

称号及び氏名	博士（獣医学）	倉持 瑞樹
学位授与の日付	2020年3月31日	
論文名	Pathological studies on characteristics of macrophages and damage-associated molecular patterns (DAMPs) in thioacetamide-induced rat liver injury (チオアセトアミド誘発ラット肝障害に関与するマクロファージの特徴とダメージ関連分子群に関する病理学的研究)	
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

背景

炎症は、組織傷害に対する生体反応である。好中球、リンパ球やマクロファージなどの様々な細胞が炎症細胞として反応するが、その出現には、傷害の程度や経過、さらには起炎因子の種類により異なる。その中で、マクロファージは多様な機能を現すことから、炎症の進展との係わりで研究が進められている。傷害部位に出現するマクロファージは、 $\text{INF-}\gamma$ によって誘導され、 $\text{TNF-}\alpha$ などの炎症性サイトカインを放出することで傷害を助長させる M1 と、 IL-10 や $\text{TGF-}\beta$ などの抗炎症性サイトカインを産生し、線維化・組織修復に関わる M2 に分類される。この M1/M2 分極化のバランスによって炎症の促進と治癒が規定されている。

肝臓は、エネルギー代謝や解毒作用などを通じ、生体の恒常性維持を担う。それ故に、医薬品や農薬などの開発において、肝毒性を有する化学物質の毒作用を探究することは重要である。肝毒性は、化学物質そのものの毒作用や活性化した代謝産物が肝細胞を傷害することで、炎症が引き起こされるとされる。このような肝毒性における炎症の起点として、傷害・壊死細胞から放出される低分子の総称である **damage-associated molecular patterns (ダメージ関連分子群; DAMPs)** が近年注目されている。DAMPs は、生理的状態の細胞内に存在するが、傷害によって膜透過性が変化し細胞外に放出されると、TLRs などの自然免疫に関わる受容体を介して炎症を誘導するとされる。肝毒性の発現における、傷害肝細胞から放出される DAMPs の種類や炎症の誘導機序、さらに DAMPs の影響を受けると考えら

れるマクロファージの出現とその特性については十分に研究されていない。

本研究は、肝細胞傷害を引き起こすチオアセトアミド (TAA) をラットに投与し、出現するマクロファージの動態と DAMPs に着目した炎症の進展機序を解明することを目的とした。第 1 章では、TAA 投与による化学物質誘発性の肝病変に出現するマクロファージの特性を解析するとともに、マクロファージ機能を低下させた状態での TAA 誘発肝障害の病変形成に与える影響を検討した。第 2 章では、TAA 誘発肝細胞傷害における DAMPs の係わりを TAA の投与量を変えることで解析し、さらに DAMPs のひとつである HMGB1 とマクロファージとの係わりについて検討した。第 3 章では、TAA 誘発肝障害と HMGB1 との係わりを詳細に解析するために、軽度の肝細胞傷害を引き起こす低用量の TAA 誘発肝障害を用いて、抗 HMGB1 抗体を投与することで病変形成への影響を検討した。

第 1 章 チオアセトアミド (TAA) 誘発肝障害におけるマクロファージの役割

第 1 節 TAA 単回投与による肝細胞傷害で出現するマクロファージの特性解析

ラットに TAA (300 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与し、投与後 10 時間、1, 2, 3, 5, 7 日に肝臓を採材した。病理組織学的に、投与後 10 時間では変化は認められなかったが、投与後 1 日に小葉中心性の肝細胞壊死、投与後 2 日と 3 日には炎症細胞の浸潤が認められた。投与後 5 日から、傷害部位は修復性線維化により回復した。免疫染色により、CD68 (M1 マクロファージ) と CD163 (M2 マクロファージ) 発現細胞はいずれも投与後 1 日と 2 日に増加し、その後漸減した。M1 の炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) は投与後 10 時間と 1 日で上昇し、M2 マクロファージの誘導にかかわる IL-4 は投与後 10 時間に、M2 の抗炎症性サイトカイン (IL-10, TGF- β 1) は投与後 1, 2, 3 日で上昇した。化学物質による肝障害の病変形成に M1/M2 マクロファージが関与することが示された。

第 2 節 デキサメサゾンによるマクロファージ抑制下での TAA 誘発肝障害の病態解析

デキサメサゾン (DX) は抗炎症剤として使用されている。DX (0.5 mg/kg 体重) をラットに 3, 7, 11 日間連続腹腔内投与すると対照群に比べて CD163 発現クッパー細胞が激減していた。そこで、TAA 誘発肝障害におけるマクロファージの影響を解析するため、3 日間連続 DX (0.5 mg/kg 体重) を腹腔内投与したラットに TAA (300 mg/kg 体重) を投与 (DX+TAA 群) した。なお、DX を前処置しない TAA 単独群を設定した。肝臓を TAA 投与後 1, 3, 5, 7 日で採材した。その結果、TAA 単独群に比べ、DX+TAA 群では、M1/M2 マクロファージが著しく減少し、肝細胞傷害後の線維化が軽減された。TAA 誘発肝病変の形成にマクロファージが影響を与えることが分かった。

