

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:59～61.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題
肝臓における内因性抗菌物質発現プロファイルの解析

大竹孝明

11) 肝臓における内因性抗菌物質発現プロファイルの解析

研究代表者 大竹 孝明

[研究背景と目的]

現在、生体防御システムにおける内因性抗菌ペプチドの重要性が証明されている臓器は病原微生物暴露の多い消化管と皮膚領域である。しかし、肝臓も常に経門脈的または経胆道的に病原微生物や食物抗原の侵入、暴露の危険にさらされており、これら病原微生物、食物抗原の大循環への侵入阻止のために、特に肝の細網内皮系細胞の自然免疫機能が重要な役割と担っていると考えられている。実際に末期肝硬変ではこの機能低下と肝内シャントがあるため、しばしば bacterial translocation が起こり、致死的な特発性細菌性腹膜炎や敗血症の危険にさらされる。つまり感染防御において肝臓は腸管粘膜と同様に重要な臓器であり、生体防御機構の「最前線」である腸管に対して「セカンドライン」の役割を担っていると言える。

我々は肝臓における自然免疫エフェクター分子である内因性抗菌ペプチドの発現が肝の病態生理に重要な役割を担っているという仮説を立て、肝臓の自然免疫関連分子の発現を解析した。

[研究方法]

1. ヒト正常肝臓および肝細胞癌組織における微生物構成分子認識受容体 Toll-like receptor (TLR) の発現を RT-PCR 法で検討した。
2. 正常マウス肝臓における内因性抗菌ペプチド (AMP) の発現を RT-PCR 法と免疫組織化学染色法で検討した。

3. 健常人および肝疾患患者における血清中 pro-hepcidin 濃度に関して ELISA 法で検討した。
4. 高脂肪食負荷マウスまたはレプチン遺伝子欠損過食マウス (ob/ob) の脂肪肝モデルマウスにおいて AMP、TLR の自然免疫関連分子の発現の変化についてマイクロアレイを用いて検討した。

[研究成果と考察]

1. 肝組織における Toll-like receptor (TLR) 発現の検討

病原微生物構成分子認識受容体である TLR の発現に関してヒト肝細胞癌組織 (HCC) と正常肝組織で検討した。TLR3~8、10 の発現は認めしたが、TLR1、2、9 の発現は認めなかった (図 1)。また、マイクロアレイを用いた正常マウス肝組織での検討では細菌の構成分子である flagellin を認識する TLR5、一本鎖 RNA を認識する TLR8 の発現が高いことが明らかとなった。

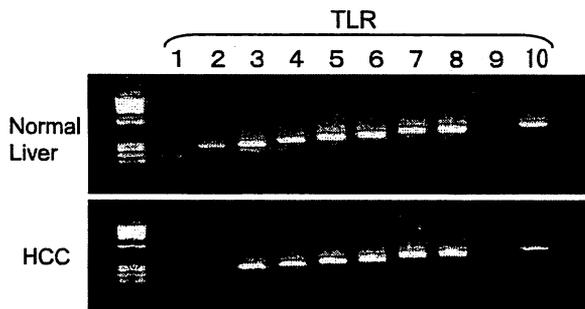


図 1 肝組織における Toll-like receptor の発現

2. 肝組織における内因性抗菌ペプチド (AMP) 発現の検討

正常マウス肝組織における自然免疫エフェクター分子 AMP の発現を RT-PCR で検討した。cathelicidin の cramp は RT-PCR では発現を認めず、鉄代謝調節因子でもある hepcidin に関しては hepcidin-1、-2 (hepc1、2) とともに発現を確認した (図 2)。AMP の蛋白発現を免疫組織化学染色法で検討したところ、cramp は肝組織中に存在する好中球に発現を認めるのみであったが、hepc1 は肝細胞の細胞質内に発現を確認した。また、マイクロアレイでの検討では α -defensin では腸管型 α -defensin の cryptdin-3、12 の発現が、 β -defensin では β -defensin-1、2 の発現が高いことが明らかとなった。

3. 血清中 pro-hepcidin の検討

AMP 発現と肝疾患の関係に関して、hepcidin の発現について検討した。hepcidin は鉄代謝調節因子でもあることから、健常人において血清中 pro-hepcidin 濃度は血清 ferritin 値と正の相関傾向を認めるが、様々な成因と進行度の慢性肝疾患において、血清 pro-hepcidin 濃度は血清 ferritin 値に関係なく発現低下傾向を認めた。特に成因に関係なく線維化の進行した肝硬変症で血清 pro-hepcidin は低下していた (図 3)。

