

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	斉藤 亜呼
学位論文題目			
Fucoïdan prevents concanavalin A-induced liver injury through induction of endogenous IL-10 in mice.			
(Fucoïdanは内因性IL-10産生を誘導しマウスconcanavalin A誘発肝障害の発症を阻止する)			
共著者名			
米田政志、横浜吏郎、岡田充巧、羽田勝計、中村公英			
未公表			
研究目的			
ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎、肝移植後の拒絶反応など、ヒトの多くの肝障害発症機序には活性化T細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。近年、マウスに concanavalin A(Con A)を静脈内投与することにより、T細胞を活性化し肝に選択的な壊死をおこすモデル(Con A肝障害モデル)が見いだされた(引用文献1)。本モデルの肝障害発症機序には活性化T細胞から産生されるTNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカインが関与することが報告されている。我々は、これまでCon A肝障害モデルにおける免疫学的肝細胞傷害発症機序とその治療法について主としてサイトカインやケモカイン産生調節の点から検討を行ってきた(参考論文1-3)。			
Fucoïdanは海藻に含まれる硫酸化多糖類であるが、生物系に対して様々な作用を持つことが報告されている(引用文献2)。Fucoïdanはmacrophage scavenger receptor (MSR)のligandであり、MSRを介してサイトカインの産生を促進させることが報告されている。今回我々は、fucoïdanのCon A肝障害モデルに対する効果と、サイトカイン動態に対する影響について検討を行った。			
材料・方法			
1. Con A肝障害モデルの作成			
7-8週齢の雌性BALB/cマウスにCon A 18.5 mg/kgを静脈内投与し、肝障害を誘導した。			
2. Con A肝障害に対するfucoïdanの抑制効果			
Con A投与の30分前にfucoïdanを種々の用量(0-30 mg/kg)で静脈内投与し、Con A投与8、24時間後の血中alanine aminotransferase (ALT)濃度を酵素法で測定した。また、Con A投与8、24時間後の肝組織障害の程度をH-E染色で比較するとともに、肝組織中の好中球をnaphthol AS-D chloroacetate法で染色し肝浸潤好中球数を比較検討した。			

3. Con A肝障害モデルのサイトカイン動態に対するfucoidanの影響

Fucoidan 10 mg/kgをCon A投与30分前に投与し、投与2、4、8時間後の血中TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)の濃度をELISA法で測定した。次に、抗マウスIL-10抗体を前投与したマウスに同様にfucoidanとCon Aを投与し、8時間後の血中ALT値、IFN- γ 値と2時間後の血清TNF- α 値を測定した。

4. fucoidanによるIL-10産生誘導の検討

種々の用量のfucoidanを尾静脈から投与し、1時間後に屠殺して血清中のIL-10濃度を測定した。また、fucoidan 10 mg/kgを静脈内投与し、0、1、2、4、8時間後の血中および肝組織中のIL-10濃度を測定した。また、fucoidan投与1時間後の肝臓からRNAを抽出し、RT-PCR法でIL-10のmRNA発現の有無を検討した。さらに、IL-10の産生細胞を明らかにするために、抗マウスCD4抗体とGdCl₃をfucoidan投与の24時間及び48時間前に投与し、fucoidan投与1時間後の血中IL-10値を測定した。さらに、fucoidan投与の1時間前に抗マウスMSR抗体を投与し、fucoidan投与1時間後の血中IL-10値を測定した。

成績

1. Con A肝障害に対するfucoidanの効果

Fucoidanの前投与により、Con A投与8時間後のALT値は用量依存性に有意に抑制された。病理組織学的にもfucoidan 10 mg/kgの前投与によりCon A投与24時間後の肝小葉中間帯における肝細胞傷害が著明に抑制された。しかし、肝内好中球浸潤の程度は両者で有意な差を認めなかった。

2. Fucoidan前投与によるサイトカイン動態の変化

Fucoidan前投与により、Con A投与2、4時間後の血中TNF- α 濃度と2、8時間後の血中IFN- γ 濃度の上昇が有意に抑制された。しかし、血中MIP-2濃度には有意差が認められなかった。一方、血中IL-10濃度はCon A投与2時間後に有意に上昇した。これらfucoidanの血中ALT、TNF- α 、IFN- γ 上昇抑制効果は抗IL-10抗体の前投与により解除された。

3. FucoidanによるIL-10産生誘導

Fucoidanの単独投与1時間後の血中IL-10値は用量依存性に上昇した。Fucoidan 10mg/kgの投与を行い、血中および肝組織中のIL-10値の時間経過を検討すると、血中IL-10は投与後2時間を、肝組織中のIL-10濃度は投与後1時間をピークとした上昇を認めた。また、fucoidan投与1時間後に肝組織中でIL-10 mRNA発現が確認された。抗マウスCD4抗体でCD4陽性T細胞を減少させると、fucoidan投与1時間後の血中IL-10値の上昇は軽度抑制された。一方、GdCl₃で肝Kupffer細胞を減少させるとIL-10の上昇は著明に抑制された。また、抗マウスMSR抗体を前投与すると、fucoidan投与1時間後の血中IL-10値上昇は有意に抑制された。

