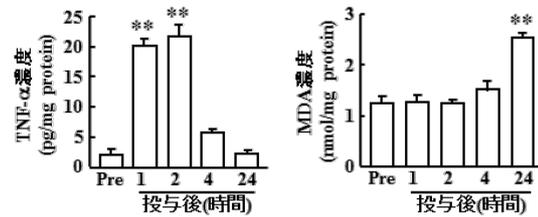


図3 肝臓組織中TNF- α 濃度とMDA濃度の経時的変化 (**P<0.01 vs. Pre)

・キマーゼ阻害薬による影響

キマーゼ阻害薬の効果は、キマーゼに対する特異性が極めて高いTY-51469を用いた。1、3、10、30 mg/kgの濃度のTY-51469を用いて肝臓組織中のキマーゼ活性に対する阻害活性を指標に解析した結果、有意な阻害活性を示すには10 mg/kg以上の濃度が必要であったため、10 mg/kgと30 mg/kgのTY-51469を用いてキマーゼ阻害薬の効果解析することにした。

リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後2時間の時点における肝臓組織中のキマーゼ活性に対してキマーゼ阻害薬は濃度依存的に有意な抑制効果を示した(図4)。

MMP-9活性もキマーゼ活性同様に投与後2時間の時点において、キマーゼ阻害薬により濃度依存的に抑制された(図4)。

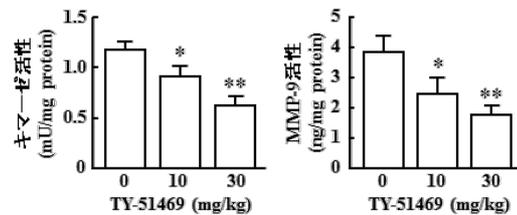


図4 肝臓組織中のキマーゼ活性およびMMP-9活性に対するキマーゼ阻害薬の影響 (*P<0.05, **P<0.01 vs. 0 mg/kg)

リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後2時間の時点における肝臓組織中のTNF- α 濃度に対してキマーゼ阻害薬は30 mg/kgで有意な抑制効果を認めた(図5)。

リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後24時間の時点における肝臓組織中のMDA濃度に対してキマーゼ阻害薬は濃度依存的に有意な抑制を示した(図5)。

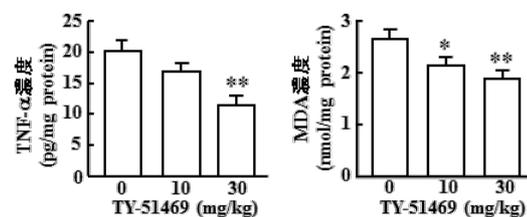


図5 肝臓組織中のTNF- α 濃度およびMDA濃度に対するキマーゼ阻害薬の影響 (*P<0.05, **P<0.01 vs. 0 mg/kg)

リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後24時間の時点における肝臓組織中のAST活性およびALT活性に対してキマーゼ阻害薬は濃度依存的に有意な抑制を示した(図6)。

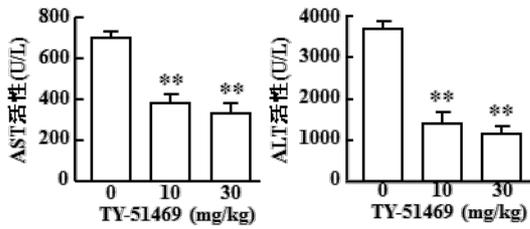


図6 血漿中のTNF-濃度およびMDA濃度に対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01 vs. 0 mg/kg)

リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後2時間の時点における肝臓組織中のキマーゼ、MMP-2、MMP-9、TNF-、IL-1、ミエロペルオキシダーゼの遺伝子発現すべてがキマーゼ阻害薬により濃度依存的に抑制された(図7)。

キマーゼ阻害薬は肝臓組織中のキマーゼ活性だけでなく遺伝子発現も抑制したが、その理由としてキマーゼは骨髄で産生されるキマーゼ非含有の未熟肥満細胞を組織でキマーゼ含有成熟肥満細胞へ分化させることにより、キマーゼ阻害薬によりキマーゼの発現細胞の肥満細胞の分化が抑制された結果、キマーゼの遺伝子発現量も減少した可能性が考えられた。また、他の炎症に関連する因子の遺伝子発現すべてがキマーゼ阻害薬により抑制されることが確認された。

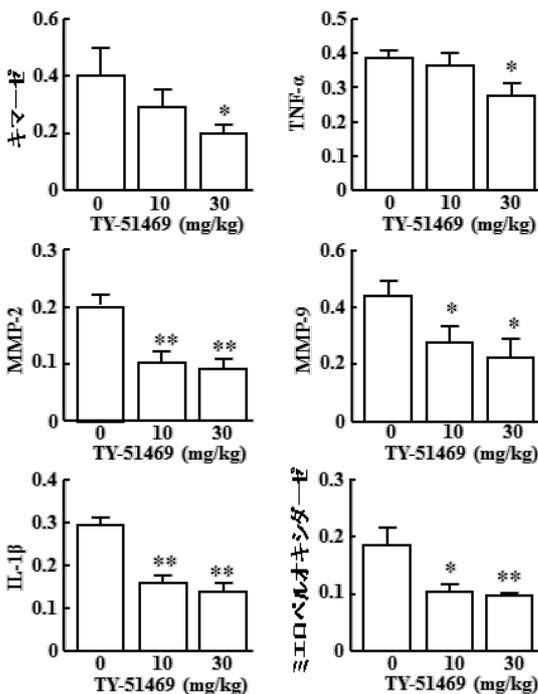


図7 肝臓組織中のキマーゼおよび炎症関連因子の遺伝子発現量に対するキマーゼ阻害薬の影響 (*P<0.05, **P<0.01 vs. 0 mg/kg)

