

学位論文要旨

氏名 古城 憲



論文題目

「BLT1 signalling protects the liver against acetaminophen hepatotoxicity by preventing excessive accumulation of hepatic neutrophils」

(BLT1 受容体シグナルは好中球の過剰な集積を阻害することでアセトアミノフェン肝障害に対して防衛的に作用する)

指導教授承認印



BLT1 signaling protects the liver against acetaminophen hepatotoxicity by preventing excessive accumulation of hepatic neutrophils

(BLT1受容体シグナルは好中球の過剰な集積を阻害することでアセトアミノフェン肝障害に対して防御的に作用する)

古城憲

要旨

【背景・目的】

アセトアミノフェン(Acetaminophen ; N-acetyl-para-aminophenol) (APAP) の過量投与は小葉中心性の出血性壊死とトランスアミナーゼの高値に特徴的な深刻な肝障害を引き起こす。APAP 肝障害においては cytochrome P450 ファミリーによって水酸化され形成される代謝産物 (N-acetyl-p-benzoquinone imine; NAPQI) が中心的役割を果たす。NAPQI は通常 GSH によって抱合を受け無毒化されるが、過量投与によって NAPQI が肝内に蓄積するとミトコンドリアの機能不全と浸透圧壊死を起こす。APAP の過量投与後に浸透圧壊死を引き起こす細胞内シグナル経路は APAP 肝障害のメカニズムにとって重要なものである。

加えて、APAP の代謝産物による直接的な肝細胞障害に引き続いて起こる免疫反応は APAP 肝障害を調節していると考えられている。しかし、好中球などの免疫細胞の集積が APAP 肝障害においてどのような役割を果たしているかは現在のところ明らかになっていない。マクロファージや単球などの細胞は壊死組織の食食と組織の再生を促進することで APAP 肝障害の収束と肝再生に関わっていることが明らかになっており、障害を受けた肝細胞と免疫細胞が産生する炎症性メディエーターは APAP 肝障害において重要な役割を果たす。Prostaglandins (PGs) などのプロスタノイドはアラキドン酸から cyclooxygenase (COX) の作用を受けて産生される。PGE2 はゼブラフィッシュの APAP 肝障害において肝保護的な働きをし、また COX-2 はマウスの肝臓を APAP 肝障害から保護する働きを持っている。

Leukotrienes (LTs) も同様にアラキドン酸から 5-lipoxygenase の作用を受けて産生される。LTB4 は顆粒球、特に好中球の強力な走化因子であり、炎症における重要なメディエーターである。LTB4 は 2 種類の異なる受容体に結合する。LTB4 受容体 Type1 (BLT1) は高親和性の受容体であり、LTB4 受容体 Type2 (BLT2) は低親和性受容体である。LTB4 の強力な生物学的効果は好中球やマクロファージ、単球などの炎症性細胞に主に発現している。BLT1 シグナルは様々な炎症性疾患において、炎症部位に好中球を遊走させる極めて重要な役割を担っている。

しかし、APAP 肝障害における BLT1 シグナルの働きについてはまだ明らかになっていない。したがって、この研究では APAP 肝障害が好中球の集積を含む炎症反応にどのように影響しているのを検証した。

【方法】

(1)マウスに対する処置

8週齢の雄性 BLT1 ノックアウトマウス (BLT1^{-/-}) または野生型マウス (C57BL/6, WT) を使用した。全てのマウスに対して、一晩の禁食の後 APAP (300mg/kg) を腹腔内に単回投与した。また、WT に対して選択的 BLT1 アンタゴニストである ONO-4057 (10mg/kg) を APAP と同時投与した。さらに別の WT に対して CXCL2 抗体 (5mg/kg) を APAP と同時投与した。

(2)肝障害度評価

APAP 投与後、0,6,24 時間の血清 Alanine aminotransferase(ALT)値を測定し、生化学的評価を施行した。組織学的評価は Hematoxylin and Eosin(H.E)染色にて、肝出血面積および肝壊死範囲面積を測定した。

(3)免疫組織学的評価

肝障害部位に集積する免疫細胞の評価のため、肝組織の凍結検体を用いて、5-LOX、好中球の抗体として Gr-1、マクロファージの抗体として CD68、類洞内皮細胞の抗体として CD31 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。また Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) について蛍光免疫染色を行った。

(4)Real-time PCR を用いた炎症性サイトカイン、ケモカイン発現の検討

ホモジナイズした肝組織から RNA を採取し、5-LOX、BLT1、BLT2、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、MMP-2、MMP-9、PAI-1、CXCL1、CXCL2、CXCR1、CXCR2 の発現について Real-time PCR で比較検討した。

(5)GSH/GSSG 産生の検討

LTB4/BLT1 シグナルが APAP の代謝経路に及ぼす影響を検討するため、肝組織からタンパクを採取し、BIOXYTECH GSH/GSSG Assay kit (OxisResearch, Portland, OR, USA) を用いて GSH、GSSG の産生量を比較検討した。

(6)肝組織からの白血球の採取、及びフローサイトメトリーによる好中球の分析

肝組織を生体下に PBS で灌流し、IV型コラゲナーゼで処理したあと 33%パーコール液を加えて遠心分離し白血球を分離した。Ly6G 抗体 (PE 標識)、CD11b 抗体 (PE-Cy7 標識) で染色し、フローサイトメトリーを用いて計測した。Ly6G^{hi}/CD11b^{hi}細胞を好中球とした。

