

学位論文

「肝樹状細胞によるプロスタグランジン E<sub>2</sub>-EP3 受容体シグナルを介した肝修復制御機構の解明」

DM17023 中本 修司

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
臨床医科学群 外科学  
指導教授 比企 直樹

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 論文要旨

### 【背景・目的】

肝外科手術後に発症する肝虚血再灌流障害(I/R)は、肝修復過程が障害されることにより肝不全に至り、患者の予後に重大な影響を与える。そのため、急性肝障害後における肝組織修復の制御機構の解明は重要な課題である。

急性肝障害時の肝組織内では、単球が傷害肝に集積し、マクロファージに分化して炎症の惹起と収束に関与している。肝マクロファージは、傷害を受けた肝組織を治癒させるために、その表現型を炎症誘導性から組織修復性マクロファージに切り替える。このマクロファージの可塑性は、肝臓の創傷治癒に不可欠であるが、そのメカニズムについてはほとんど知られていない。またマクロファージに加えて、樹状細胞(DC)は自然免疫系の重要なイニシエーターであり、肝障害後の炎症の調整をしていることが報告されている。しかし、肝DCがマクロファージ表現型のスイッチを介して炎症の収束、組織修復に関与するかどうかは明らかでない。

我々はこれまでに生理活性脂質であるプロスタグランジン(PG) $E_2$ が肝I/R後の肝修復に重要な役割を果たしていることを報告している。特にPGE $_2$ の最終合成酵素mPGES-1を阻害すると、EP4シグナル伝達の抑制によりLy6C<sup>high</sup>からLy6C<sup>low</sup>へのマクロファージの表現型の切り替えを介して肝修復が促進されることを見出している。対照的に、EP3シグナルは傷害部にマクロファージを動員することによって組織修復を促進し、さらにEP3特異的拮抗薬によって肝I/R後の肝修復の遅延を示したことから、肝障害後の肝修復に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

そこで我々は、肝微小環境において肝DCがマクロファージを含む免疫細胞とクロストークすることで肝組織修復に関与する可能性を考えた。したがって、肝DCにおけるEP3シグナルが肝I/R後の組織修復を促進するためにマクロファージの表現型にどのような影響を与えるのかを調べるために本研究を実施した。

### 【実験方法】

8-9週齢の雄性野生型マウス(WT)とEP3受容体欠損マウス(EP3<sup>-/-</sup>)を用いて、麻酔下に肝臓の70%を支配する血管を45分間遮断する肝部分温虚血再灌流障害モデルを作製した。再灌流後0, 6, 24, 48, 72, 96および120時間で傷害肝を摘出した。肝障害の指標として血清ALT値、肝壊死面積の測定を行った。EP3シグナルによる炎症調整機構の評価として免疫染色、real-time RT-PCR、フローサイトメトリーによる解析を行った。DCによる肝組織修復作用を評価するため、骨髓細胞よりGM-CSF誘導下に分化培養した単球由来DC(moDC)の養子移入を行った。マクロファージおよびDCの相互作用を評価するために単独および共培養での実験を行った。また細胞レベルでのサイトカイン評価のためIL-13およびIL-13中和抗体を培養細胞に加えて実験を行った。

### 【結果】

1. WTおよびEP3<sup>-/-</sup>を比較した肝I/R後の肝障害レベルは、血清ALT値、壊死面積ともに再灌流後6時間でピークを認め有意差を認めなかったが、24-72時間においてEP3<sup>-/-</sup>はWTよりも有

意に高値を示した。また肝再生を PCNA 染色で評価したところ、EP3<sup>-/-</sup>で有意に抑制され、肝再生の遅延を認めた。さらに EP3<sup>-/-</sup>では WT と比較して組織修復因子である EGF, HGF, VEGFA, VEGFR1 の mRNA 発現の有意な低下を認めた。

2. 傷害肝に集積するマクロファージ (CD68 陽性細胞) は再灌流後 48 時間でピークに達し、EP3<sup>-/-</sup>では 24-72 時間で WT よりも有意に多くの集積を認めた。また肝 I/R 後のマクロファージの表現型は WT と比較して EP3<sup>-/-</sup>において炎症誘導性マクロファージ (CD11 b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup>/F4/80<sup>high</sup>) の増加、組織修復性マクロファージ (CD11 b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>/F4/80<sup>high</sup>) の減少を認めた。
3. DC の指標となる CD11c の mRNA 発現は WT において EP3<sup>-/-</sup>と比較し、再灌流後 24-72 時間で有意な増加を認めた。さらに EP3 と CD11c の共発現する細胞は傷害境界領域に集積し、再灌流後 48-96 時間で細胞数が増加した。フローサイトメトリーでは、DCs のサブタイプの中で moDC (MHC-II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup>) が再灌流後 48-72 時間で EP3<sup>-/-</sup>と比較して有意に高値を示した。
4. 養子移入実験において GM-CSF 誘導下に分化培養した GFP 陽性 moDC を静脈内投与すると免疫染色で傷害境界領域に細胞の集積を認めた。また GFP 陽性 EP3 受容体欠損 DC 投与群において傷害部への DC 集積が有意に抑制された。野生型 DC 投与群は EP3 受容体欠損 DC 投与群と比して肝障害レベル (血清 ALT 値, 肝壊死面積) の減弱および PNCA 染色の増強を認めた。さらに野生型 DC 投与群は EP3 受容体欠損 DC 投与群と比較して肝再灌流後の Ly6C<sup>low</sup> マクロファージの増加、Ly6C<sup>high</sup> マクロファージの減少を示した。
5. 骨髄マクロファージ (BMMs) は moDC と共培養したときに EP3 シグナル依存性に組織修復性マクロファージ関連マーカー (MR, Fizzl, IL-10) の mRNA 発現の増強を認めた。単独培養での moDC は EP3 シグナル依存性に IL13 発現量の増加を認めたが、BMMs では発現量の変化を認めなかった。また rIL-13 で BMMs を刺激すると組織修復性マクロファージ関連マーカーの発現量の増加を認め、EP3 アゴニスト存在下での共培養で抗 IL-13 中和抗体を投与すると、BMMs の組織修復性マクロファージ関連マーカーの発現量が抑制された。

#### 【結語】

肝 I/R によって合成される PGE<sub>2</sub> は EP3 シグナル伝達により傷害肝に moDC を動員して IL-13 を放出し、炎症誘導性マクロファージから組織修復性マクロファージに形質転換を引き起こすことで肝組織のリモデリングを促進する可能性が考えられる。また、肝 I/R における EP3 受容体作動薬は、DC を標的とした肝修復・肝再生の新たな治療戦略になり得る可能性が考えられる。



## 目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 動物	2
2-2. 動物操作	2
2-3. 実験プロトコール	2
2-4. 骨髄移植	2
2-5. 組織免疫染色	2
2-6. 蛍光免疫染色	3
2-7. リアルタイム RT-PCR	3
2-8. 肝臓内の血球分離	3
2-9. フローサイトメトリー	4
2-10. 細胞培養	4
2-11. 共培養	4
2-12. 骨髄由来樹状細胞の養子移入	5
2-13. 統計解析	5
3. 結果	
3-1. EP3 受容体欠損マウスの肝修復の遅延	6
3-2. マクロファージの肝組織浸潤	6
3-3. 単球由来樹状細胞は肝虚血再灌流後の肝臓に集積する	6
3-4. moDCs の養子移入は肝虚血再灌流後の肝修復を促進する	6
3-5. moDC とマクロファージ間のクロストーク	7
4. 考察	9
5. 総括	11
6. 引用文献	12
7. 図表	14

## 1. 序論

肝切除や肝移植術後に発症する肝虚血再灌流障害(I/R)は、炎症の収束や組織の修復過程が阻害されることで肝障害の遷延化や肝不全に至る。残存肝の再生能はこれらの転帰を規定する重要な因子であり<sup>1),2)</sup>、術後合併症や死亡リスクと相関することが知られているため<sup>3)</sup>、急性肝障害後の肝組織修復の制御機構の解明は重要な課題である。

急性肝障害時の肝組織内では、単球が傷害肝に集積し、マクロファージに分化して炎症の惹起と収束に関与している。肝マクロファージは、傷害を受けた肝組織を治癒させるために、その表現型を炎症誘導性から組織修復性マクロファージに切り替える。この変換は、急性肝障害の修復段階で非常に重要であるが<sup>4),5)</sup>、根本的なメカニズムについてはほとんど知られていない。またマクロファージに加えて、樹状細胞(DC)が様々な組織修復のプロセスに重要な役割を果たすことが報告されている<sup>6)</sup>。DCはサイトカインやケモカインを産生することによって免疫細胞の活性化に寄与する骨髄由来の抗原提示細胞であり、一般的に従来型樹状細胞(cDC)、形質細胞様樹状細胞(pDC)、単球由来樹状細胞(moDC)のサブセットが存在する<sup>7),8)</sup>。最新の研究では、肝障害の抑制効果と増強効果の両方が報告されており、cDCは肝I/Rに対して保護的な作用を示すが<sup>9),10)</sup>、一方で、pDCは肝I/Rを増悪させると考えられている<sup>11),12)</sup>。さらにDCは組織の再構成に寄与しており、修復期に梗塞した心臓に浸潤して心機能を回復させる(これは炎症誘発性マクロファージの心臓蓄積の減少と関連している)<sup>13)</sup>。また、DCは肝線維症の回復期に肝内炎症と線維化の回復を促進させる働きがある<sup>14)</sup>。しかし、肝DCがマクロファージ表現型のスイッチを介して炎症の収束、組織修復に関与するかどうかは不明である。

