

## 論文の要約

氏名：三浦 徳

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題目：細胞線溶とマクロファージに着目した肝再生機構に関する研究

### I. 緒言

肝臓は代謝の中核臓器であり、三大栄養素の代謝、生体外異物の解毒など、生体の恒常性の維持において極めて重要な機能を担っている。また、肝臓は毒物、ウイルス感染、外科的切除によりその大部分を損失しても強力な再生能力を発揮する唯一の臓器である。肝臓の再生は、サイトカインや増殖因子といった液性因子による細胞増殖の活性化、細胞外マトリクスの再構築など、肝細胞とそれを取り巻く非実質細胞との複雑な相互作用によって達成されるが、その詳細な分子機構は明らかでない。本研究では、細胞周囲の微小環境の再構築に関わる細胞線溶とマクロファージの機能に着目し、肝再生の制御メカニズムを明らかにしようと試みた。

### II. 細胞線溶に着目した肝再生機構の解明

線溶系は血管中に形成された止血栓を分解除去し血液循環を維持する機能を担う酵素系である。また、線溶酵素 plasmin や、その zymogen である plasminogen (Plg) の活性化酵素 plasminogen activator (PA) は、細胞膜に結合することで、細胞周囲のタンパク質分解系を局所的に制御している。このメカニズムは細胞線溶と呼称され、細胞増殖や組織リモデリングへの関与が示唆されている。これまでに、Plg や PA の欠損マウスでは肝再生が遅延することが報告されている。これらの研究では、全身で Plg や PA が欠損したモデル動物を用いており、細胞周囲に限局した線溶系因子の機能を評価しているとはいえない。そこで本研究では、Plg の肝細胞膜上への結合を強力に阻害する競合阻害剤トラネキサム酸 (TXA) を用いた薬理的な線溶阻害モデルを確立し、70%部分肝切除後の肝再生における細胞線溶の機能やその分子機構について検討した。

細胞線溶の薬理的阻害モデルを作製するため、Wistar ラット（オス、6-7 週齢）の背部皮下に浸透圧ポンプ (TXA が 150 µg/hr の流量で経時的に分泌される) を無菌的に移植し、さらに TXA 水溶液 (20 mg/mL) を飲水により与えた (TXA 群)。対照群には PBS を含む浸透圧ポンプを移植した (vehicle 群)。移植から 24 h 絶食後、イソフルラン麻酔下にて 70%部分肝切除を実施した。肝切除後 168 h まで経時的に肝臓を回収し、肝体重比および肝重量の回復により再生を評価した。その結果、vehicle 群および TXA 群共に肝重量および肝体重比は肝切除後 168 h まで経時的に増加した。TXA 投与群では、vehicle 群と比較して肝重量および肝体重比の回復は緩やかに遅延した。このことから、TXA 投与による細胞線溶の阻害が肝再生を遅延させることが明らかとなった。

次に肝臓の細胞膜表面の Plg/plasmin 局在について fibrinogen-zymography によって解析した。Plg および plasmin の局在・活性は、肝切除後 12, 24 h の vehicle 群の細胞膜画分で認められた一方、TXA 投与により著しく減少した。この結果から、肝切除後には肝臓の細胞膜特異的に線溶活性が増加すること、その活性化は TXA 投与により抑制されることが明らかになった。

TXA 投与により肝重量回復が遅延したことから、次に細胞増殖への影響に着目した。細胞周期の進行を評価するため、肝細胞が増殖期にある肝切除後 24, 48 h での proliferating cell nuclear antigen (PCNA) および cyclin D1 のタンパク質発現を測定した。PCNA および cyclin D1 共に発現レベルは vehicle 群、TXA 投与群で差はなかった。また、cyclin E1, A2, B1 の mRNA 発現に関しても、両群で肝切除後 24 h あるいは 48 h をピークとして発現レベルが推移したが、TXA 投与による影響は認められなかった。さらに、DNA 合成を評価する目的で Ki-67 発現を免

疫組織化学的に解析した。両群の Ki-67 の発現は、肝切除後 24, 48 h それぞれで同程度であり、TXA 投与の影響はなかった。これらの結果から、細胞線溶の阻害による肝再生の遅延は、細胞増殖機構の抑制によるものではないことが明らかとなった。

*In vivo* モデルにおいて、TXA は細胞増殖に影響を及ぼさない可能性が明らかになった。そこで細胞膜に結合した Plg/plasmin の肝細胞増殖における機能について、初代培養ラット肝細胞を用いてさらに検討を行った。まず、Plg の肝細胞増殖への影響を調べる目的で、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Plg および 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF) を添加し、肝細胞の PCNA タンパク質発現および細胞膜に結合した Plg/plasmin 活性を測定した。肝細胞への EGF の添加は PCNA 発現を増加させた。一方、Plg 単体の処理は PCNA 発現を増加させなかった。これらの培養系における肝細胞膜上の線溶活性は、Plg 添加によってのみ活性化が認められた。また、Plasmin が DNA 合成に及ぼす影響を確認するために、チミジンアナログの EdU を用いた細胞増殖アッセイを行った。初代培養肝細胞に 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Plg と 10 U/mL ヒト urokinase (uPA) を共添加して培養系内で plasmin を生成させ、24 h から 72 h まで培養した後、Edu の取り込みを蛍光顕微鏡にて観察し定量化した。陽性対照群の EdU 取り込み率が約 80% であるのに対し、Plg/uPA 添加群の EdU 取り込み率は未処理群と差がなかった。これらの結果から、Plg/plasmin あるいは細胞周囲での線溶系の活性化は、肝細胞の増殖に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