第 3 節 TAA 反復投与による肝障害の病態解析とマクロファージの動態

TAA (100 mg/kg 体重) を 3 日間隔でラットに 3 回投与し、連回投与による肝病変の解析と出現するマクロファージの動態を解析した。その結果、TAA 連回投与により TAA 代謝に係る FMO3 が低下し、それに伴い 1 回投与よりも 2 回と 3 回投与群で肝病変が軽減し、さらに M1/M2 マクロファージ数も同様に減少していることが分かった。連回投与による肝病変の軽減は代謝酵素の低下に起因し、かつ肝細胞傷害の低減は M1/M2 マクロファージの減数と関連することが示唆された。

第2章 TAA 誘発肝障害における DAMPs の動態

第1節 高用量 TAA 誘発肝障害における DAMPs の動態

第1章第1節で示した TAA (300 mg/kg) 誘発肝障害病変における DAMPs の発現を解析した。その結果、DAMPs として、投与後2日と3日に HMGB1, HMGB2, S100A4 の発現が上昇しており、DAMPs のレセプターである TLR4 の発現量は投与後2日と3日で増加していた。蛍光免疫染色により、正常肝細胞でみられた HMGB1 に対する核内での陽性反応が投与後10時間から細胞質に移行し、その後1日と2日では多くの傷害肝細胞の細胞質で陽性所見が認められた。HMGB1 が傷害部位での炎症誘導に係る可能性が示された。

第2節 低用量 TAA 誘発肝障害における DAMPs の動態

第3章で HMGB1 抗体を用いた中和実験を行うにあたり、第1節の高用量の肝病変よりも軽度の肝細胞傷害の方が評価し易いことから、ラットに低用量の TAA (50 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与する実験を行った、TAA 投与後6, 12, 18, 24, 48時間で肝臓を採材した。病理組織学的に、投与後12時間で肝細胞の単細胞壊死が生じ、その後炎症が24時間まで認められた。蛍光免疫染色を行ったところ、HMGB1 の核から細胞質への移行が TAA 投与後6時間から認められ始め、投与後12時間で M1/M2 マクロファージに加え、好中球が増加し始めた。高用量 (300 mg/kg) TAA 投与肝障害と同様に、低用量 (50 mg/kg) 投与での肝病変は、その程度がより軽度であったが、初期に生じた HMGB1 の核から細胞質への移行に引き続き炎症が進展することが示された。

第3章 HMGB1 中和抗体投与による TAA 誘発肝障害の病態解析

TAA (50 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与後6時間に HMGB1 中和抗体を尾静脈から投与することで HMGB1 中和 TAA 誘発肝障害ラットを作製した (TAA+ α HMGB1 群)。対照群には IgY を投与した (TAA+IgY 群)。TAA 投与後12, 18, 24時間で採材した。両群間の比較において、TAA 投与による肝細胞の傷害程度には差は認められなかったが、TAA+ α HMGB1 群において、TAA+IgY 群よりも AST と ALT 値の増加が抑制され、出現する M2 マクロファージと好中球も減数し、さらに炎症性サイトカイン (IL-6) や好中球遊走ケモカイン CXCL1 の発現が抑制されていた。HMGB1 抗体投与により TAA 誘発病変にみられる炎症が抑制されることが示された。HMGB1 が起炎因子として機能していることが分かった。

総括

本研究では、TAA 誘発肝障害ラットを用いて、肝細胞傷害時に出現するマクロファージの特性と HMGB1 の炎症への係わりについて解析し、以下の成果を得た。

1. TAA 投与により、肝細胞傷害部位に M1/M2 マクロファージが出現し、かつデキサメサゾンによるマクロファージ枯渇下では肝細胞傷害後の線維化が抑制された。さらに、TAA 連回投与により肝細胞傷害の程度が軽減し、それに伴いマクロファージの出現が減数した。化学物質による肝病変の形成には出現するマクロファージが影響を与えていることが示された。
2. TAA 誘発肝障害において、DAMPs として HMGB1 の mRNA 発現上昇が認められ、傷

害早期に HMGB1 が肝細胞の核から細胞質に移行し、その後 M1/M2 マクロファージなどの炎症細胞が出現し、病態が進展することが分かった。

3. HMGB1 中和抗体投与による TAA 誘発肝障害への影響を解析したところ、抗体投与により肝細胞傷害部位に出現する M2 マクロファージと好中球が減数し、炎症が軽減することが分かった。
4. 以上より、化学物質誘発性肝障害において、初期に放出される HMGB1 が起炎因子となり、その後 M1/M2 マクロファージなどの炎症性細胞を誘導し、その影響により病態が修飾される可能性が示された。