生理活性脂質であるプロスタグランジン(PG)E<sub>2</sub>は細胞膜中のリン脂質より遊離されたアラキドン酸の代謝産物であり、主に炎症や免疫応答を含む様々な病態生理学的プロセスにおいて重要な役割を果たしている<sup>15)</sup>。PGE<sub>2</sub>の多様な作用は4つのGタンパク質共役受容体サブタイプ(EP1, EP2, EP3, EP4)によって媒介される。以前、我々はPGE<sub>2</sub>の最終合成酵素mPGES-1を阻害すると、EP4シグナル伝達の抑制によりLy6C<sup>high</sup>からLy6C<sup>low</sup>へのマクロファージの表現型の切り替えを介して肝I/R後の肝修復が促進されることを報告した<sup>16)</sup>。対照的に、EP3シグナルは傷害部にマクロファージを動員することによって組織修復を促進し<sup>17),18)</sup>、EP3特異的拮抗薬によって肝I/R後の肝修復の遅延を示した。また、心筋組織においてEP3の活性化は、Ly6C<sup>low</sup>マクロファージの虚血心筋への動員を調節して梗塞巣を治癒するという報告があることから<sup>19)</sup>、EP3シグナルは肝障害後の肝臓修復に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

そこで我々は、肝微小環境において肝DCがマクロファージを含む免疫細胞とクロストークすることで肝組織修復に関与する可能性を考えた。したがって、肝DCにおけるEP3シグナルが肝I/R後の組織修復を促進するためにマクロファージの表現型にどのような影響を与えるのかを調べるために本研究を実施した。

## 2. 方法

### 2-1. 動物

8-9 週齢, 20-25g の雄性 C57BL/6 野生型マウス (WT) (日本クレア、東京、日本)、当教室で保有している EP3 受容体欠損マウス (EP3<sup>-/-</sup>) および GFP マウス (大阪大学遺伝情報実験センターより提供) を用いて実施した。GFP 発現 EP3<sup>-/-</sup> は、GFP マウスを EP3<sup>-/-</sup> と交配育種することにより作製した。これらマウスは、12 時間の明暗サイクルで一定湿度 (60%±5%) および温度 (25° C±1° C) に維持し実験を行った。すべての実験手順は、北里大学医学部の動物実験および倫理委員会 (2017-59) によって承認され、北里大学医学部によって概説された動物実験のガイドラインに従って行った。実験後は、麻酔下での放血および頸部脱臼により動物を安楽死させた。

### 2-2. 動物操作

麻酔下に開腹術を実施し、外科用クリップ (ROBOZ Surgical Instrument, Washington DC, USA) を使用して、肝臓の 70% を支配する血管 (中央および左肝葉への血流) を 45 分間遮断する肝部分温虚血再灌流障害モデルを作成した<sup>16), 20)</sup>。再灌流後、4ml/kg の生理食塩水を腹腔内投与し、4-0 ナイロン縫合糸にて閉腹した。麻酔法は、塩酸メドトミジン (0.75 mg / kg) (日本全薬工業株式会社、福島、日本)、ミダゾラム (4.0 mg / kg) (アステラス製薬、東京、日本)、およびブトルファノール (5.0 mg / kg) (明治製菓ファーマ株式会社、東京、日本) の混合物を腹腔内 (ip) 注射し実施した<sup>21)</sup>。また処置後、塩酸メドトミジンを拮抗させるためアチパメゾール (0.75 mg / kg, i. p.) (日本全薬工業株式会社) を用いた。

### 2-3. 実験プロトコール

肝 I/R 後 0, 6, 24, 48, 72, 96 および 120 時間でマウスの血液を採取し肝臓を摘出した。肝障害の指標として Dri-Chem 7000 Chemistry Analyzer System (富士フイルム、東京、日本) を用いて血清 ALT 値を測定した。肝臓の切除検体は分割して免疫染色、real-time RT-PCR、フローサイトメトリの解析に用いた。また選択的 EP3 作動薬 (ONO-AE-248) は小野薬品工業株式会社 (大阪、日本) より提供され、モデル作製時に投与した。

### 2-4. 骨髄移植

骨髄移植は、放射線照射 48 時間前に組織マクロファージを枯渇させるために、レシピエントマウスをクロドロネートリポソーム (200 μL/マウス; FormuMax Scientific, Inc., Palo Alto, CA) で処理した。ドナーの骨髄細胞は GFP 陽性 WT (8 週齢) または GFP 陽性 EP3<sup>-/-</sup> (8 週齢) から採取した。マウスにフィルター (銅、0.5 mm、アルミニウム、2 mm) を取り付けけた MBR-1505R X 線照射器 (日立メディコ、東京、日本) を使用して 9.8 Gy で照射した。ドナー骨髄由来単核細胞 (1 × 10<sup>7</sup> 細胞/ 200 μL PBS) を照射マウスの尾静脈より注入し移植マウスを作製した。

### 2-5. 組織免疫染色

切除した肝臓組織の小片を 10% ホルムアルデヒドで固定した。パラフィン包埋組織から切片 (厚



さ 4  $\mu\text{m}$ ) を作製し、H&E 染色または免疫染色を行った。H&E 染色切片は顕微鏡 (Biozero BZ-9000 シリーズ、Keyence、大阪、日本) を使用し撮影した。ImageJ ソフトウェア (United States National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して、組織切片全体に対する壊死領域を測定した。また、増殖細胞核抗原 (PCNA) を検出するために免疫染色を行った (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。免疫複合体は、製造元のプロトコルに従って、Histofine Simple Stain MAX PO (MULTI) (ニチレイ、東京、日本) で検出した。動物 1 匹あたり別々の 6 箇所を高倍率視野 (200 $\times$ ) で撮影し 1 視野あたりの肝細胞数を PCNA 陽性細胞で除算して PCNA index とし算出した。

## 2-6. 蛍光免疫染色

肝臓の組織サンプルを PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) 固定液で室温で 3 時間固定した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で調製した 30% スクロースで凍結保護した後、切片 (厚さ 8  $\mu\text{m}$ ) をクリオスタットで切断し、室温で 1 時間、ブロッッキングしてインキュベートした。次に、切片をラット抗 CD68 モノクローナル抗体 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Puchheim, Germany)、ウサギ抗 CD68 ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)、ウサギ抗 EP3 ポリクローナル抗体 (Bioss Antibodies, Inc., Woburn, MA, USA)、およびアルメニアハムスター抗 CD11c モノクローナル抗体 (Abcam plc, Cambridge, UK) を用いて 4 $^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートした。PBS で洗浄後、切片を下記に記す二次抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートした: Alexa Fluor 488-ロバ抗ウサギ IgG、Alexa Fluor 488-ヤギ抗ウサギ IgG、Alexa Fluor 594-ロバ抗ラット IgG (Thermo Fisher Scientific)、および Alexa Fluor 647-ヤギ抗アルメニアハムスター IgG (Abcam plc)。これら抗体の希釈液は Agilent, CA, USA を用いて行った。画像は蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-9000 シリーズ; Keyence) で撮影した。

## 2-7. リアルタイム RT-PCR

マウス組織から total RNA を抽出し、TRIzol 試薬 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) でホモジナイズした。製造元のプロトコルに従って、ReverTra AcePCR qPCR RT Kit (TOYOBO、大阪、日本) を使用して逆転写により 1  $\mu\text{g}$  の total RNA から一本鎖 cDNA を生成した。SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (Tli RNaseH Plus; タカラバイオ、滋賀、日本) を使用して、定量的 PCR を行った。リアルタイム RT-PCR に使用される遺伝子特異的プライマーは、GenBank のデータに基づいて Primer 3 ソフトウェア (<http://primer3.sourceforge.net/>) を使用して設計した (表 1)。データは GAPDH を内在性コントロール遺伝子として用い、比較 Ct 法にて各サンプルを定量化した。

## 2-8. 肝臓内の血球分離

メデトミジン 0.75mg/kg、ミダゾラム 4.0mg/kg およびブトルファノール 5.0mg/kg の混合物麻酔下に、門脈より肝臓にハンクス平衡塩溶液 10 mL を灌流し肝臓を摘出した。摘出した肝臓を室温の RPMI に入れて剪刀で小片に刻んだのち、0.05% コラゲナーゼ (Type IV; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を含む RPMI で 20 分間 37 $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした。次いで、組織を 70  $\mu\text{m}$  のセルストレーナーに通し、細胞を 4 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間、1290G で遠心分離した。

ペレット化した細胞を PBS に再懸濁して、肝臓の血球を 33%パーコール (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) での密度勾配遠心分離によって肝臓ホモジネートから分離した<sup>22)</sup>。非実質細胞を 33%と 66%のパーコールの間の界面から収集し、4° C で 30 分間 1390g で遠心分離した。生存細胞をトリパンブルーを用いてカウントし、均一な細胞密度で再懸濁した。

