

称号及び氏名	博士（獣医学）	Nahid Rahman
学位授与の日付	令和元年9月25日	
論文名	Pathogenesis of D-galactosamine-induced rat liver failure with special emphasis on macrophages and myofibroblasts (マクロファージと筋線維芽細胞に基づいたガラクトサミン誘発ラット肝障害の病理発生機序)	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	杉浦 喜久弥
	副査	渡来 仁

## 論文要旨

Liver failure, which is caused mainly by viruses and chemicals, has emerged as a major public health problem worldwide. The viral hepatitis may lead to chronic infection resulting in the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. D-galactosamine (D-GalN) is a hepatotoxic agent and has been used as a model of human viral hepatic disease. Animal models for D-GalN-induced liver injury should represent a series of events that may serve as a useful tool to clarify the underlying mechanisms.

Macrophages and myofibroblasts have important roles in liver lesions as the key cells. After tissue injury, M1-macrophages infiltrate at early stages and promote injury, and then M2-macrophages appear for tissue repair or reparative fibrosis. M1-/M2-macrophage polarization is attributable to liver failure development. In liver injury, hepatic stellate cells (HSCs) may transdifferentiate into  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)-expressing myofibroblasts capable of producing collagens; the cells contribute to reparative and progressive fibrosis. Understanding the properties of macrophages and myofibroblasts in rat liver injury would provide a new avenue for formulating cell specific therapeutic interventions.

A series of studies were conducted in order to investigate the immunophenotypical characteristics of macrophages and myofibroblasts in D-GalN-induced acute rat liver injury. Based on cellular properties of macrophages and myofibroblasts, the pathogenesis of D-GalN-induced

lesions could be partly clarified.

## **Chapter 1: Histopathological lesions and participation of autophagy in D-GalN-induced acute rat liver injury**

### **Section I: Histopathological lesions in D-GalN-induced acute rat liver injury**

D-GalN is a well-known hepatotoxic agent that causes liver injury. Hepatic lesions were induced in 6-week-old male F344 rats by a single intraperitoneal injection of D-GalN (800 mg/kg body weight). Liver samples were obtained at 8 h and on 1, 2, 3 and 5 days after injection. Lesions consisting of degeneration/sporadic foci of coagulation necrosis, inflammatory cell reaction, and reparative fibrosis, as well as bile duct hyperplasia were seen on days 1 and 2. Upregulation of apoptotic cells and regenerating cells were also observed mainly on days 1 and 2, respectively. On days 3 and 5, the lesions recovered to control levels. This rat liver failure model was used in the following experiments.

### **Section II: Participation of autophagy in D-GalN-induced acute rat liver injury**

Autophagy is an intracellular degradation process, which is performed by forming autophagosomes. LC3B (an autophagosome marker)-positive granules in hepatocytes were increased on days 1 and 2; interestingly, irregularly vacuolated structures were often seen in the lesions. Functionally abnormal autophagy might participate in the development of liver lesions.

## **Chapter 2: Characterization of heterogeneous macrophages in D-GalN-induced acute rat liver injury**

### **Section I: Immunophenotypical analysis of macrophages in relation to M1-/M2-polarization in D-GalN-induced acute rat liver injury**

Macrophages reacting to CD163 (for M2-macrophages) and CD68 (for M1-macrophages) increased on days 1 and 2 in agreement with lesion development; the former appeared earlier than the latter. Along with these M1-/M2-macrophages, M1-related inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and INF- $\gamma$ ) and M2-related anti-inflammatory cytokines (TGF- $\beta$ , IL-10, MCP-1 and IL-4) were increased on days 1 and 2. Double immunofluorescence showed that 82% of CD68-expressing M1-macrophages co-expressed with CD163. These findings indicated that CD68 M1- and CD163 M2-macrophages participated in the lesion development, with showing simultaneous immunophenotypes.

### **Section II: Characterization of MHC class II- and CD204-expressing macrophages in D-GalN-induced acute rat liver injury**

Increased numbers of MHC class II- and CD204-expressing macrophages were observed on

days 1 and 2. In double immunofluorescence on day 2, MHC class II-expressing macrophages reacted with CD68 (75%) or CD163 (65%), and approximately 95% of CD204-expressing macrophages co-expressed with CD68 and CD163. Macrophages reacting to MHC class II and CD204 took part in the lesion development, showing both functions of M1-/M2-macrophages.

### **Section III: Possible derivation of macrophages in D-GalN-induced acute rat liver injury**

CCR2 (a marker of blood monocytes) mRNA was increased on days 1 and 2. The majority of CD68-expressing M1- and CD163-expressing M2-macrophages on day 2 reacted simultaneously to CCR2. Macrophages appearing in the D-GalN-induced liver lesions might be recruited mainly from blood monocytes.