### III. 肝再生におけるマクロファージによる組織リモデリングの重要性の解明

肝臓マクロファージ (M $\phi$ ) は、サイトカイン放出による炎症細胞の動員や肝細胞増殖の活性化を介して肝再生を強力に促進する。しかしながら、M $\phi$  の除去が肝再生や肝機能の回復にどの程度影響を及ぼすかは不明である。そこで本章では、肝障害を惹起する四塩化炭素を投与したマウスに、M $\phi$  を選択的に除去するクロドロン酸リポソーム (CLO) を投与し、肝組織の修復過程における M $\phi$  の実験的な除去が肝再生に及ぼす影響を検討した。

C57BL/6J マウス (オス, 8-12 週齢) に四塩化炭素を 1 mL/kg b.w. で経口投与し急性肝障害を惹起した。その後、四塩化炭素投与による炎症反応が終了し肝細胞増殖が認められる 48 h から、CLO (100  $\mu\text{L}/\text{mouse}$ ) を 48 h 毎に腹腔内投与した (CLO 群)。対照群にはクロドロン酸を含まないリポソームを同様に投与した (vehicle 群)。その後 216 h まで経時的に肝臓を回収した。CLO 投与により、四塩化炭素投与後 96 h (CLO 投与後 48 h) 以降、肝臓 M $\phi$  マーカー遺伝子 F4/80, Cd68 の発現レベルは顕著に抑制され、M $\phi$  の除去が確認された。また、血漿 ALT, AST 活性は両群共に四塩化炭素投与 48 h 後をピークに経時的に減少したが、CLO 投与群では 96 h 以降も高い ALT, AST 活性を維持した。ヘマトキシリン・エオシン染色による組織学的解析の結果、ALT, AST 活性の挙動とよく一致して CLO 投与群では 120h 以降も顕著な中心静脈域の組織損傷が観察された。これらの結果は、肝障害からの回復期における M $\phi$  の除去は、肝再生を著しく遅延させることを示している。

M $\phi$  の除去により肝再生が遅延したことから、次に細胞増殖関連因子について解析した。PCNA タンパク質発現および、Cyclin D1, Cdk1 遺伝子発現レベルは、四塩化炭素投与後 72 h をピークとして増減したが、CLO 投与の影響は観察されなかった。この結果から、CLO 投与による M $\phi$  の除去は細胞増殖とは無関係に肝再生を遅延させることが明らかとなった。

肝臓中の代謝物の変化を指標として肝機能の回復を評価するため、GC/MS を用いたメタボローム解析を行った。M $\phi$  の除去により組織損傷の回復の遅延が著しい 120, 168 h について vehicle 群と CLO 群の代謝物比較を行った結果、キサンチン、ヒポキサンチン、ガラクトースやグルコースなどのプリン代謝や糖の代謝産物が CLO 投与により減少していた。このことから、M $\phi$  の除去による肝臓組織構築の再生遅延と同様、肝機能の回復も著しく遅延させることが示された。

#### IV. 総括

本研究では、肝再生メカニズムの解明を目的として、肝細胞の増殖や組織リモデリングを中心に、細胞周囲の微小環境を制御する細胞線溶や M $\phi$  が肝再生に及ぼす影響について *in vivo*, *in vitro* で検討を行い以下の知見を得た。

第1章では、血液循環の維持機構である線溶系の新たな生理機能、細胞線溶に着目し、肝切除後に発動する細胞線溶の活性化が肝再生に関与することを新規の薬理的 *in vivo* モデルを用いてはじめて証明した。

第2章では、組織修復における M $\phi$  の重要性に着目し、M $\phi$  の除去によって肝組織の再構築ならびに機能回復の両者が著しく遅延すること、M $\phi$  が細胞増殖とは独立した再生制御機構を有することをはじめて明らかにした。

以上、本研究では細胞線溶やマクロファージの働きによって肝細胞周囲で生じる微小環境の再構成が、肝細胞の増殖や組織リモデリングを複雑かつ精緻に制御し、障害肝臓を再生することを初めて明らかにした。本研究の成果は、肝臓をはじめとした臓器・組織の根本的な再生メカニズムの更なる解明や創薬への応用に繋がる基礎的な知見である。

#### IV. Publication list

##### Original Article

- 1) \*[Miura A](#), Ishiguro K, Koizumi K, Yaita Y, Ozaki-Masuzawa Y, Hosono T, Seki T. (2017) Effects of pharmacological inhibition of plasminogen binding on liver regeneration in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 11, 2105-2111. DOI:10.1080/09168451.2017.1372180.

##### Others

- 1) 関 泰一郎, 三浦 徳 (2015) TAFI の基礎と臨床, 新・血栓止血血管学:抗凝固と線溶(一瀬白帝、丸山征郎、和田英夫編), pp106-113, 金芳堂, 京都.
- 2) 三浦 徳, 細野 崇, 関 泰一郎 (2014) 凝固・線溶・血小板タンパク質の機能発現機構: TAFI の構造と機能, 日本血栓止血学会誌, 25(4), 512-515.
- 3) 関 泰一郎, 三浦 徳, 細野 崇 (2013) 細胞間応答と線溶: メタロカルボキシペプチダーゼ TAFI の線溶制御機能と病態生理, 日本血栓止血学会誌, 24(5), 491-495.