## 2-9. フローサイトメトリー

細胞を抗  $\gamma$ RIII/ II モノクローナル抗体 (2.4G2) とともにインキュベートして、一次モノクローナル抗体の非特異的結合をブロックした。次に、以下の蛍光色素結合抗体の組み合わせで細胞を染色した: 抗 Ly6G (1A8)、抗 F4/80 (BM8)、抗 CD317 (927)、抗 CD45 (30-F11)、抗 CD11b (M1/70)、抗 CD11c (N418)、抗 Ly6C (HK1.4)、抗 IA/IE (M5/114.15.2) および抗 CD103 (2E7)、(すべて BioLegend)。氷上で 30 分間暗所に置いたのち、ペレットを PBS で 2 回洗浄した。フローサイトメトリー解析では、最初に細胞を前方散乱 (FSC) および側方散乱 (SSC) でゲートした。続いて死細胞を染色する 7-AAD (BioLegend) 陽性細胞を除外し、さらに CD45 陽性細胞をゲートした。サンプルは FACSVerse™ サイトメーター (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて分析し、データは Kaluza ソフトウェア v2.1 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を使用して解析した。

## 2-10. 細胞培養

骨髓細胞は、8 週齢のマウスの大腿骨と脛骨から分離した。大腿骨および脛骨を PBS で洗い、赤血球を RBC 溶解緩衝液 (BioLegend) で処理し溶解した。BM 細胞を 10%FBS を含む RPMI1640 培地で培養し、その後 6 ウェルまたは 12 ウェルプレートに  $1.0 \times 10^6$  /mL の密度で撒いた。プレートは、空气中 5%CO<sub>2</sub> の環境下にて 37°C でインキュベートした。

DC を生成するために、細胞を 20 ng/mL の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) (BioLegend) の存在下で 8 日間培養した。培地は 2 日ごとに交換し 8 日目に細胞を未処理、または PGE<sub>2</sub> (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) もしくは EP3 アゴニスト (ONO-AE-248) 1 nM, 10 nM, 100 nM を入れて 3 時間処理した。その後 PBS でウェルを洗浄した後、細胞クラスターを適度にピペッティングして、浮遊した非接着細胞を DC として回収した。

骨髓由来マクロファージ (BMMs) を誘導するために、骨髓細胞を 20 ng/mL M-CSF (BioLegend) で 8 日間培養した。8 日目に培養細胞を未処理、または EP3 アゴニスト 10 nM で 3 時間刺激した。一部の実験では、培養 7 日目に BMMs を 50 ng/mL のマウス組換え IL-13 (rIL-13) (BioLegend)<sup>23)</sup> に 24 時間暴露し、BMMs と DC を収集して TRIzol (Life Technologies) でホモジナイズして、リアルタイム RT-PCR により mRNA を測定した。

## 2-11. 共培養

BMMs は 0.4  $\mu$ m 培養インサート (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) によって分離された 6 ウェル培養プレートのマルチウェルプレート内で 7 日間 M-CSF と培養することにより生成した。DCs は別の 6 ウェル培養プレートで 7 日間 GM-CSF とともに培養して生成した。7 日目に DCs を回収して、インサート内 ( $1.0 \times 10^6$  /mL) に播種し、10%FBS と M-CSF を含む RPMI1640 培地でマルチプレート内で培養した BMMs と 24 時間共培養した ( $1.0 \times 10^6$  /mL)。8 日目に BMMs および



DCs の共培養物を未処置もしくは EP3 アゴニスト 10 nM で 3 時間刺激しインキュベートした。一連の別実験では、ラット IgG1 コントロール抗体 5 µg/mL (BioLegend) または抗マウス IL-13 モノクローナル抗体 5 µg/mL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) の存在下で 24 時間共培養した。8 日目に共培養した BMMs および DCs を未処理もしくは EP3 アゴニスト 10 nM で 3 時間刺激しインキュベートした。最後に BMMs を回収し、mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR によって測定した。

### 2-12. 骨髄由来樹状細胞の養子移入

WT または EP3<sup>-/-</sup> の DCs を 8 日間培養し、PBS 200 µl に溶解した  $5.0 \times 10^5$  cells を WT の静脈内 (i. v.) に投与した。DCs の WT への養子移入の 1 時間後、肝 I/R を行い、再灌流後 48 時間に血清と肝臓のサンプルを採取した。いくつかの実験では、GFP 陽性 WT または GFP 陽性 EP3<sup>-/-</sup> の DCs ( $5.0 \times 10^5$  細胞) を経静脈的に WT に投与した。

### 2-13. 統計解析

すべての結果は、平均±標準偏差 (SD) として表し、GraphPad Prism ソフトウェア、バージョン 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用して解析した。対応のない両側スチューデントの t 検定を使用して、2 群間のデータを比較した。多群間でのデータの比較は、一元配置分散分析とそれに続くテューキーの事後検定を使用した。p 値 < 0.05 は、統計学的に有意と見なした。

### 3. 結果

#### 3-1. EP3 受容体欠損マウスの肝修復の遅延

肝修復期での EP3 シグナルの機能的役割を調べるために、肝虚血再灌流障害モデルを用いた<sup>20)</sup>。肝障害の指標として血清 ALT 値を測定すると、WT および EP3<sup>-/-</sup>において再灌流後 6 時間でピークを認め有意差を認めなかったが、EP3<sup>-/-</sup>では、WT と比較し 24-72 時間で有意に高値を示した (図 1A)。また肝壊死面積では EP3<sup>-/-</sup>において 24-120 時間で有意に高値を認めた (図 1B, 1C)。これらの結果は、EP3 シグナルが肝 I/R 後の肝修復を促進させる役割があることを示唆している。EP3<sup>-/-</sup>での肝修復の遅延は、肝再生能の指標をみる PCNA index の低下 (図 2A) および組織修復因子である EGF、HGF、VEGF-A、VEGFR1 の mRNA の発現低下 (図 2B) に関連しており、EP3 シグナルは肝再生増殖因子の発現を増強させることで肝修復を促進させることが考えられた。

#### 3-2. マクロファージの肝組織浸潤

傷害肝に集積するマクロファージを調べるために CD68 陽性細胞数を調べた。免疫蛍光染色の評価では、WT, EP3<sup>-/-</sup>の細胞数は共に I/R 後より増加を認め、再灌流後 48 時間でピークに達したが、再灌流後 24-72 時間で EP3<sup>-/-</sup>の細胞数は WT よりも有意に高い値を示した (図 3A)。また肝組織に集積するマクロファージの亜型を調べるためにフローサイトメトリーで評価したところ、EP3<sup>-/-</sup>における炎症誘導性マクロファージ (CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup>/F4/80<sup>high</sup>) の割合は WT よりも高く、組織修復性マクロファージ (CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>/F4/80<sup>high</sup>) の割合は、WT よりも低かった (図 3B)。これらの結果により EP3 シグナルは組織修復性マクロファージである Ly6C<sup>low</sup> マクロファージを誘導して肝組織修復を促進させる可能性が示唆された。

#### 3-3. 単球由来樹状細胞は肝虚血再灌流後の肝臓に集積する

マクロファージに加えて、DC は急性組織障害後の修復に関与していることが報告されている<sup>13), 14)</sup>。そこで肝 I/R 後の DC の変化を調べたところ、再灌流後 24-72 時間で CD11c の発現量は、EP3<sup>-/-</sup>よりも WT で高値を示した (図 4A)。また EP3 を発現する CD11c 陽性細胞は傷害境界域に集積を認め、再灌流後 48-96 時間で有意な細胞数の増加を示した (図 4B, 4C)。次に、DC には 4 つのサブタイプ (通常型 DC1 (cDC1)、通常型 DC2 (cDC2)、形質細胞様 DC (pDC)、単球由来 DC (moDC)) があることが知られている<sup>7), 8)</sup>。I/R 後の肝修復に関与する DC のサブタイプを同定するためにフローサイトメトリーで解析を行った。cDC1 (MHC-II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>low</sup>/CD103<sup>high</sup>/Ly6C<sup>low</sup>)、cDC2 (MHC-II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/CD103<sup>low</sup>/Ly6C<sup>low</sup>)、pDC (MHC-II<sup>low</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>low</sup>) として定義した DC は WT, EP3<sup>-/-</sup>で有意差はなく、再灌流後の肝組織内への有意な集積は認めなかった。一方で、WT における moDC (MHC-II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup> として定義) の数は、EP3<sup>-/-</sup>と比較し、肝修復期に有意な増加を認めた (図 5)。この結果から肝修復に関与する DC の大部分は moDC であることが考えられ、EP3 シグナル伝達に依存して moDC が動員される可能性が示唆された。

#### 3-4. moDCs の養子移入は肝虚血再灌流後の肝修復を促進する

moDC が I/R 後の肝修復を促進させるかどうかを確認するために養子移入実験を行った。

まず *in vitro* で骨髓細胞から GM-CSF 下に分化培養した DC の表現型をフローサイトメトリーで調べ、培養細胞の 74% が MHC-II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup> の表現型を呈した。