考案

Con Aマウス肝障害モデルの肝障害発症機序として、Con Aの投与によりCD4陽性T細胞が活性化され、TNF- α やIFN- γ などの炎症性サイトカインが産生されることが重要であると報告されている。一方、fucoidanはフノリやワカメに含まれる硫酸化多糖類であり、ほ乳類の生体システムに様々な作用を示すことがこれまでに報告されている。FucoidanはMSRのligandのひとつであり、MSRを介してサイトカインを産生することが示唆されている。

本研究ではCon A肝障害モデルにおいて、fucoidanが肝障害発症を抑制する効果を持つことを明らかにした。Con A肝障害発症に関わる炎症性サイトカインの産生はfucoidanの前投与により有意に抑制された。一方、Con A肝障害発症を抑制するIL-10濃度はfucoidan投与により比較的早い時間から血中に上昇が認められた。また、抗マウスIL-10抗体とfucoidanを同時に投与すると、fucoidanによる血清ALT、TNF- α 、IFN- γ の上昇抑制効果は解除された。以上の結果より、このモデルにおけるfucoidanの抑制効果は、IL-10の産生亢進を介した炎症性サイトカインの産生抑制が関与していることが示唆された。

そこで、fucoidan単独投与により内因性IL-10の産生が誘導されるか否かを検討した。血中IL-10値はfucoidan単独投与2時間後を最高値として上昇を認めた。一方、肝組織中では投与1時間後を最高値としてIL-10濃度が上昇し、またIL-10 mRNA発現も認められた。従って、fucoidan投与による血中IL-10の上昇は肝組織中での内因性IL-10産生を反映しているものと考えられた。さらに肝組織中の産生細胞について検討した結果、GdCl₃または抗マウスMSR抗体の投与によりfucoidanによるIL-10産生が抑制されたことにより、fucoidanはMSRを介して肝Kupffer細胞からIL-10を誘導すると考えられた。

結論

Fucoidanは内因性IL-10の産生誘導を介してCon Aによる炎症性サイトカインの産生を抑制し、Con A肝障害発症を抑制した。FucoidanによるIL-10産生機序は、macrophage scavenger receptorを介し肝Kupffer細胞が関与していることが示唆された。本研究によりfucoidanは免疫学的肝細胞傷害機序が関与する各種肝疾患に有用な薬剤となることが示唆された。

引用文献

1. Tiegs, G., J. Hentschel, and A. Wendel, A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest*, 1992. **90**(1): p. 196-203.
2. Berteau, O. and B. Mulloy, Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 2003. **13**(6): p. 29R-40R.

参考論文

1. Nakamura, K., et al., Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF-alpha plays a pivotal role in concanavalin A-induced liver injury in mice. *J Hepatol*, 2001. **35**(2): p. 217-24.
2. Nakamura, K., et al., Antithrombin III prevents concanavalin A-induced liver injury through inhibition of macrophage inflammatory protein-2 release and production of prostacyclin in mice. *J Hepatol*, 2002. **36**(6): p. 766-73.
3. Nakamura, K., et al., High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. *J Gastroenterol*, 2004. **39**(4): p. 346-54.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	斉藤 亜呼
審査委員長 立野正敏 ㊦ 審査委員 羽田勝計 ㊦ 審査委員 若宮伸隆 ㊦			
学位論文題目			
Fucoidan prevents concanavalin A-induced liver injury through induction of endogenous IL-10 in mice. (Fucoidan は内因性 IL-10 産生を誘導しマウス concanavalin A 誘発肝障害の発症を阻止する)			
<p>ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎、移植後の拒絶反応など人の多くの肝障害発症機序には活性化T細胞が重要な役割を果たしている。マウスに Con A を投与することで T 細胞の活性化を介して肝に選択的な壊死を引き起こす免疫学的肝障害のモデル (ConA 肝障害) が見出された。ConA 肝障害発症機序には炎症性サイトカインが関与すると報告されている。論文申請者である斉藤氏は海藻由来の硫酸化多糖類である fucoidan が Con A 肝障害に対する効果とそのサイトカイン動体に及ぼす影響について検討した。</p> <p>実験結果として ConA 肝障害において fucoidan 投与は用量依存性に肝障害を軽減することが血中 ALT 値の測定や病理組織学的検討から証明された。また fucoidan の投与によって Con A 投与による TNF-α、IFN-γ 値の上昇が抑制され、IL-10 値は Con A 投与後に見られるよりも早期に上昇することが示された。Fucoidan 投与による肝障害抑制、炎症性サイトカイン産生抑制効果は抗 IL-10 抗体の前投与によって解除された。以上より、fucoidan の Con A 肝障害抑制効果は内因性 IL-10 の産生亢進を介した炎症性サイトカインの産生抑制が関与していることが示唆された。</p> <p>Fucoidan 単独投与では血中 IL-10 値の上昇が認められ、これは肝組織中での IL-10</p>			

値上昇を反映しているものと考えられた。IL-10 産生細胞を検討する目的で抗 CD4 抗体、GdC13 を用いた検討により、fucoidan 投与後の IL-10 産生には肝 Kupffer 細胞が関わっていると考えられた。

本研究は Fucoidan が免疫学的肝障害に対して抑制的に働くことを示したものであり免疫学的肝細胞障害機序が関与する肝疾患の治療薬への可能性を示したものである。

なお、諮問審査においても、本論文とその関連領域に関して十分な知識があり、自分の研究に理解が深くかつ客観視できていることが証明された。以上より、本論文を医学博士の学位論文に値するものと判定した。