

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	岡 本 聡
学 位 論 文 題 目 Macrophage inflammatory protein-1α plays a role in concanavalin A-induced liver injury through induction of proinflammatory cytokines in mice. (Concanavalin A 誘発マウス肝障害における Macrophage Inflammatory Protein-1αの関与) 共 著 者 名 横浜 吏郎、米田 政志、羽田 勝計、中村 公英と共著 Hepatology Research 掲載号未定 研 究 目 的 マウスにレクチンの一種であるconcanavalin A (Con A)を投与することによって、Tリンパ球の活性化を介した免疫学的肝障害を生じることが知られており、この実験肝障害は自己免疫性肝炎、劇症肝炎の動物モデルとされている（引用文献 1）。一方、白血球の遊走活性化因子であるケモカインは、さまざまな炎症やアレルギー疾患への関与が報告されているが（引用文献 2）、Con A誘発肝障害における役割はいまだ十分解明されていない。 われわれはこれまでに、Con A投与後早期に種々のケモカインが血中に増加すること、またマウスCXCケモカインである macrophage inflammatory protein-2が好中球の遊走活性化を介して肝障害の増悪因子として働くことを報告した（引用文献 3）。一方、本モデルの主役であるリンパ球、単球を遊走活性化するCCケモカインについては、これまでほとんど検討がなされていない。今回われわれは、マウスCCケモカインの一つであるmacrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α)に注目し、Con A誘発肝障害における役割とその作用機序について検討した。 材 料 ・ 方 法 1. 7週齢の雌性BALB/cマウスに Con A (20 mg/kg)を、尾静脈より1回静注し、肝障害モデルを作成した。Con A投与8, 24時間後に下大静脈より採血し、血漿 alanine aminotransferase (ALT)値を酵素法にて測定した。また、Con A投与前, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24時間後の血漿MIP-1α値をELISA法にて測定した。 2. マウス抗MIP-1α抗体 (50 μg, 200 μg/ body)、またはラットIgG2b (200 μg/ body)をCon A(20 mg/ kg)投与30分前に1回静注し、Con A投与8, 24時間後の血漿ALT値を酵素法にて測定した。同様にCon A投与8時間後に肝臓を摘除固定し、Hematoxylin-Eosinで染色したのち病理学的変化について検討した。また、Con A投与24時間後のマウス死亡率を算出した。さらに、Con A投与2, 8, 24時間後の、血漿interferon-γ (IFN-γ)およびtumor necrosis factor-α (TNF-α)値をELISA法にて測定した。 3. マウスrecombinant MIP-1α (0.5 μg, 2 μg/ body)、または生理食塩水をCon A (15 mg/			

kg) 投与30分前に腹腔内投与し、Con A投与2, 8時間後の血漿IFN- γ , TNF- α 値および投与8時間後の血漿ALT値を測定した。

4. GdCl₃ (40 mg/ kg)、または生理食塩水をCon A (20 mg/ kg) 投与30分前に腹腔内投与し、Con A投与2時間後の血漿MIP-1 α 値および投与8時間後の血漿ALT値を測定した。

成 績

1. Con A 投与による血中 MIP-1 α 値の変化

Con A投与2時間後をピークとした一峰性の血漿MIP-1 α 値上昇が認められ、18時間後には投与前値に復した。

2. 抗MIP-1 α 抗体のCon A誘発肝障害に対する影響

抗MIP-1 α 抗体の前投与により、Con A投与8時間後の血漿ALT値は対照群に比較して用量依存性に低下した。また、高用量 (200 μ g) を前投与した場合、Con A投与24時間後の血漿ALT値も有意に低下した。Con A投与24時間までに、対照群では12匹中4匹 (33.3 %) が死亡したのに対し、抗体前投与群では全てのマウスが生存していた。病理組織学的検討では、抗体投与群で、肝細胞壊死の軽減を認めた。さらに、Con A投与8時間後の血漿IFN- γ 値、2時間および24時間後の血漿TNF- α 値は対照群に比較して有意に低下した。

3. recombinant MIP-1 α のCon A誘発肝障害に対する影響

recombinant MIP-1 α の前投与により、Con A投与8時間後の血漿ALT値は対照群に比較して用量依存性に増加した。また、recombinant MIP-1 α (2 μ g) の前投与により、Con A投与8時間後の血漿IFN- γ 値、2時間後の血漿TNF- α 値は対照群に比較して有意に増加した。

4. GdCl₃前投与後のCon A誘発肝障害に対する影響

GdCl₃の前投与により、Con A投与2時間後の血漿MIP-1 α 値ならびにCon A投与8時間後の血漿ALT値は、いずれも対照群に比較して有意に低下した。

考 案

今回の検討では、Con Aの単回投与により、肝障害の出現に先んじて血中MIP-1 α の増加が認められた。また抗MIP-1 α 抗体の前投与は、Con Aによる肝細胞障害を用量依存性に軽減し、死亡率を低下させた。これとは逆に、recombinant MIP-1 α の前投与は、Con Aによる血中ALT値上昇をより増強した。これらの結果は、内因性MIP-1 α が、Con A誘発肝障害の増悪因子として働くことを示唆している。

Con A誘発肝障害において、主にクッパー細胞から産生されるTNF- α と、リンパ球やnatural killer T細胞から産生されるIFN- γ が、肝障害の発症進展に重要な役割を果している。我々の検討では、抗MIP-1 α 抗体の前投与が、Con A投与後の血中TNF- α およびIFN- γ 上昇を抑制し、recombinant MIP-1 α の前投与は逆にこれらを増強した。この事実は、Con A投与により産生されたMIP-1 α が、TNF- α とIFN- γ の産生亢進を介して肝障害を進展させていくことを示している。ただし、Con Aによる血中ALT上昇や炎症性サイトカインの増加は、抗MIP-1 α の前投与により完全には抑制されない。MIP-1 α は、Con A投与により肝内で誘導される様々な因子の相互作用の中で、部分的に関与しているものと思われる。