## **Chapter 3: Participation of mesenchymal cells and myofibroblasts in D-GalN-induced acute rat liver injury**

### **Section I: Immunophenotypical analysis of myofibroblasts in D-GalN-induced acute rat liver injury**

On days 1 and 2 when the most severe injury occurred, myofibroblasts reacting to  $\alpha$ -SMA, vimentin and desmin were diffusely or focally observed within the lobules, with the greatest expressions on day 2; fibrosis-related cytokines such as TGF- $\beta$ 1, PDGF- $\beta$ , Mmp2 and Timp2 were also increased mainly on days 1 and 2. On day 2, approximately 82% and 92% of  $\alpha$ -SMA-expressing cells reacted simultaneously to vimentin and desmin, respectively; additionally, approximately 86% of vimentin-expressing myofibroblasts co-expressed with desmin. Because  $\alpha$ -SMA expression is the most reliable marker for myofibroblasts, it was found that myofibroblasts were formed, showing various cytoskeletons including vimentin and desmin.

### **Section II: Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing myofibroblasts in D-GalN-induced acute rat injury**

GFAP-positive cells were increased mainly on days 1 and 2. On day 2, 64% and 79% of GFAP-expressing cells co-expressed with vimentin and desmin, respectively; moreover, 74% of GFAP-expressing cells also expressed  $\alpha$ -SMA. Because GFAP-expressing cells in control livers are regarded as HSCs, myofibroblasts seen in the liver lesions might be generated from pre-existing HSCs, showing various cytoskeletons such as  $\alpha$ -SMA, vimentin and desmin.

### **Section III: Possible derivation of myofibroblasts from immature mesenchymal cells in D-GalN-induced acute rat liver injury**

Nestin and A3 were used for detection of immature mesenchymal cells in rats. There were mesenchymal cells reacting to nestin and A3, with sporadic and focal distribution within the affected liver lobules on days 1 and 2. In the lesion on day 2, GFAP-expressing myofibroblasts

co-expressed nestin and A3 at 67% and 76%, respectively. Moreover, Thy-1-reacting mesenchymal cells were seen in and around the Glisson's sheath. Since Thy-1 is also used as a marker of immature mesenchymal cells, myofibroblasts might be derived from immature mesenchymal cells or HSCs with immature nature.

## Conclusions

In a series of studies, the participation of hepatic macrophages and myofibroblasts in D-GalN-induced liver hepatotoxicity was investigated. Conclusions are as follows:

1. Histopathological lesions, characterized by regeneration/necrosis and inflammatory cell reaction, and reparative fibrosis, as well as bile duct hyperplasia, were seen sporadically or diffusely within the affected lobules. Apoptotic cells and regenerating hepatocytes occurred in the injured areas.
2. D-GalN-treatment induced abnormal autophagy in hepatocytes, which might be related to hepatotoxicity.
3. CD68 M1- and CD163 M2-macrophages participated in the liver lesion development, with increased levels of M1- and M2-related cytokines. These macrophages also expressed MHC class II and CD204, simultaneously.
4. Because both M1- and M2-macrophages simultaneously expressed with CCR2 (a blood monocyte marker), macrophages participating in the liver lesions might be derived mainly from blood monocytes.
5. Myofibroblasts were formed, showing cytoskeletons such as  $\alpha$ -SMA, vimentin and desmin, or co-expression of each other cytoskeleton; the development was in agreement with increased expression of fibrosis-related cytokines.
6. GFAP-expressing myofibroblasts reacted to  $\alpha$ -SMA, vimentin and desmin or immature mesenchymal cell markers (nestin, A3 and Thy-1), indicating possible derivation of myofibroblasts from mesenchymal cells with immature nature.
7. The present studies would provide useful information on macrophages and myofibroblasts for understanding the pathogenesis of D-GalN-induced liver failure, which may lead to possible insights for effective therapeutic strategies against liver injuries.

## 審査結果の要旨

肝臓は、栄養・エネルギー代謝や化学物質の解毒などを通じ生体の恒常性維持において重要な役割を担う。急性の肝障害は、肝炎ウイルスの感染や過剰な医薬品の摂取などにより生じ、それが慢性化すると肝硬変に至ることがある。D-ガラクトサミン（D-GalN）は、肝毒性を有する化学物質で、実験的に誘発された肝病変はヒトのウイルス性肝障害のそれ

に類似するとされる。通常、組織傷害後の炎症と修復において、マクロファージと筋線維芽細胞が中心的な役割を担うが、急性肝障害におけるこれら細胞の関与については未だ不明な点がある。