次に、培養した moDCs が傷害肝に動員されるかどうかを調べるために、GFP 陽性野生型 moDCs と GFP 陽性 EP3 受容体欠損 moDCs を WT に静脈投与した。投与された野生型および EP3 受容体欠損 moDCs は再灌流後 48 時間で傷害境界部に蓄積したが、EP3 受容体欠損 moDCs の傷害境界領域への蓄積は野生型と比較して有意に少なく、moDC は EP3 依存性に傷害肝に動員される可能性が示唆された (図 6)。これらの結果に基づいて、WT への moDCs の養子移入が実際に肝修復に影響を与えるかどうかを調べた。興味深いことに、野生型 moDCs 投与群は EP3 受容体欠損 moDCs 投与群と比較して肝障害レベル (ALT 値、肝壊死面積) の減弱および肝再生能 (PCNA index) の増大を認め (図 7)、moDC の EP3 シグナル伝達が肝修復の調節に重要な役割を果たす可能性が考えられた。

次に、moDC の動員がマクロファージの表現型に影響を与えるかどうかを調べるため、I/R 後 48 時間の肝組織におけるマクロファージの表現型を調べた。フローサイトメトリーでの解析結果、野生型 moDC 投与群は EP3 受容体欠損 moDC 投与群と比較して Ly6C<sup>high</sup> マクロファージの減少および Ly6C<sup>low</sup> マクロファージの増加を認めた (図 8)。これらの結果から EP3 シグナルによる moDC の動員がマクロファージの表現型を炎症誘導性マクロファージから組織修復性マクロファージにシフトさせる可能性が示唆された。

### 3-5. moDC とマクロファージ間のクロストーク

moDC とマクロファージのクロストークがマクロファージの極性転換に関与するかどうかを検討した。

まず、EP3 アゴニストがマクロファージの形質転換を誘導するかどうかを調べた。EP3 アゴニストにて WT の BMMs を刺激したところ、MR, Fizz1, IL-10 の mRNA の発現量に変化は認めなかった。また EP3<sup>-/-</sup> の BMMs も同様、EP3 アゴニストによる刺激を受けても、これらの遺伝子発現に変化は見られなかった (図 9A)。これらの結果は、EP3 シグナルは BMMs の表現型を組織修復性マクロファージに分化誘導しないことを示している。

次に EP3 アゴニストの存在下および非存在下で moDCs と BMMs の共培養実験を行った。共培養下において EP3 を刺激した BMMs の mRNA 発現を調べたところ、組織修復性マクロファージ関連遺伝子 (MR, Fizz1, IL-10) の発現量の増加を認めたが、EP3 受容体欠損 moDC との共培養においては、その発現量に変化を認めなかった (図 9B)。つまり、これらの結果から、EP3 シグナル伝達を介して moDC に由来する因子が組織修復性マクロファージに向かってマクロファージの分極を誘導する可能性が示唆された。

マクロファージの形質転換に重要なサイトカインとして IL-4, IL-13 が知られており<sup>24), 25)</sup>、moDCs に由来するこれらサイトカインがマクロファージの形質転換に関与しているかどうかを調べた。最初に、野生型 moDCs は EP3 アゴニストの刺激によって EP3 の発現量の増加を認めたが、EP3 受容体欠損 moDC では増加は見られなかった。マクロファージの分化誘導に寄与するサイトカインの中で IL-13 が野生型 moDCs において EP3 濃度依存性に発現量を高くすることが確認された (図 10)。EP3 アゴニストは、EP3 受容体欠損 moDCs および WT、EP3<sup>-/-</sup> の BMMs において IL-13 の発現に

影響を与えなかった。また IL-4 の発現はいずれもその発現に変化を示さなかった (図 10)。

次に、moDC によって分泌される IL-13 が実際にマクロファージの表現型を変化させるかどうかを調べた。

まず、rIL-13 で BMMs を刺激したところ、WT と EP3<sup>-/-</sup>ともに組織修復性マクロファージ関連遺伝子 (MR、Fizz1、IL-10) の発現量の増加を認め、IL-13 がマクロファージの形質転換を誘導するサイトカインである可能性を強く示唆する結果となった (図 11A)。

次に、moDC によって分泌される IL-13 がマクロファージの分化に影響を与えるかどうかを検討した。moDCs と BMMs の共培養下で EP3 アゴニストおよび抗 IL-13 中和抗体を加えると、組織修復性マクロファージ関連遺伝子 (MR、Fizz1、IL-10) の発現量が有意に抑制された (図 11B)。これらの結果により EP3 シグナル伝達が moDC によって分泌された IL-13 を介して炎症誘導性マクロファージから組織修復性マクロファージへ極性を変化させる可能性が示唆される。



#### 4. 考察

自然免疫細胞であるマクロファージと DC は肝損傷後の炎症の収束と組織の修復に重要な役割を果たしている<sup>5), 14), 26)</sup>。これらの細胞には複数のサブタイプが存在し、肝 I/R において組織に対して攻撃的な作用と保護的な作用の両者の側面を有することが報告されている。しかしながら、これらの細胞における肝組織修復の正確なメカニズムについては未だ解明されていない。本研究では、moDC の機能を調べることにより、肝 I/R 後の肝組織修復における DC の役割を明らかにした。今回の研究で、我々は EP3 受容体を発現する moDC は、肝 I/R 後の組織修復に対する肝臓の微小環境を制御していることを実証した。一方で、EP3 受容体の欠乏は、炎症誘導性である Ly6C<sup>high</sup> マクロファージの細胞数を増加させることで、肝修復を遅延させることがわかった。さらに EP3 シグナル環境下で BMMs は moDCs との共培養により組織修復性マクロファージに関連する遺伝子の発現量の増強を示し、また BMMs への IL-13 の刺激によりその遺伝子の発現の増強を認めた。これらの結果は肝 I/R 後のストレス環境下において EP3 依存性にマクロファージと DC がクロストークすることで肝組織修復に重要な役割を果たしている可能性があることを示している。

DC は免疫システムの中心を担う造血細胞であり、局所環境の変化を感知して病原体の危険信号を認識し、自然免疫系と適応免疫系の橋渡しとして機能する<sup>27)</sup>。これまでの報告では、心臓において CD11c 陽性 DC が梗塞巣に浸潤して修復期の炎症を改善させ、また DC を除去することで Ly6C<sup>high</sup> マクロファージの持続的な蓄積、炎症誘発性サイトカインの持続的な発現および心機能の低下をもたらすことが報告されている<sup>13)</sup>。さらに心筋梗塞マウスの心臓溶解物と TNF $\alpha$  をマクロファージに曝して生成された寛容原性 DC の養子移入は、制御性 T 細胞を活性化して、マクロファージのサブセットのシフトが誘導され、損傷した心臓組織を修復することが報告されている<sup>28)</sup>。CD11c 陽性 DC には複数の DC サブセットが含まれており、我々は DC の骨髄の分化系統によって大きく 2 つのカテゴリーに分類して解析を行うことにした。1 つは Macrophage-DC progenitor (MDP) から Flt3 によって誘導される cDCs および pDCs であり、もう一つは MDP から M-CSF により分化誘導される moDCs である<sup>7), 8)</sup>。肝 I/R の傷害段階では、cDC は防御的な役割を果たす一方で、pDC は攻撃的な役割を果たすと考えられている。今回の研究で、我々はこれらサブタイプに分類して肝修復期に集積する DC を特定し、MHC-II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup> と定義した moDC が肝組織修復に重要な役割を果たしていることを示した<sup>29)</sup>。

さらに、この moDCs は、肝 I/R 後において EP3 シグナル依存性に肝臓の傷害境界域に移動し、EP3 を発現する moDCs を養子移入することで、肝修復を加速させる役割があることを示した。実際に PGE<sub>2</sub> はヒト moDC の遊走能を向上させるという報告がある<sup>30)</sup>。ただし、この遊走は EP4 シグナルによって仲介されるものであるが、DC 遊走に関与する PGE 受容体サブタイプの違いは病理学的状況や環境変化の相違による可能性があるものと考ええる。今回の実験で、肝 I/R 後に動員される moDC は、その大多数が傷害境界域に集積し、傷害内部への浸潤はほとんど認められなかった。一方で、動員されたマクロファージは傷害境界域だけでなく損傷を受けた病変内にもその分布がみられた。これら細胞の局在は、肝内の傷害部での moDC とマクロファージのクロストークがマクロファージの浸潤および極性転換の調整に関与して、肝 I/R 後の肝組織修復を促進するという考えを支持する結果であると考えている。



さらに、我々はマクロファージの極性転換に重要なサイトカインとして知られている IL-13、IL-4 に着目して検証を行った。細胞培養の実験で、moDC における IL-13 の発現はマクロファージの約 100 倍高い発現量を認め、さらに EP3 濃度依存性にその発現量が増加することがわかった。また IL-13 の投与により組織修復性マクロファージへの移行が促進されたことおよび IL-13 経路を遮断することでこの移行が抑制されたことは、moDC によって分泌される IL-13 がマクロファージの分化に重要な役割を果たしていることが考えられる。これは、肝 I/R 後の環境下において IL-13 を介した moDC とマクロファージのクロストークが抗炎症性に作用することが示唆されるが<sup>31)</sup>、IL-13 はアメーバ誘発性の肝障害において肝修復を促進する働きがあり<sup>32)</sup>、制御性 T 細胞由来の IL-13 はマクロファージを刺激して IL-10 を産生し、アポトーシス細胞の貪食を促すことにより炎症の抑制を引き起こすことが報告されている<sup>23)</sup>。今回、我々の検証では、in vitro で moDC 由来の IL-13 がマクロファージの IL-10 の発現量を増加させる結果を得ており、IL-13 がマクロファージを刺激して IL-10 を産生し、それが肝修復を促進させた可能性も考えられるが、これを証明するにはさらなる検証が必要である。