4. 脂肪肝モデルマウスにおける自然免疫関連分子の発現の変化

高脂肪食負荷マウスまたは ob/ob マウスの脂肪肝モデルマウスにおいて TLR および AMP 等の自然免疫関連分子についてその発現をマイクロアレイを用いて検討した結果を示す (表 1)。高脂肪食負荷マウスの肝臓において TLR の発現の変化は認めないが、cryptdin 6、10、 β -defensin 3、4 の発現低下を認めた。ob/ob マウスにおいては flagellin を認識する TLR 5 の発現低下を認めた。また、エフェクター分子では cryptdin 3、5、13、 β -defensin 3、5、6 の発現が低下し、cryptdin 12 の発現が亢進していた。

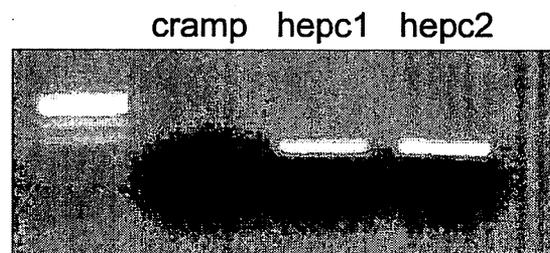


図 2 肝組織における内因性抗菌ペプチドの発現

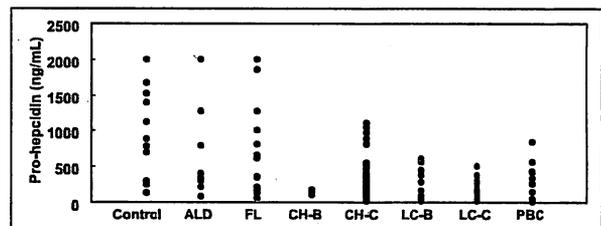


図 3 各種肝疾患における血清中 pro-hepcidin 濃度

Control : 健常人、ALD : アルコール性肝障害、FL : 非アルコール性脂肪肝、CH-B : B型慢性肝炎、CH-C : C型慢性肝炎、LC-B : B型肝硬変、LC-C : C型肝硬変、PBC : 原発性胆汁性肝硬変

表1 脂肪肝モデルマウスにおける自然免疫関連分子発現の変化

	Description	High fat diet-load mouse		ob/ob mouse	
		Log2Ratio(Ch1/Ch2)	Expression	Log2Ratio(Ch1/Ch2)	Expression
Recognition	Toll-like receptor	1	-0.79758482	-0.050601044	
		2	-0.606402068	0.837277119	
		3	-0.08038706		
		5	-0.012632066	-1.000678915	↓
		6	0.407303572	0.95857421	
		8	0.338955534	0.47424759	
		9		0.325568818	
Antimicrobial peptide	cryptdin	1	-0.533747062	-0.491156582	
		3	-0.14981761	-1.231967992	↓
		4	-0.655783421		
		5	-0.423784937	-1.732147588	↓
		6	-2.421301468		
		7	0.663896517	-0.021143851	
		10	-1.980484701	-0.376507749	
	12	0.160747163	2.178146582	↑	
	13		-1.077503018	↓	
	Beta defensin	1	0.07199301	0.283250378	
		2	-0.175805687	0.476347164	
		3	-1.032157471	-1.203457207	↓
		4	-1.693807355	0.480602846	
5			-1.162098425	↓	
6			-2.102881568	↓	
7		-0.928559539			
Hamp		0.595032482	0.945800454		

肝組織に微生物構成分子認識受容体である TLR3~8, 10 の発現およびエフェクター分子 AMP である α -defensin、 β -defensin、hepcidin が発現を認めることから、肝組織においても自然免疫機構が機能し、AMP が生体防御に重要な役割を担っていることが推察される。今回の検討では全肝組織における各遺伝子の発現を検討したが、今後は肝組織を構成する肝細胞、胆管細胞、類洞内皮細胞、各種類洞間質細胞の細胞分画別発現の検討が必要と考えられる。

肝疾患における自然免疫系の関与に関する検討では、肝疾患患者血清中 hepcidin の発現が肝障害度の進行に伴い低下する可能性が示唆された。このことから、肝障害の進展・重症度と自然免疫機能の障害の関連性が示唆された。今回検討した2つのマウス脂肪肝モデルでは TLR の発現変化はほとんど認めないが、AMP のいくつかの発現変化を認められた。全体に発現抑制となっており、脂肪肝における自然免疫の抑制が、腸管から bacterial translocation に対する肝障害感受性増大の原因になっている可能性が示唆された。

[まとめ]

本研究の知見は肝組織においても皮膚や腸管粘膜と同様に自然免疫系が重要な役割を担っていることが示された。さらに自然免疫系の変化が非アルコール性脂肪性肝疾患の病態や慢性肝疾患の重症度と深く関わっている可能性が示唆された。