マクロファージを選択的に失活させるGdCl₃の前投与により、Con A投与後の血中MIP-1 α およ

びALT値上昇が抑制されたことから、MIP-1 α は少なくともその一部が、クッパー細胞から産生されるものと考えられる。前述のようにMIP-1 α は単球・マクロファージ系の遊走活性化因子として知られているが、急性肺傷害の動物実験モデルやin vitroの検討において、MIP-1 α はマクロファージそのものから産生され、これらのautocrine activatorとして働くことが報告されている。Con A誘発肝障害においても、クッパー細胞が同様の役割を果たしているのかもしれない。最近、Con A投与後肝内で産生されるMIP-1 α によりCD4陽性Tリンパ球が活性化され、これらから産生されたIFN- γ が肝障害を増悪させることが報告された。我々の結果もこれを支持するが、上記のごとく、クッパー細胞およびそれから産生されるTNF- α を介した経路も重要な役割を果たしているものと思われる。

結 論

マウスCon A肝障害モデルにおいて、MIP-1 α は、少なくともその一部がクッパー細胞から産生され、TNF- α 、IFN- γ の産生亢進を介して、肝障害の発症進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

引用文献

1. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. J Clin Invest 1992;90:196-203.
2. Rollins BJ. Chemokines. Blood 1997;90:909-28
3. Nakamura K, Okada M, Yoneda M, Takamoto S, Nakade Y, Aso K et al. Macrophage inflammatory protein-2 induced by TNF- α plays a pivotal role in concanavalin A induced liver injury in mice. J Hepatol 2001;35:217-24.

参考文献

1. Nakamura K, Yokohama S, Yoneda M, Okamoto S, Tamaki Y, Ito T et al. High, but not low, molecular weight hyaluronan prevents T-cell-mediated liver injury by reducing proinflammatory cytokines in mice. J Gastroenterol 2004;39:346-54.
2. 岡本 聡、玉木陽穂、横浜 吏郎、岡田充巧、麻生和信、中村公英 他
Concanavalin A 誘発マウス肝障害モデルにおける内因性prostaglandin系の関与. 薬理と治療 2004;32:151-4.
3. 岡本 聡、玉木陽穂、伊藤 拓、横浜 吏郎、岡田充巧、麻生和信 他
Concanavalin A 誘発マウス肝障害モデルにおけるNSAIDsの効果. 薬理と治療 2002;30:369-72.
4. 岡本 聡、中村公英 胆嚢疾患（胆石症・胆嚢炎） 薬局2002年1月増刊号
病気と薬の説明ガイド2002 南山堂 2002;741-6.

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	岡本 聡
審査委員長 小 川 勝 洋 ㊞ 審査委員 葛 西 眞 一 ㊞ 審査委員 羽 田 勝 計 ㊞			
学 位 論 文 題 目 Macrophage inflammatory protein-1α plays a role in concanavalin A-induced liver injury through induction of proinflammatory cytokines in mice. (Concanavalin A 誘発マウス肝障害における Macrophage inflammatory Protein-1αの関与) Concanavalin A (ConA) により誘発するマウス肝炎は、ヒト急性肝炎のモデルとして知られている。このモデルでは、活性化 T リンパ球から生産されるインターフェロン (INF-γ) と腫瘍壊死因子 (TNF-α) が肝細胞障害に重要な働きをするとされているが、詳細なメカニズムは未だ不明である。一方、chemokine は、白血球の遊走化や活性化を促進する cytokine で、炎症やアレルギー反応に関与する。本研究者は ConA 誘発肝炎マウスでは早期から血清中に chemokine が上昇して好中球の遊走化と活性化に関与することを見出した。本研究では ConA 誘発マウス肝炎において chemokine の一つである macrophage inflammatory protein1α (MIP-1α) の役割を詳細に検討した。			

メス BALB/c マウスに 20 mg/Kg ConA を尾静脈から投与後、血清中の MIP-1 α を測定したところ、正常マウスでは陰性であったが、ConA 投与により上昇して 2 時間目でピークに達し、その後低下して 18 時間目までに陰性化した。ConA 投与により血中 ALT 値が上昇したが、ConA 投与 30 分前に抗 MIP-1 α 抗体を前投与することにより ALT 値の上昇が抑制され、病理組織学的にも肝壊死像が軽減した。また、抗 MIP-1 α 抗体前処理により、ConA 投与後の血清 TNF α 及び IFN- γ の上昇が抑制された。一方、ConA 投与後、recombinant MIP-1 α (rMIP-1) を投与したところ、rMIP-1 α 非投与群に比較して血清 ALT 値及び TNF α 、INF- γ が有意に上昇した。さらに、24 時間前に GdCl₃ で前処理して Kupffer 細胞を不活性化したのち ConA を投与したところ、血清 MIP-1 α 値が低下し、それに伴って血清 ALT 値も低下した。

以上の結果は、ConA 誘発マウス肝炎では MIP-1 α が TNF α 及び INF- γ の上昇に関与しており、また、Kupffer 細胞を不活性化することにより MIP-1 α の上昇が抑制されたことから、MIP-1 α は Kupffer 細胞により生産されることが明らかになった。

本研究は、ConA 誘発肝炎における MIP-1 α の役割を解析することによって劇症肝炎発症のメカニズムの一端を明らかにしたものであり、ヒト劇症肝炎の予防や治療に向けての貴重な知見をもたらした。また、本論文提出者は試問審査においても当該分野について十分な知識と経験を有することが確認され、本論文は学位論文としてふさわしいものと判定した。