IL-13 は IL-4 と相乗的に作用し代替経路を活性化する多面的なサイトカインであり、単球/マクロファージを介して炎症の鎮静をもたらすことが言われている。最近の報告では、マウスの局所熱性肝障害後の肝修復期には、マクロファージの表現型の変化は、肝障害部位の IL-4 に依存していることやナチュラルキラー T 細胞 (iNKT) に由来する IL-4 がマクロファージの表現型のスイッチに関与しており、マウスの局所熱性肝障害後の治癒を促進することを報告している<sup>33), 34)</sup>。しかし今回の実験でマクロファージの極性転換に moDC が分泌する IL-4 の関与を示せなかったことは、肝障害モデルの違いにあった可能性が考えられる。

これまでに我々は、肝虚血再灌流によって mPGES-1 より合成された PGE<sub>2</sub> が有意な増加を示すことを報告したが<sup>16)</sup>、肝 I/R における PGE<sub>2</sub> の役割ははっきり解明されていない<sup>35)</sup>。さらに今回の研究では、PGE<sub>2</sub>/EP3 シグナル伝達経路がマクロファージへの表現型を変化させ、肝修復を促進させることを示したが、EP3 シグナルが肝 I/R の始まりに重要な役割を果たしているかどうかは不明である。また DC がヒトの肝疾患においてマウスの肝虚血再灌流障害モデルと同様にマクロファージの表現型の変化を介して肝組織の修復に関与しているかどうかもまた不明であり、今後、ヒトにおける DC とマクロファージの相互作用に関するトランスレーショナルリサーチが必要であると考えられる。

結論として、我々は、肝 I/R によって合成される PGE<sub>2</sub> は EP3 シグナル伝達によって moDC を傷害領域と非傷害領域の境界に動員させることを示した。また、このシグナル伝達は moDC から分泌される IL-13 を介して炎症誘導性から組織修復性マクロファージに表現型の切り替えを誘導することがわかった。これらの結果は、moDC とマクロファージとの相互作用が肝臓の炎症の程度と期間を決定し、肝 I/R 後の肝組織のリモデリングを促進する可能性があることを示唆している。したがって、肝 I/R における EP3 受容体作動薬は、DC を標的とする肝修復・肝再生の新たな治療戦略になり得る可能性が考えられる。

## 5. 総括

急性肝障害による肝組織修復・再生の制御機構の解明は、再生医学の研究領域として注目されている。本研究では、免疫システムにおいて重要な役割を担う樹状細胞および脂質メディエーターである PGE2 に着目して炎症の収束および組織リモデリングの観点から新たな機能的役割を探った。我々はこれまでに同定した肝修復促進作用のある EP3 受容体シグナルがマクロファージの表現型を変化させることで傷害された肝実質細胞の修復・再生だけでなく、その修復に関与する樹状細胞のサブタイプを同定して、これまで解明されてこなかったマクロファージとの相互作用に焦点を当てた研究を行った。肝虚血再灌流後の肝修復に関与する単球由来樹状細胞および EP3 受容体シグナルの役割が解明されることにより、今後これらを標的とした肝修復・肝再生治療の開発につながる事が推定される。

## 6. 引用文献

- 1) Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*. 2007;356:1545-1559.
- 2) Kubes P, Mehal WZ. Sterile inflammation in the liver. *Gastroenterology*. 2012;143:1158-1172.
- 3) Lentsch AB. Regulatory mechanisms of injury and repair after hepatic ischemia/reperfusion. *Scientifica (Cairo)*. 2012;2012:513192.
- 4) Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:306-321.
- 5) Brempele KJ, Crispe IN. Infiltrating monocytes in liver injury and repair. *Clinical & Translational Immunology*. 2016;5:e113.
- 6) Connolly MK, Bedrosian AS, Mallen-St. Clair J, et al. In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation via TNF- $\alpha$ . *J Clin Invest*. 2009;119:3213-3225.
- 7) Mildner A, Yona S, Jung S. A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Adv Immunol*. 2013;120:69-103.
- 8) Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:392-404.
- 9) Bamboat ZM, Ocui LM, Balachandran VP, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Conventional DCs reduce liver ischemia/reperfusion injury in mice via IL-10 secretion. *J Clin Invest*. 2010;120:559-569.
- 10) Zhang M, Ueki S, Kimura S, et al. Roles of dendritic cells in murine hepatic warm and liver transplantation-induced cold ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*. 2013;57:1585-1596.
- 11) Castellaneta A, Yoshida O, Kimura S, et al. Plasmacytoid dendritic cell-derived IFN- $\alpha$  promotes murine liver ischemia/reperfusion injury by induction of hepatocyte IRF-1. *Hepatology*. 2014;60:267-277.
- 12) Nakao T, Ono Y, Dai H, et al. DNAX activating protein of 12kDa/triggering receptor expressed on myeloid cells 2 expression by mouse and human liver dendritic cells: functional implications and regulation of liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 2019;70:696-710.
- 13) Anzai A, Anzai T, Nagai S, et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*. 2012;125:1234-1245.
- 14) Jiao J, Sastre D, Fiel MI, et al. Dendritic cell regulation of carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis regression. *Hepatology*. 2012;55:244-255.
- 15) Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem*. 2007;282:11613-11617.
- 16) Nishizawa N, Ito Y, Eshima K, et al. Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates liver repair after hepatic injury in mice. *J Hepatol*. 2018;69:110-120.
- 17) Kamoshita E, Ikeda Y, Fujita M, et al. Recruitment of a prostaglandin E receptor subtype, EP3-expressing bone marrow cells is crucial in wound-induced angiogenesis. *Am J Pathol*. 2006;169:1458-1472.
- 18) Hosono K, Suzuki T, Tamaki H, et al. Roles of prostaglandin E2-EP3/EP4 receptor signaling in the



- enhancement of lymphangiogenesis during fibroblast growth factor-2-induced granulation formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1049-1058.
- 19) Tang J, Shen Y, Chen G, et al. Activation of E-prostanoid 3 receptor in macrophages facilitates cardiac healing after myocardial infarction. *Nat Commun.* 2017;8:14656.
  - 20) Ohkubo H, Ito Y, Minamino T, et al. VEGFR1-positive macrophages facilitate liver repair and sinusoidal reconstruction after hepatic ischemia/reperfusion injury. *PLoS ONE.* 2014;9:e105533.
  - 21) Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim.* 2011;60:481-487.
  - 22) Kojo K, Ito Y, Eshima K, et al. BLT1 signalling protects the liver against acetaminophen hepatotoxicity by preventing excessive accumulation of hepatic neutrophils. *Sci Rep.* 2016;6:29650.
  - 23) Proto JD, Doran AC, Gusarova G, et al. Regulatory T cells promote macrophage efferocytosis during inflammation resolution. *Immunity.* 2018;49:666-677.
  - 24) Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958-969.
  - 25) Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:23-35.
  - 26) Heier EC, Meier A, Julich-Haertel H, et al. Murine CD103(+) dendritic cells protect against steatosis progression towards steatohepatitis. *J Hepatol.* 2017;66:1241-1250.
  - 27) Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol.* 2013;14:996-1006.
  - 28) Choo EH, Lee JH, Park EH, et al. Infarcted myocardium-primed dendritic cells improve remodeling and cardiac function after myocardial infarction by modulating the regulatory T cell and macrophage polarization. *Circulation.* 2017;135:1444-1457.
  - 29) Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity.* 2007;26:519-531.
  - 30) Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002;100:1354-1361.
  - 31) Kato A, Okaya T, Lentsch AB. Endogenous IL-13 protects hepatocytes and vascular endothelial cells during ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2003;37:304-312.
  - 32) Noll J, Helk E, Fehling H, et al. IL-23 prevents IL-13-dependent tissue repair associated with Ly6C(lo) monocytes in Entamoeba histolytica-induced liver damage. *J Hepatol.* 2016;64:1147-1157.
  - 33) Dal-Secco D, Wang J, Zeng Z, et al. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *J Exp Med.* 2015;212:447-456.
  - 34) Liew PX, Lee WY, Kubes P. iNKT cells orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile liver injury. *Immunity.* 2017;47:752-765.
  - 35) Motino O, Frances DE, Casanova N, et al. Protective role of hepatocyte cyclooxygenase-2 expression against liver ischemiareperfusion injury in mice. *Hepatology.* 2019;70:650-665.

