

学 位 論 文 要 旨

氏 名 大久保 博 世



論 文 題 目

「Leukotriene B4 type-1 receptor signaling promotes liver repair after hepatic
ischemia/reperfusion injury through the enhancement of macrophage recruitment
(ロイコトリエン B4 type-1 受容体シグナルはマクロファージの集積増強により
肝虚血再灌流障害後肝修復を促進する)」

指 導 教 授 承 認 印

瀧田昌彦



「Leukotriene B4 type-1 receptor signaling promotes liver repair after hepatic ischemia/reperfusion injury through the enhancement of macrophage recruitment (ロイコトリエンB4 type-1受容体シグナルはマクロファージの集積増強により

肝虚血再灌流障害後肝修復を促進する)」

大久保 博世

【要旨】

肝虚血再灌流障害からの肝修復過程にはマクロファージが関与している。ロイコトリエンB4(LTB4)はマクロファージの走化因子であり、その受容体 BLT1 はマクロファージに発現している。そこで、肝虚血再灌流障害後の肝修復に果たす BLT1 受容体の役割について検討した。

BLT1 knockout mouse (BLT1^{-/-}) または野生型マウス (WT) に 70%肝部分虚血を行い、再灌流後の肝修復について比較検討した。BLT1^{-/-}は WT と同様に再灌流 24 時間後に肝障害のピークを迎えた。しかしながらその後の肝修復や肝細胞増殖発現が遅延し、肝再生因子である EGF を産生するマクロファージの障害肝への集積が抑制された。また WT に EGF 中和抗体を投与すると、肝修復過程やマクロファージ集積が抑制された。

BLT1 受容体シグナルは肝虚血再灌流後に障害肝へマクロファージを集積させて肝再生因子 EGF を産生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。

【背景】

肝虚血再灌流は肝切除術、肝移植術、hypovolemic shock などでは回避できないものであり、その後の再灌流肝障害は臨床的に問題となる。肝虚血再灌流障害も重大な要素であるが、虚血再灌流は同時に、傷害肝組織の修復、炎症収束、壊死組織の除去、肝類洞の再構築や肝再生などの修復反応を引き起こす。従って肝虚血再灌流障害からの肝再生・修復過程が遅延すると術後肝障害ひいては肝不全に至り患者の予後を規定することになる。

急性肝障害後の肝組織修復にはマクロファージの関与が示唆されている¹⁾。我々も、アセトアミノフェンや四塩化炭素などによる薬剤誘導性肝障害モデルを用い、肝組織修復過程にはマクロファージの動員が重要であることを報告した^{2) 3)}。

ロイコトリエン B4(LTB4)はマクロファージが炎症巣に集積するための強力な走化因子のひとつとして知られている。LTB4 はアラキドン酸から 5 リポオキシゲナーゼの作用により、合成される。この LTB4 に対する受容体には高親和性の BLT1 と低親和性の BLT2 がある。BLT1 の発現は好中球やマクロファージに高発現し、他臓器に発現せず、炎症や虚血再灌流に関与している。

そのため、肝虚血再灌流障害からの肝修復過程には BLT1 受容体シグナルを介したマクロファージの集積が関与しているものと考えられ、本研究では肝虚血再灌流後の肝修復過程における BLT1 受容体シグナルの役割を解明した。

【方法】

(1) 肝虚血再灌流

7~9 週令の雄性 BLT1 knockout mouse (BLT1^{-/-}) または野生型マウス (WT) に 70%肝部分温虚血

(60 分間)を行った。再灌流後 6、24、48、96 時間の血清 ALT、肝壊死面積、PCNA 染色、肝組織 mRNA 発現(real time RT-PCR)、蛍光免疫染色などの経時的变化を比較検討した。

(2) EGF中和抗体投与

WTの腹腔内にEpidermal growth factor(EGF)中和抗体(1.0 mg/kg body weight; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を投与し、再灌流後48時間における同様の検討を行った。コントロールは、goat immunoglobulin G (IgG)を腹腔内投与した。

(3) 腹腔マクロファージ

雄性BLT1 knockout mouse (BLT1^{-/-}) または野生型マウス (WT) に4%チオグリコレート(Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan)を腹腔内投与し、2×5mlのPBSで腹腔内マクロファージを回収した。RPMI 1640 mediumで1wellあたり2×10⁶cells/wellとし6-well tissue cultureで1時間の接着を行った。6-well としLTB4(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)で刺激し、培養実験を行った。