(7)活性酸素産生能の評価

好中球の活性化の指標として活性酸素産生を評価した。(6)で定義した好中球を diphenyleneiodonium、Phorbol 12-myristate 13 acetate で処理し Dihydrorhodamine-123 を加えて、活性酸素産生能をフローサイトメトリーで計測した。

(8)骨髄由来好中球移入

BLT1^{-/-}の骨髄細胞を採取し、Neutrophil Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を用いて好中球を単離した。WTに対してAPAP投与6時間後に好中球 4×10^6 個を尾静脈から移入し、APAP投与後の24時間の血清ALT、壊死面積、集積好中球数を比較検討した。

(9)好中球培養実験

骨髄から採取した好中球をLTB4で直接刺激し1時間培養した後、mRNAを採取してRT-PCRでMMP-9、CXCR1、CXCR2の発現を比較検討した。

【結果・考察】

(1)生存率、肝障害度の評価

APAPを投与96時間後の生存率はWTが100%であったのに対して、BLT1^{-/-}では48時間で約半数が死亡し、96時間後の生存率は32.4%であった。血清ALTはWTでは6時間でピークに達し24時間で低下したのに対して、BLT1^{-/-}では24時間後も高値を示した。APAP投与後24時間の壊死面積はBLT1^{-/-}はWTと比較して23%増えており、出血面積はBLT1^{-/-}がWTの2.5倍であった。WTに選択的BLT1アンタゴニストを投与した群でも同様にAPAP投与後の肝障害の増悪が認められた。これらの結果から、LTB4/BLT1シグナルがAPAPによる障害から肝類洞内皮細胞を保護している可能性が示唆された。

(2) 壊死巣への好中球の集積

免疫染色において、Gr1陽性細胞を観察すると、WT、BLT1^{-/-}両群とも壊死巣にGr1陽性細胞の集積が観察されたが、BLT1^{-/-}におけるGr1陽性細胞数はWTよりも2.9倍多く、特に類洞外のGr1陽性細胞数は4.7倍多かった。APAP投与後24時間における、好中球のケモカインとそのレセプターであるCXCL2、CXCR1、CXCR2のmRNA発現はBLT1^{-/-}で有意に増強していた。ONO-4057を投与した群でも同様にAPAP投与後24時間で壊死巣に集積したGr1陽性細胞数が有意に増加し、CXCL2、CXCR1、CXCR2の発現が有意に増強した。また抗CXCL2抗体をBLT1^{-/-}に投与すると、集積好中球数が減少し、肝障害が減弱した。これらの結果からAPAP投与による壊死巣には好中球が集積するが、好中球の集積にはBLT1シグナルが関与し、LTB4/BLT1シグナルはCXCL2、CXCR1、CXCR2の発現抑制を介して、壊死巣への好中球の集積を抑制している可能性が考えられた。

(3) APAP代謝に対する影響の評価

LTB4/BLT1シグナルがAPAPの代謝に与える影響を評価するためにCYP2E1のmRNA発現とGSH/GSSGタンパク量を評価した。いずれにおいてもWT、BLT1^{-/-}両群間で有意な差は認められなかった。

(4) 炎症性サイトカインの関係の評価

炎症性サイトカインのmRNAの発現を比較検討すると、APAP投与後24時間におけるTNF α 、IL-1 β 、IL-6の発現がBLT1^{-/-}で有意に増強した。またMatrix metalloproteinase(MMP)-9とPAI-1の発現がBLT1^{-/-}で増強した。抗CXCL2抗体を投与したBLT1^{-/-}ではこれらのサイトカインのmRNA発現が減弱した。一方、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)-Aとその受容体(VEGFR1)の発現はBLT1^{-/-}で減弱していた。このことからAPAP肝障害には炎症性サイトカインが関与しており、LTB4/BLT1シグナルは炎症性サイトカインの発現を抑制し、血管増殖因子の発現を増強させていると考えられた。

(5) 集積好中球の活性化の評価

フローサイトメトリーで好中球の活性化を評価したところ、Ly6G^{hi}/CD11b^{hi}細胞数はBLT1^{-/-}で有意に高値であり、これらの細胞の活性酸素種(ROS)の産生能はBLT1^{-/-}で有意に

高かった。これらの結果から BLT1-/-にはより活性化した好中球が集積していることが示唆された。また好中球の遊走の指標である CD11b/ICAM-1 の mRNA 発現は共に BLT1-/-で有意に増強していた。このことから、LTB4/BLT1 シグナルは好中球の活性化を抑制している可能性が示唆された。

(6) BLT1-/-好中球移入実験

BLT1-/-の骨髄から採取した好中球を WT に移入すると、対照群と比較して APAP 投与後の血清 ALT、壊死面積が有意に高値となり、壊死巣への集積 Gr1 陽性細胞数が優位に増加した。この結果から LTB4/BLT1 シグナルを欠く好中球はより多く壊死巣に集積し、強い肝障害を引き起こすと考えられた。

(7) 好中球に対する LTB4 刺激による MMP-9 発現の抑制

BLT1-/-では MMP-9 を発現した好中球数が WT と比較して有意に増加した。また、骨髄から採取した好中球を LTB4 で刺激して培養すると WT と比較して BLT1-/-の MMP-9 mRNA の発現が有意に高かった。この結果は LTB4/BLT1 シグナルは好中球における MMP-9 の発現を抑制していると考えられた。

【結論】 アセトアミノフェン肝障害において BLT1 受容体シグナルは、障害肝への過剰な好中球の集積を抑制し、活性酸素、TNF α 、IL-1 β 、IL-6、MMP-9 の産生を阻害することで肝障害に対して防御的に働いていることが示唆された。