## 7. 図表

表 1 RT-PCR のプライマー配列一覧

Gene	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
EGF	ATGGGAAACAATGTCACGAAC	CATCTCTCCCAAGCACTGAAC
HGF	GGCTGAAAAGATTGGATCAGG	CCAGGAACAATGACACCAAGA
VEGFA	ACGACAGAAGGAGAGCAGAAG	ATGTCCACCAGGGTCTCAATC
VEGFR1	GATGAAGTTCCCCTGGATGAG	TTGAACGACTTTCCCAAAGC
EP3	GCTCGTGTGCGCGCAGCTACCG	TGTGACAGGTACACGAGGATG
IL-10	CGGAAATGATCCAGTTTTACC	TGAGGGTCTTCAGTTCTCAC
MR	TTTGTCCATTGCACTTTGAGG	TGCCAGGTTAAAGCAGACTTG
Fizz1	TGCCAATCCAGCTAACTATCC	CACACCCAGTAGCAGTCATCC
IL-4	GAACGAGGTCACAGGAGAAGG	CTTGGAAGCCCTACAGACGAG
IL-13	CAGCATGGTATGGAGTGTGG	TGGGCTACTTCGATTTTGGT
CD11c	TTCTTCTGCTGTTGGGGTTTG	CAACCACCACCCAGGAAGTAT
GAPDH	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGC	AAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG



図 1

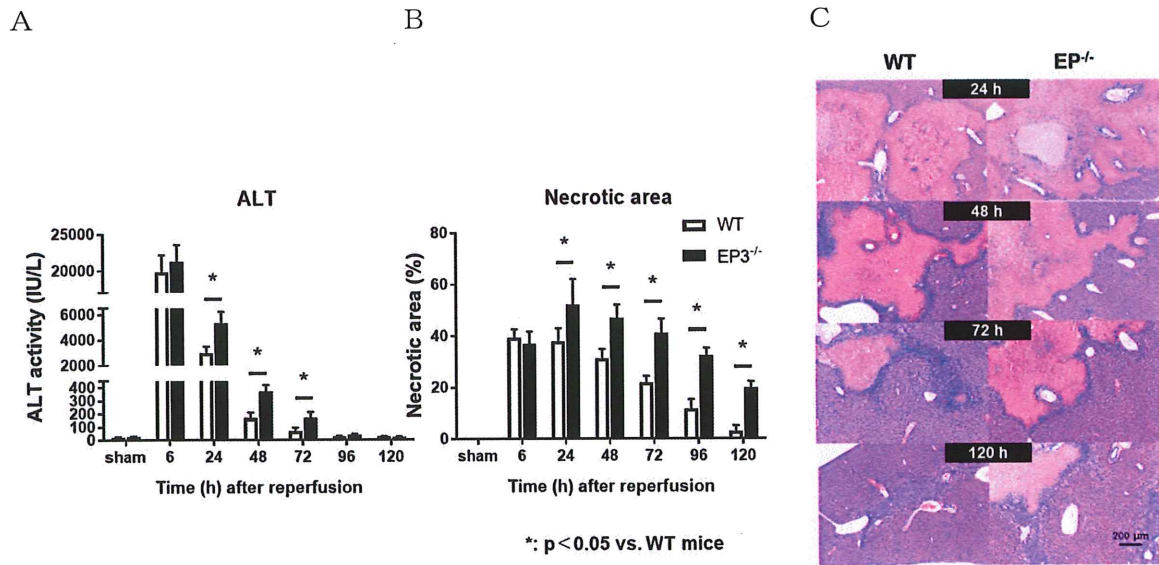


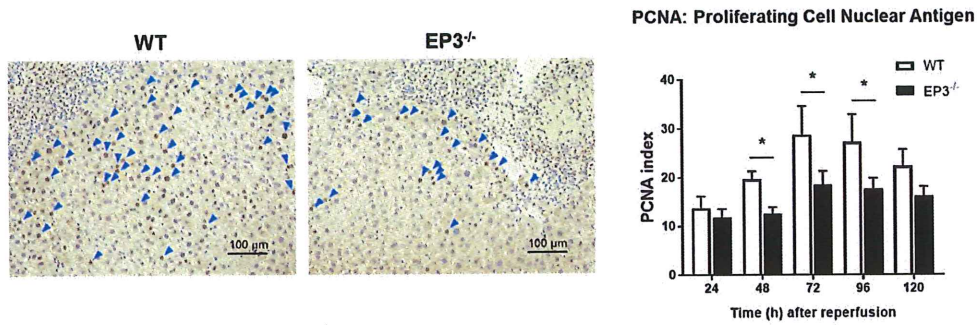
図 1 肝虚血再灌流後の肝障害レベルの経時的変化

A. B. 肝虚血再灌流後の野生型および EP3 受容体欠損マウスの ALT 値、壊死面積を示す。野生型マウスは血清 ALT 値および壊死面積ともに再灌流後 6 時間でピークとなり、以後、漸減した。また EP3 受容体欠損マウスにおける ALT 値、壊死面積はそれぞれ再灌流後 24-72 時間、24-120 時間で野生型と比較して有意に高値を認めた。

C. 肝虚血再灌流後 24, 48, 72, 120 時間の代表的な HE 染色を示す。

図 2

A



B

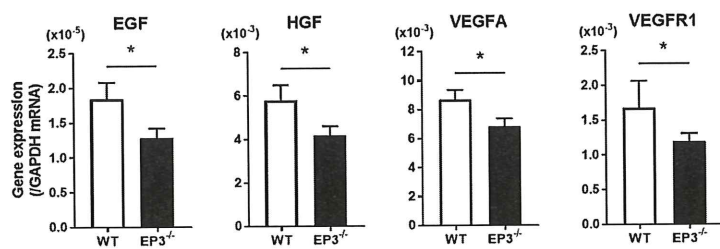


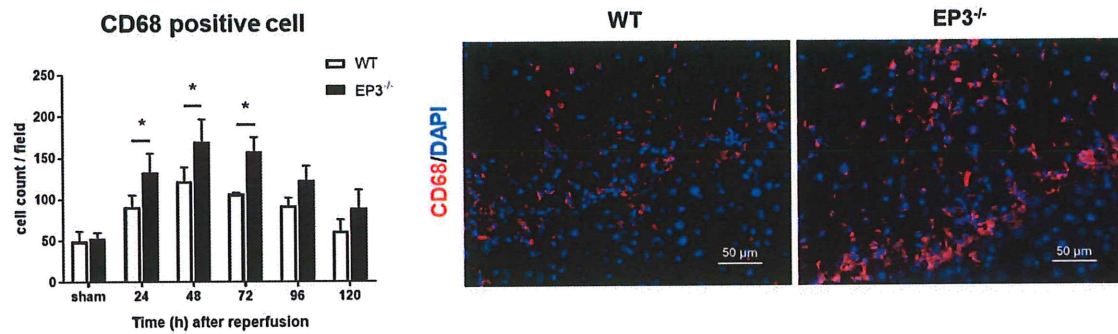
図 2 肝虚血再灌流後の肝再生能の評価

A. 肝虚血再灌流後 72 時間における野生型と EP3 受容体欠損マウスにおける代表的な PCNA 染色と PCNA index の経時的な変化を示す。EP3 受容体欠損マウスでは野生型と比較して再灌流後 48-96 時間で PCNA index の低値を認めた。青矢印は PCNA 陽性細胞を示す。

B. 再灌流後 48 時間の野生型と EP3 受容体欠損マウスにおける EGF, HGF, VEGFA, VEGFR1 の mRNA 発現量は EP3 受容体欠損マウスで野生型と比較して有意に高値を認めた。

図 3

A



B

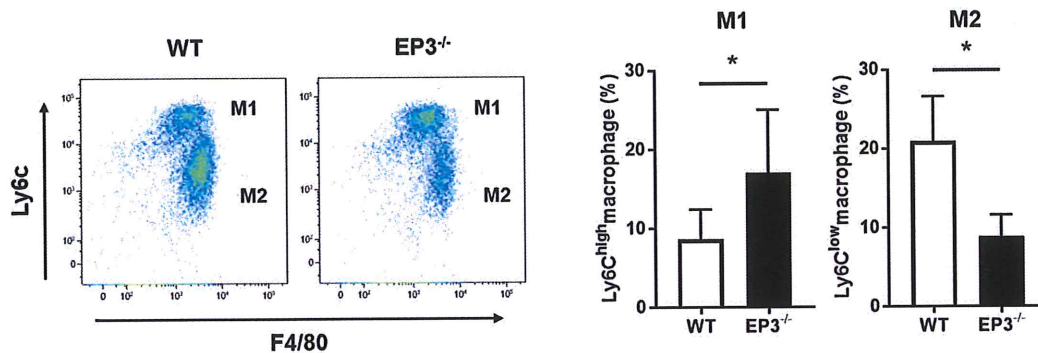


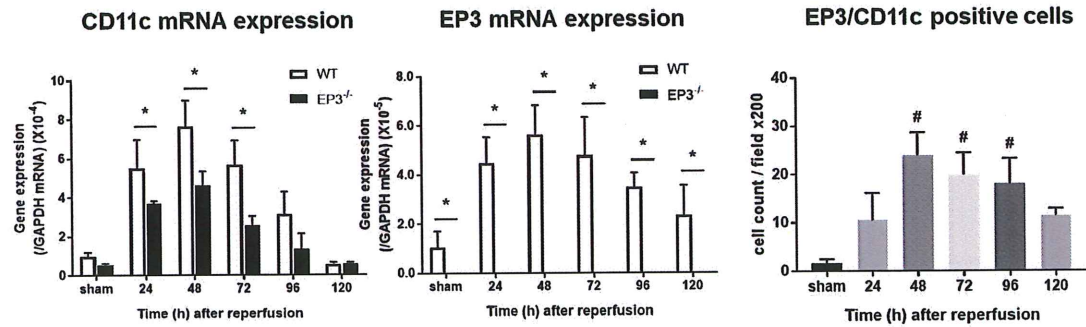
図 3 肝傷害部へのマクロファージの集積とその表現型

A. 肝虚血再灌流後の傷害肝に浸潤する CD68 (赤) 陽性細胞数の経時的変化と再灌流後 48 時間の代表的な蛍光免疫染色を示す。再灌流後 24-72 時間において EP3 受容体欠損マウスは野生型と比較して多くの CD68 陽性細胞を認めた。