病理学的に、傷害部位に出現するマクロファージは、CD68 を発現する M1 型が、続いて CD163 を発現する M2 型が現れる。M1 型は高い貪食活性を有し、起炎因子を産生することで炎症を助長する。一方、M2 型は炎症抑制と修復性線維化を導くとされる。しかし、これらマクロファージの機能は、傷害の程度や経過により異なる。筋線維芽細胞は、その形成過程で vimentin、desmin や  $\alpha$ -平滑筋アクチン ( $\alpha$ -SMA) などの細胞骨格を発現する。その筋線維芽細胞は、通常は、既存の間質線維芽細胞に由来するとされるが、臓器間で異なる特異的な起源細胞があるとされる。D-GalN 誘発肝障害におけるこれら細胞の出現状況やその発生機序の詳細は検討されていない。

本研究では、D-GalN 誘発ラット肝障害モデルを用いて、その病態の詳細な解析に加え、出現するマクロファージの性状と筋線維芽細胞の細胞特性を、主に免疫組織化学的手法を用いて解析し、新たな知見を得ている。

第 1 章では、第 1 節において、D-GalN をラットに投与し、その後 8 時間、1、2、3 と 5 日に肝組織を採材し、病理組織学的に精査している。その結果、肝病変は投与後 1 日と 2 日に生じ、それは肝細胞変性・単細胞壊死・凝固壊死から成る肝小葉内の多巣状病変として現れ、かつ同時に膠原線維の増加による修復性線維化が生じていることを明らかにした。投与後 3 日と 5 日ではその病変は回復していた。第 2 節においては、LC3B 抗体を用いてオートファゴゾームの出現を免疫組織化学染色により解析している。その結果、オートファゴゾームは投与後 1 日と 2 日の傷害肝細胞の細胞質内で微細顆粒状から空胞状の形態を示し増加することを明らかにしている。以上より、D-GalN 誘発病変は、肝小葉内に多巣性に形成され、傷害と修復が同時に生じ、その進展にはオートファジーに係る可能性を示している。

第 2 章では、出現するマクロファージの特性について解析している。第 1 節では、肝病変が認められる投与後 1 日と 2 日において、M1 型 (TNF- $\alpha$ , IL-6, INF- $\gamma$ ) と M2 型 (IL-10, MCP-1, IL-4) のサイトカインの上昇を伴い、CD68 発現 M1 型と CD163 発現 M2 型マクロファージが増加し、二重免疫蛍光染色によりその多くは CD68 と CD163 を共発現していることを示した。また、特徴として、M2 型が M1 型より早く出現する傾向があることが分かった。第 2 節においては、MHC クラス II と CD204 を発現するマクロファージの特性について二重免疫蛍光染色により解析している。その結果、どちらのマクロファージも CD68 と CD163 を共発現しており、M1 型と M2 型の双方の機能を有していることが分かった。さらに、第 3 節においては、血中単球マーカーである CCR2 との二重免疫蛍光染色を行い、M1 型と M2 型の多くが CCR2 を発現していることを示した。以上より、D-GalN 誘発肝障害に出現するマクロファージの多くが、傷害性の M1 型と修復性の M2 型の機能を有し、そのほとんどが炎症細胞として血中単球に由来することを明らかにしている。

第3章では、修復性線維化に係る筋線維芽細胞の細胞特性を免疫組織化学的に解析している。第1節では、投与後1日と2日の肝病変部位において、線維化に関連するサイトカイン（TGF- $\beta$ 1, PDGF- $\beta$ , Mmp2, Timp2）の上昇と一致し、vimentin、desminや $\alpha$ -SMAを発現する筋線維芽細胞が形成されることが分かった。また、二重免疫蛍光染色により、 $\alpha$ -SMA発現細胞の多くがvimentinやdesminを共発現し、かつvimentinとdesminを共発現する細胞も数多くみられることを示した。第2節と第3節では、筋線維芽細胞の起源について追究している。肝星細胞は元来グリア線維性酸性蛋白質（GFAP）を発現するとされるが、二重免疫蛍光染色を行ったところ、線維化部位のGFAP発現細胞の多くが、vimentin、desminや $\alpha$ -SMAを共発現することが分かった。また、nestinとA3との二重免疫蛍光染色により、これらを共発現するGFAP発現細胞も存在していることが分かった。さらに、Thy-1を発現する細胞が線維化部位で増加することも明らかにしている。Nestin、A3とThy-1は未分化間葉系細胞のマーカーである。以上より、D-GalN誘発肝病変には、vimentin、desminや $\alpha$ -SMAなどの細胞骨格を種々の割合で発現する筋線維芽細胞が出現し修復性の線維化に係ること、その起源は肝星細胞や未分化間葉系細胞である可能性を提示している。

本研究では、ヒトのウイルス性肝炎の病態に類似するD-GalN誘発病変を作製し、出現するマクロファージと筋線維芽細胞の細胞特性を詳細に解析することで、急性肝障害の病理発生機序の一端を明らかにしている。この成果は、獣医学・医学、特に医薬品開発における実験病理学の基礎研究の新たな展開に資するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。