肝臓の組織学的解析としてHE染色を行った結果、正常では全く認められなかった壊死像が、リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後24時間の時点でキマーゼ阻害薬を投与していない群で明らかな壊死像を認めた。キマーゼ阻害薬は濃度依存的に壊死面積率を濃度依存的に有意に抑制した(図8)。

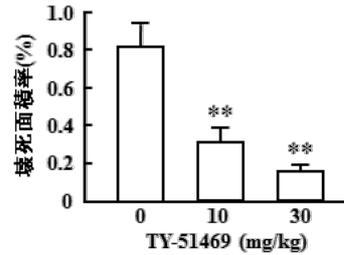


図8 肝臓組織の壊死面積率に対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01 vs. 0 mg/kg)

肝臓組織切片を用いて肥満細胞数の定量を行うため、トルイジンブルー染色した典型的な写真を図9上段に示した。肥満細胞数は正常ではほとんど確認できなかったが、リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与後24時間の時点で著しく増加することが確認できた(図9上段の矢印で示した青紫色に染色された細胞が肥満細胞)。一方、キマーゼ阻害薬は肥満細胞数を濃度依存的に有意に抑制した(図9)。前述したようにキマーゼは肥満細胞の組織中での分化に深く関与することにより、組織中のキマーゼ活性の亢進は肥満細胞数の増加を促進し、逆にキマーゼ活性の阻害により分化が抑制され、結果として肥満細胞数の減少に繋がったと考えられた。

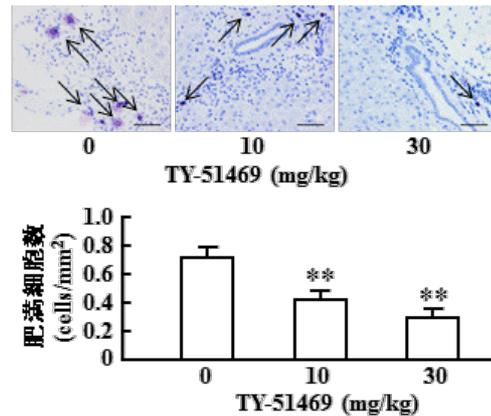


図9 肝臓組織の肥満細胞数に対するキマーゼ阻害薬の影響 (**P<0.01 vs. 0 mg/kg)

以上の結果より、ハムスター劇症肝炎モデルにおいてリポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与直後より肝臓組織中のキマーゼ活性とキマーゼが活性化させるMMP-9活性が亢進し、炎症惹起に深く関与するTNF-やIL-1も著明に増加することが判明した。そして、キマーゼ阻害薬の投与により、リポポリサッカライドとD-ガラクトサミン投与直後に増加する肝臓組織中のキマーゼ活性が

濃度依存的に抑制されたのに伴い、MMP-9、TNF- α 、IL-1 β のすべてがキマーゼ活性同様に濃度依存的に抑制された。そして、リポポリリサッカライドと D-ガラクトサミン投与後 24 時間に観察された肝臓組織の壊死面積および血漿中の AST 活性および ALT 活性をキマーゼ阻害薬は濃度依存的に抑制した。これらの結果は、リポポリリサッカライドと D-ガラクトサミン投与直後に著増するキマーゼが炎症反応を促進して劇症肝炎の症状悪化に深く関与したと、そして、キマーゼ阻害薬が劇症肝炎の症状軽減に有効であったことが示された。

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 2 件)

Osumi W, Jin D, Imai Y, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Maemura K, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Uchiyama K. Recombinant human soluble thrombomodulin improved lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure in mice. J Pharmacol Sci (査読有) 129, 2015, 233-239

Imai Y, Takai S, Jin D, Komeda K, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Chymase inhibition attenuates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure in hamsters. Pharmacology (査読有) 93, 2014, 47-56.

〔学会発表〕(計 2 件)

Osumi W, Jin D, Imai Y, Miyaoka Y, Tashiro K, Komeda K, Hirokawa F, Hayashi M, Takai S, Nishiguchi K, Uchiyama K. Effect of recombinant human soluble thrombomodulin in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure in mice. Digestive Disease Week 2016, May 23, 2016. Chicago (USA)

Imai Y, Takai S, Jin D, Komeda K, Tashiro K, Li ZL, Otsuki Y, Okamura H, Hayashi M, Uchiyama K. Role of chymase in acute liver failure of hamsters induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine. Digestive Disease Week 2014, May 4, 2014. Chicago (USA)

〔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

林 道廣 (HAYASHI Michihiro)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：90314179

(2) 研究分担者

高井 真司 (TAKAI Shinji)
大阪医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80288703

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()