B. FACS 解析では、肝虚血再灌流後 48 時間における EP3 受容体欠損マウスは、野生型と比較し傷害肝に集積する Ly6C<sup>high</sup> マクロファージの割合が有意に高く、Ly6C<sup>low</sup> マクロファージは低い値を示した。

図 4

A



B

C

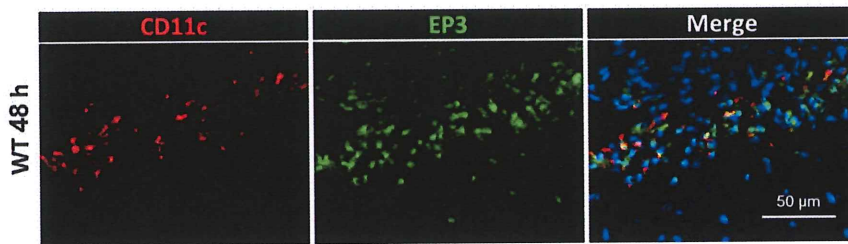


図 4 肝傷害部に集積する EP3 発現 DCs の細胞数の変化

A. 肝虚血再灌流後の肝組織における CD11c および EP3 の mRNA 発現量の経時的変化を示す。

B. C. 虚血再灌流後に傷害肝に集積する CD11c (赤) /EP3 (緑) の陽性細胞数の変化と再灌流後 48 時間の代表的な蛍光免疫染色を示す。EP3 を発現する CD11c 陽性細胞は再灌流後 48 時間でピークとなり、以降、細胞数の漸減を認めた。

図 5

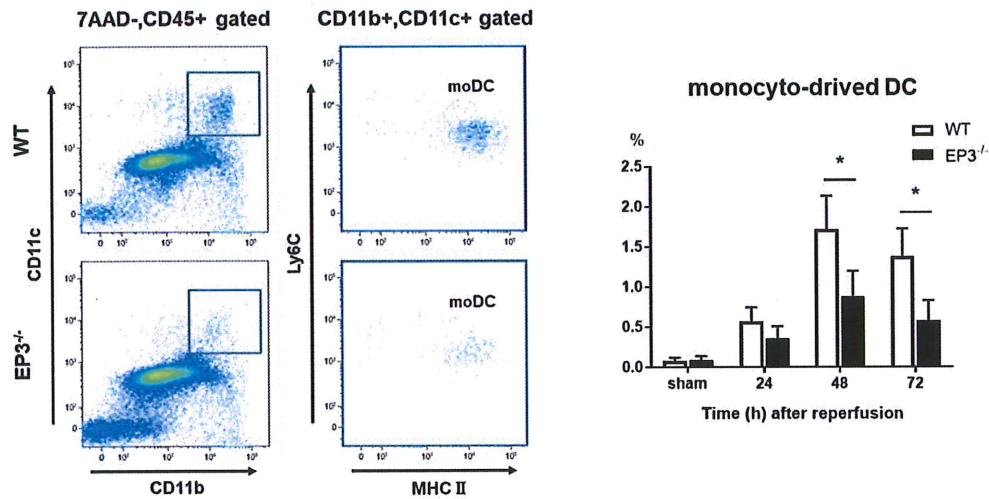


図 5 肝虚血再灌流後に集積する moDC の FACS 解析

再灌流後 48 時間における野生型と EP3 受容体欠損マウスの代表的な FACS 解析を示す。moDCs は MHC II<sup>high</sup>/CD11c<sup>high</sup>/CD11b<sup>high</sup>/Ly6C<sup>high</sup> 細胞と定義した。集積する moDCs の細胞数は野生型、EP3 受容体欠損マウスともに再灌流後 48 時間でピークとなり、再灌流後 48-72 時間において EP3 受容体欠損マウスは野生型と比較して有意な低下を認めた。



図 6

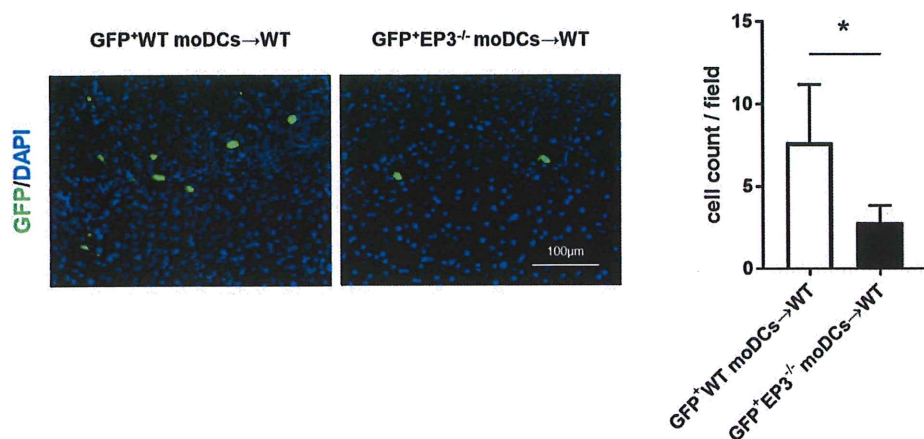


図 6 培養した GFP<sup>+</sup> 野生型および EP3 受容体欠損 moDCs の養子細胞移入

肝虚血再灌流後 48 時間において GFP<sup>+</sup> 野生型および EP3 受容体欠損 moDCs を野生型マウスへ静脈投与したところ、moDCs は傷害部と非傷害部の境界域に集積を認めた。また GFP<sup>+</sup> EP3 受容体欠損 moDCs は GFP<sup>+</sup> 野生型 moDCs と比較して傷害境界域へ集積する細胞数が有意に減少した。

図 7

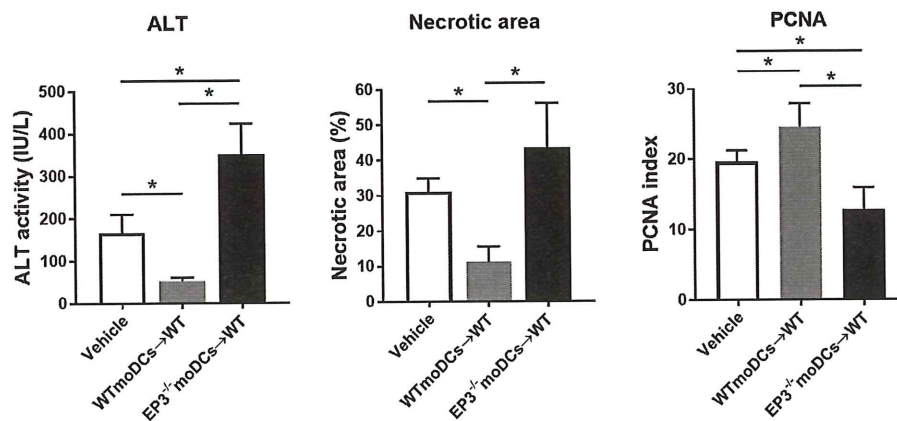


図 7 野生型および EP3 受容体欠損 moDCs の野生型マウスへの養子細胞移入による肝障害の評価  
肝虚血再灌流後 48 時間での ALT 値および壊死面積は EP3 受容体欠損 moDCs 投与群が野生型 moDCs 投与群と比較して有意に増悪し、PCNA index は有意に低下した。