この研究は薬物性の肝障害の病理発生機序の一端を明らかにするとともに、得られた成果は肝障害の治療法探索において有益な情報を提供すると考えられる。

審査結果の要旨

炎症は、細胞や組織傷害に対する生体反応である。好中球、リンパ球やマクロファージなどの様々な細胞が反応するが、その出現には、傷害の程度や経過、さらには起炎因子の種類により異なる。その中で、マクロファージは多様な機能を現すことから、炎症の進展との係わりで研究が進められている。傷害部位に出現するマクロファージは、傷害を助長させるM1と、線維化・組織修復に関わるM2に分類される。このM1/M2分極化のバランスによって炎症の促進と治癒が規定されているが、その誘導因子や機能特性については未だ不明な点がある。

肝臓は、エネルギー代謝や解毒作用などを通じ、生体の恒常性維持を担う。それ故に、医薬品や農薬などの開発において、肝毒性を有する化学物質の毒作用を探究することは重要である。肝毒性は、化学物質そのものの毒作用や活性化した代謝産物が肝細胞を傷害することで炎症を引き起こされるとされる。このような肝毒性における炎症の起点として、傷害・壊死細胞から放出される分子の総称であるdamage-associated molecular patterns (ダメージ関連分子群：DAMPs) が注目されている。DAMPsは、生理的状態の細胞内に存在するが、傷害によって細胞外に放出されると、自然免疫に関わる受容体を介して炎症を誘導するとされる。肝毒性の発現における、傷害肝細胞から放出されるDAMPsによる炎症の誘導、さらにDAMPsの影響を受けると考えられるマクロファージの出現とその特性については十分に研究されていない。

本研究は、肝細胞傷害を引き起こすチオアセトアミド (TAA) をラットに投与し、出現するマクロファージの動態とDAMPsに着目した炎症の進展機序を解明することを目的として実施している。

第1章では、第1節においてTAA単回投与による一過性の肝細胞傷害部位に出現するマクロファージの特性を解析している。その結果、反応するマクロファージにはCD68発現のM1とCD163発現のM2が出現し、さらに関連してM1型の炎症促進因子とやや遅れてM2型の抗炎症因子が増加することを示している。第2節では、抗炎症剤であるデキサメサゾ

ンを前処置することで肝マクロファージ（クッパー細胞など）を枯渇させ、その後TAA単回投与による肝障害を解析している。その結果、デキサメサゾン前処理によりM1マクロファージの浸潤が常に低下し、M2マクロファージの一過性の減数に起因する修復性線維化が抑制されることを明らかにしている。第3節では、TAAを反復投与することによる肝障害を解析している。その結果、連回投与によりTAAを代謝する肝酵素が低減し、さらに浸潤するM1/M2マクロファージの減数を伴うことで肝細胞傷害が軽減することを示している。以上の結果は、TAA誘発肝障害の病変形成はM1/M2マクロファージ分極化の影響により修飾される可能性を示している。

第2章では、第1節で、前章第1節で用いたTAA投与肝障害において出現するDAMPsの一種であるHMGB1の発現動態を解析している。その結果、傷害が未だ認められない肝細胞において、通常核に局在するHMGB1が細胞質へ移行していることを見出している。さらに、第2節では、より軽度の肝細胞傷害におけるHMGB1の発現動態を解析する目的で、第1節よりも低い用量でのTAAの単回投与による肝障害を解析している。その結果、軽度の肝細胞傷害部位においても、M1/M2マクロファージが観察され、加えて好中球が特徴的な炎症細胞として出現すること、さらに傷害が現れる前の肝細胞においてやはり核内のHMGB1が細胞質へ移行していることを明らかにしている。以上の結果は、M1/M2マクロファージの傷害部位への浸潤に先立ちHMGB1が細胞外に放出され、起炎因子となっている可能性を示している。

第3章では、HMGB1の起炎因子の可能性をさらに追究するために、低用量投与によるTAA誘発肝障害（第2章第2節のデータを参照に実験を設定）を用いてHMGB1中和抗体を投与した状態での病変の推移を解析している。その結果、病理組織学的な差異は認められなかったが、中和抗体投与により肝逸脱酵素値が低減し、M2マクロファージと好中球の浸潤が抑制され、さらに炎症性サイトカインやケモカインの発現が低下することを明らかにしている。以上の結果から、HMGB1抗体を投与することでTAA誘発肝障害がある程度抑制されることが明らかとなり、HMGB1が炎症誘導に係る一つの重要な起炎因子であることが分かった。

本研究は、起炎因子としてのHMGB1と、病変修飾に係るM1/M2マクロファージ分極化に基づいて、化学物質による肝毒性の病理発生機序の一端を明らかにするとともに、得られた成果は肝障害の治療法探索において有用な情報を提示すると考えられる。よって、この研究は、獣医学・医学、特に創薬基盤としての毒性病理学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。