【結果】

(1) 肝修復・肝細胞増殖

WTの肝臓におけるBLT1 mRNA 発現は、再灌流後24時間(13.5倍)と48時間(6.5倍)で有意に増加した。5LOX mRNA についても24時間(14.5倍)をピークに48時間(13.2倍)でも有意に増加したものの群間での差は認めなかった。

血清ALT値を測定したところ、WTで再灌流後6時間後にピーク(30673±6799U/L)となり、以後減少し96時間後でシャムレベルまで戻った。BLT1^{-/-}においても、6時間後にピークとなり24時間後ではWTと有意差は認めなかった。しかしながら、48時間と96時間後のレベルはBLT1^{-/-}に対し1.9倍と2.2倍と有意に増加した。

肝壊死面積はWTで24時間32%壊死、48時間28%壊死、96時間15%壊死と推移した。BLT1^{-/-}において24時間31%壊死、48時間41%壊死、96時間40%と48時間と96時間で有意に高値を示した。これらの結果から、BLT1受容体シグナルは再灌流障害の成立機序には関与せず、肝組織修復に関与していることが示唆された。

肝細胞増殖をPCNA染色で評価すると、BLT1^{-/-}でPCNA陽性率の増加がWTより遅延し、BLT1シグナルが再灌流後の肝細胞増殖に関与していることが示唆された。

(2) 肝再生因子

次に肝組織修復のメカニズムを解析するために肝再生に関連した増殖因子をPCR法にて検討した。IL-6やTNFはBLT1^{-/-}でむしろその発現は増加しており、再生・増殖に関係するというよりも障害に関係しているものと推察された。HGFは両マウスに差はなかった。EGFはWTでBLT1^{-/-}よりも再灌流後6時間で4.2倍、24時間後で4.6倍、48時間後で3.8倍増強した。このことは、BLT1シグナルはEGFを増強させて肝組織修復を促進している可能性を示唆した。血管新生因子の関与を調べるとVEGF-Aは6時間で6.2倍、VEGFR1は24時間と48時間で9倍と4.1倍とそれぞれ、WTで有意に増強した。以上から、肝虚血再灌流障害後の肝修復にはEGFとVEGFR1の関与が示唆された。

(3) 集積マクロファージ

マクロファージの関与を免疫蛍光染色にて検討した。常在マクロファージのマーカーである F4/80 は虚血再灌流後に減少し、徐々に増加したが群間には差は認めなかった。集積マクロファージマーカーである CD11b は WT で増加したが、BLT1^{-/-}で減少した。また好中球マーカーである Ly6B は両群で増加したが群間では差はなかった。VEGFR1 陽性細胞数は WT で増加し BLT1^{-/-}で減少した。このことから、CD11b と VEGFR1 陽性細胞の関与が示唆された。

さらに免疫蛍光染色の共染色では、マクロファージに発現する VEGFR1 は、CD11b と共染色されたが、F4/80 や Ly6B との重なりほとんどなかったことから、VEGFR1 陽性細胞は CD11b 陽性マクロファージと考えられた。また、VEGFR1 陽性マクロファージが BLT1^{-/-}において減少したことから、BLT1 シグナルは好中球だけでなく、VEGFR1 陽性マクロファージを集積させる役割を果たしている可能性が示唆された。

更にマクロファージが EGF を産生しているかどうかを調べた。すると、EGF 陽性細胞数は VEGFR1 陽性細胞数と同様、WT で再灌流 48 時間後に増加し BLT1^{-/-} で減少した。この EGF 陽性細胞は VEGFR1 と共在し、VEGFR1 マクロファージから EGF が産生される可能性が示唆された。

(4) 肝修復に対する EGF 効果

そこで、実際に EGF が肝修復に寄与しているかを調べるために EGF 中和抗体を投与した。再灌流後 48 時間の ALT は 2.1 倍、壊死面積は 1.5 倍、出血壊死面積は 3.1 倍と抗体群が対照群より高値を示し、PCNA 比は低値を示した。すなわち、EGF は肝組織修復を促進させた。さらに、マクロファージの集積効果を検討すると、抗体群で、CD11b 陽性細胞と VEGFR1 陽性細胞の傷害肝への誘導が抑制された。

(5) 腹腔マクロファージの増殖因子産生

BLT1 シグナルがマクロファージから EGF を産生しているかどうか腹腔マクロファージを用いて確認した。WT マクロファージは LTB4 刺激により濃度依存性に VEGFR1、EGF、VEGFA の発現が増強した。一方、BLT1^{-/-}では、発現増強はなかった。