図 8

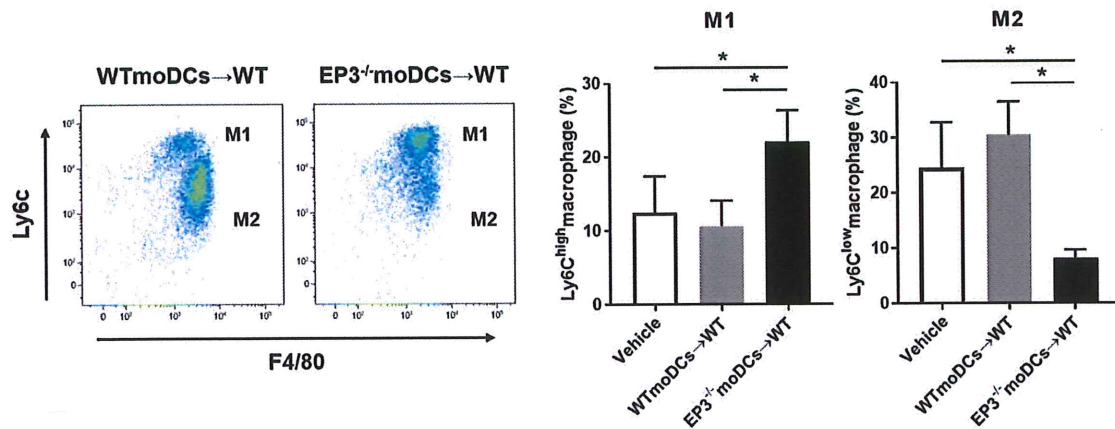
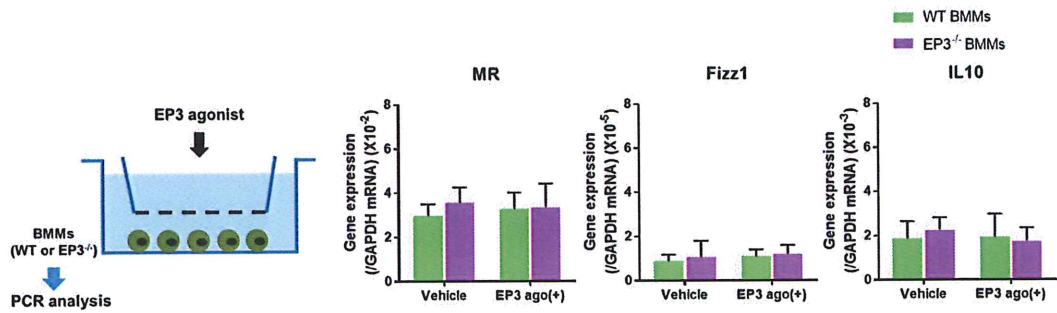


図 8 moDCs の養子細胞移入によるマクロファージの FACS 解析

野生型および EP3 欠損 moDCs を野生型マウスに養子細胞移入し、虚血再灌流後 48 時間に集積する Ly6C<sup>high</sup> および Ly6C<sup>low</sup> マクロファージを FACS 解析した。EP3 受容体欠損 moDCs 投与群は野生型 moDCs 投与群と比較して、傷害肝に集積する Ly6C<sup>high</sup> マクロファージの割合は有意に高く、Ly6C<sup>low</sup> マクロファージの割合は有意に低い値を示した。

図 9

A



B

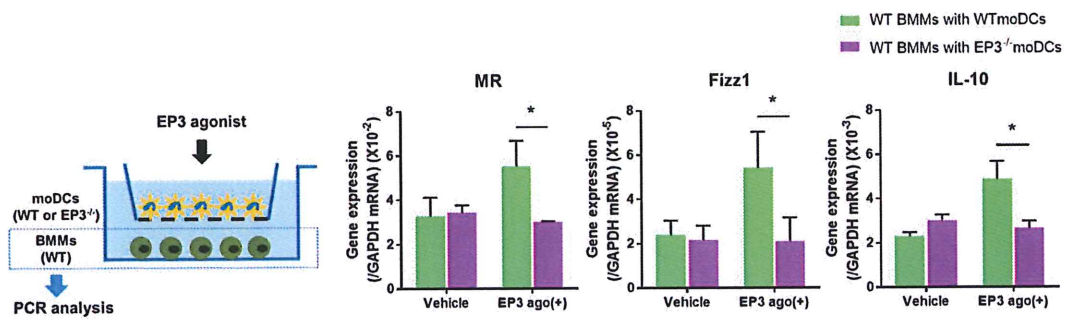


図 9 EP3 アゴニストおよび moDCs の共培養下での BMMs の発現

A. EP3 刺激下での野生型と EP3 受容体欠損 BMMs の MR, Fizz1, IL-10 の発現量の変化を示す。

B. EP3 刺激下での野生型、EP3 受容体欠損 moDCs 共培養による野生型 BMMs の MR, Fizz1, IL-10 の発現量を示す。EP3 刺激下での野生型 moDCs と野生型 BMMs による共培養において MR, Fizz1, IL-10 の発現量は EP3 受容体欠損 moDCs との共培養による発現量と比較して有意に高値を示した。



図 10

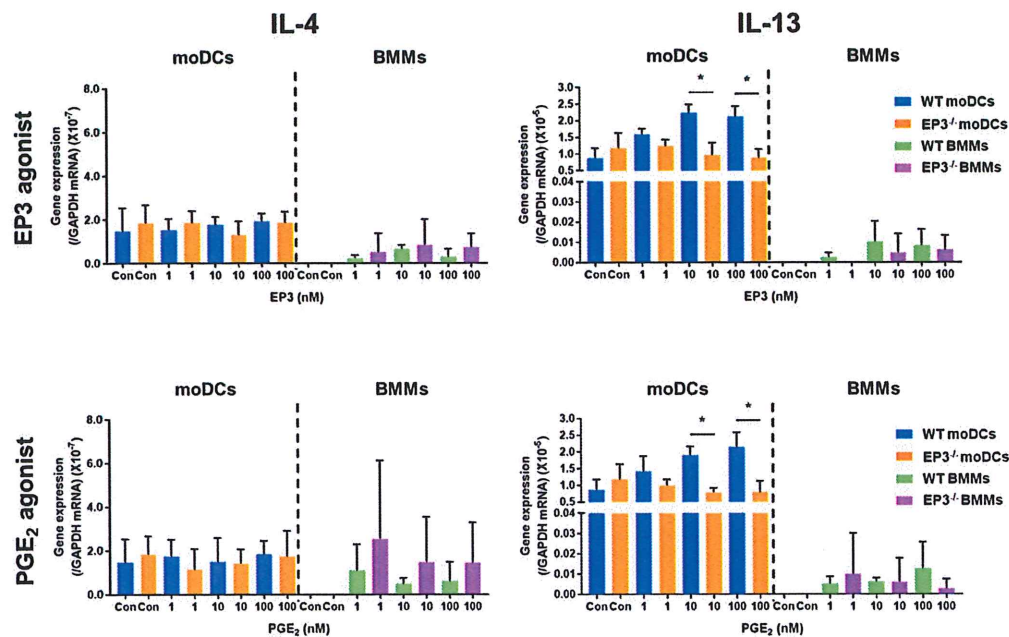
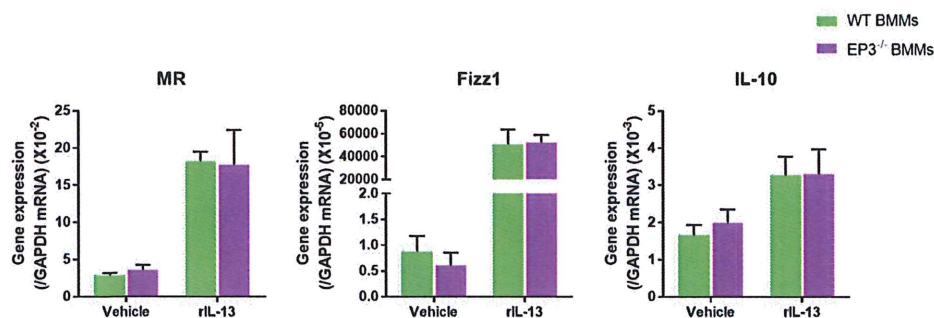


図 10 EP3, PGE<sub>2</sub> アゴニストによる IL-4, IL-13 発現量

EP3, PGE<sub>2</sub> アゴニスト 1 nM, 10 nM, 100 nM で刺激した moDCs および BMMs の IL-4, IL-13 の mRNA 発現量を示す。EP3, PGE<sub>2</sub> アゴニスト 10 nM, 100 nM で刺激した野生型 moDCs は EP3 受容体欠損 moDCs と比較して有意に IL-13 発現量の増加を示した。

図 1 1

A



B

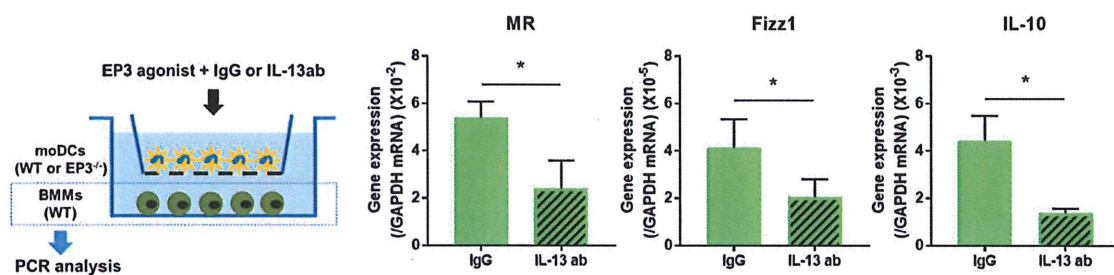


図 1 1 rIL-13 による BMMs の MR, Fizz1, IL-10 発現の変化

A. rIL-13 投与下での野生型と EP3 受容体欠損 BMMs における MR, Fizz1, IL-10 の発現量を示す。rIL-13 の投与により野生型と EP3 受容体欠損 BMMs の MR, Fizz1, IL-10 発現量は有意に増加した。

B. EP3 刺激下にて IgG もしくは IL-13ab を加えて moDCs と共培養したときの野生型 BMMs の MR, Fizz1, IL-10 の発現量を示す。IL-13ab を投与することで、野生型 BMMs の MR, Fizz1, IL-10 の発現量は有意に抑制された。