【考察】

肝虚血再灌流障害後に肝修復・再生過程が遅延あるいは破綻すると、術後肝障害ひいては肝不全となり重大な事象となる。肝虚血再灌流障害や薬剤性肝障害などの急性肝障害からの肝組織修復や肝再生にはマクロファージが重要な役割を果たしている¹⁾。我々も最近、アセトアミノフェンや四塩化炭素などによる薬剤誘導性肝障害モデルを用い、肝組織修復過程には傷害を受けた肝にマクロファージが集積することが重要であることを報告した^{2) 3)}。しかしながら、その制御機構については十分な解明はなされていない。

LTB4 はマクロファージを含む白血球の強力な走化性因子として知られ、LTB4 レセプター1 型 (BLT1) はマクロファージ上に発現している。LTB4/BLT1 シグナルは、肺の感染症⁴⁾や腹膜炎⁵⁾などの急性炎症モデルにおいてマクロファージの炎症巣への誘導に関与している。BLT1 シグナルによって誘導されるマクロファージが、肝虚血再灌流障害後の肝修復や肝再生に寄与するかどうかは不明であった。本研究では、BLT1 シグナリングが肝虚血再灌流障害で障害を受けた部位にマクロファージを誘導し、EGF 発現の増強を介して肝修復を促進することを示した。

肝虚血再灌流では主として常在マクロファージであるクッパー細胞や集積した好中球から LTB4 が産生される⁶⁾。その後、BLT1 シグナルによって、マクロファージが傷害肝に集積するものと考えられる。BLT1 シグナルは肝修復作用を示したが、肝再生因子 VEGF とその受容体 VEGFR1 が増強していた。VEGF は血管新生や組織再生に深く関与している。また VEGFR1 はマクロファージに発現し、その VEGFR1 陽性マクロファージは炎症部位に集積して^{2,7)}、肝修復を促進させる²⁾。そこで、本研究でも VEGFR1 発現を検討したところ、傷害肝に VEGFR1 陽性マクロファージが集積し、その集積は BLT1 シグナルに依存していた。さらに、VEGFR1 陽性マクロファージは EGF を発現した。EGF は肝再生に必須のメディエーターであることは知られているので、EGF が肝虚血再灌流後の肝修復に関わっていることを確認するために、WT に EGF 中和抗体を投与した。すると、EGF 抗体投与により、肝修復の遅延、肝細胞増殖の減弱、マクロファージ集積の抑制などがみられた。

さらに、マクロファージ上の VEGFR1 発現や、マクロファージからの EGF 発現が確かに BLT1 シグナルを介しているかどうかを、単離腹腔マクロファージを用いて調べた。LTB4 刺激によりマクロファージに VEGFR1 や EGF が発現し、BLT1^{-/-}ではそれらの発現が抑制された。なお、BLT1 シグナルは NFκB を介して EGF 産生している可能性を我々は確認した。

以上から、BLT1 シグナルは VEGFR1 陽性マクロファージを傷害肝に集積させ EGF を産生することによって、肝虚血再灌流後の肝修復ならびに肝再生を促進させることが示唆された。

【引用文献】

- 1) Laskin DL: Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chem Res Toxicol* 22: 1376-1385, 2009.
- 2) Kato T, Ito Y, Kanako H, et al, Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes liver repair through restoration of liver microvasculature after acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 120, 218-229, 2011.
- 3) Minamino, T., Ito, Y., Ohkubo, H., et al.: Thromboxane A(2) receptor signaling promotes liver tissue repair after toxic injury through the enhancement of macrophage recruitment. *Toxicol Appl Pharmacol* 259(1): 104-114, (2012)
- 4) Mancuso, P., Lewis, C., Serezani, C. H., et al.: Intrapulmonary administration of leukotriene B4 enhances pulmonary host defense against pneumococcal pneumonia. *Infect Immun* 78(5): 2264-2271, (2010)
- 5) Matsukawa, A., Hogaboam, C. M., Lukacs, N. W., et al.: Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protects mice in a model of acute septic peritonitis: cross-talk between MCP-1 and leukotriene B4. *Immunol* 163(11): 6148-6154, (1999)

- 6) Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 290(6):G1083-1088, (2006).
- 7) Shibuya M: Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 41: 278-286, (2008).