

Title	Kupffer Cell-Mediated Downregulation of Rat Hepatic CMOAT/MRP 2 Gene Expression
Author(s)	中村, 順一
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41717">https://hdl.handle.net/11094/41717</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	なかむらじゅんいち 中村順一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第14519号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Kupffer Cell-Mediated Downregulation of Rat Hepatic CMOAT / MRP 2 Gene Expression (Kupffer細胞を介したビリルビン輸送担体 CMOAT / MRP 2 発現低下機構の研究)
論文審査委員	(主査) 教授 松田 暉  (副査) 教授 門田 守人 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

敗血症等の重症感染症では、肝内胆汁鬱滞に伴う黄疸を主徴とした肝障害が発症することが知られている。実験ではグラム陰性桿菌由来の Lipopolysaccharides (LPS) を生体に投与すると、胆汁分泌の減少、血中ビリルビンの上昇を来すことが報告されている。

ビリルビンの肝臓での代謝は、類洞側の細胞膜上にある輸送担体により肝細胞に取り込まれ、滑面小胞体でグルクロン酸抱合を受け胆管側の輸送担体より胆汁中に分泌される。ビリルビン輸送過程において胆管側の輸送が律速段階と考えられている。最近、胆管側の輸送担体である CMOAT / MRP 2 が同定され、LPS の生体内投与により CMOAT / MRP 2 の発現低下を来すことが報告された。

一方、肝細胞に LPS を投与しても肝障害は現れず、cytokines を投与すると肝障害が現れることから、cytokines が LPS による肝障害に重要な役割を果たしていると考えられる。肝臓では LPS 刺激により早期に Kupffer 細胞より TNF  $\alpha$ 、IL-1 等の cytokines が分泌され、これら cytokines の刺激伝達系には MAP kinase が関与している事が報告されている。しかし、LPS 刺激による CMOAT / MRP 2 の発現低下に対する Kupffer 細胞の関与は明らかでない。

本研究では Kupffer 細胞由来の cytokines により CMOAT / MRP 2 の発現低下がおきるという仮説のもとに、LPS 投与モデルラットを用いて CMOAT / MRP 2 の発現低下への Kupffer 細胞の関与について検討した。

#### 【方法】

Sprague - Dawley ラットに E. Coli 由来の LPS (1 mg/kg) を投与した敗血症モデルラットを作成した。

- 1) LPS 投与後の胆汁分泌量、血中ビリルビン濃度及び Northern Blotting による肝臓での CMOAT / MRP 2 の発現の経時的变化を検討した。
- 2) Kupffer 細胞抑制剤であるガドリニウム (Gd) をラットに前投与した後、LPS を投与し Kupffer 細胞の関与を検討した。次に *in vivo* では分離培養した Kupffer 細胞に LPS (300ng/ml) を加えた培養液 (conditioned medium) を肝細胞に加え CMOAT / MRP 2 の発現変化を検討した。また TNF  $\alpha$ 、IL-1 を加えた培養液、あるいは TNF  $\alpha$ 、IL-1  $\alpha$  の中和抗体を加えた conditioned medium を単離肝細胞に加え CMOAT / MRP 2 の

発現を検討した。

- 3) conditioned medium 投与時の肝細胞内の3種類のMAP kinases (ERK, JNK, p38MAPK)の活性化をkinase assayを用いて測定した。また、ERKとp38MAPK各々の阻害剤であるPD98059又はSB203580をconditioned mediumに加えて、CMOAT / MRP 2の発現量の変化を検討した。

#### 【成績】

- 1) LPS投与後約18時間をピークとして胆汁分泌量は減少、血中ビリルビン濃度は上昇しそれぞれ3-4日で回復した。CMOAT / MRP 2 mRNA発現は12時間をピークとして低下し48時間で回復した。
- 2) Gdを前投与したラットは前投与をしていないラットに比し、LPS投与後の胆汁分泌減少及びビリルビンの上昇は抑制され、CMOAT / MRP 2 mRNAの発現低下も抑制された。conditioned mediumによる肝細胞刺激でCMOAT / MRP 2 mRNAの発現低下を認め、これにTNF  $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ の中和抗体を加えるとIL-1  $\alpha$ の中和抗体でCMOAT / MRP 2 mRNAの発現回復を認めた。また、TNF  $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ 及びIL-1  $\beta$ の肝細胞刺激ではIL-1  $\alpha$ 刺激によりCMOAT / MRP 2 mRNAの強い発現低下が認められた。
- 3) conditioned mediumによる肝細胞刺激でERK, JNK, p38MAPKはいずれも活性化を示し、特にERKが最も強い活性化を示した。ERK抑制剤PD98059及びp38MAPK抑制剤SB203580を加えたconditioned mediumによる肝細胞刺激では、発現低下したCMOAT / MRP 2 mRNAの回復を認めた。

#### 【総括】

- 1) LPS投与による敗血症モデルラットを用い胆汁分泌量、血中ビリルビン濃度及びビリルビン特異的輸送担体CMOAT / MRP 2の発現とKupffer細胞由来のcytokinesとの関連性を検討した。
- 2) LPS投与により胆汁分泌の減少、血中ビリルビンの上昇、CMOAT / MRP 2の発現低下を認めた。
- 3) Kupffer細胞の不活性化により、LPS投与による胆汁分泌の減少、血中ビリルビンの上昇、CMOAT / MRP 2の発現低下が抑制された。
- 4) Kupffer細胞によるCMOAT / MRP 2の発現の調整にはcytokines特にIL-1の関与が認められ、この刺激は肝細胞内でMAP kinase、特にERKを経由することが示唆された。
- 5) 以上のことから重症敗血症時には、Kupffer細胞由来のcytokinesが肝細胞のMAP kinaseを介して胆管側のビリルビン特異的な輸送担体CMOAT / MRP 2の発現低下をもたらすことが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

敗血症等の重傷感染症の際、肝内胆汁鬱滞に伴う黄疸を主徴とした肝障害が発症することが知られている。最近、胆管側のビリルビンの輸送担体CMOAT / MRP 2が同定され、Dubin-Johnson症候群やそのモデルラットにおいてCMOAT / MRP 2の発現異常により黄疸が発症している事が解明された。しかし、敗血症においてCMOAT / MRP 2がいかなる動態をとるかについては明らかでない。

本研究は敗血症を想定したLipopolysaccharides (LPS)投与モデルラットを用い、Kupffer細胞から分泌されるサイトカインによるCMOAT / MRP 2発現量低下の黄疸発症に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

LPS投与によりラットの血中ビリルビン濃度の上昇、胆汁分泌量の減少、CMOAT / MRP 2発現量の低下を認めた。Kupffer細胞抑制剤であるガドリニウムを前投与する事により、LPS投与による血中ビリルビン濃度の上昇、胆汁分泌量の減少、CMOAT / MRP 2発現低下は抑制された。単離培養したKupffer細胞をLPSで刺激した培養液を単離肝細胞に加えると、CMOAT / MRP 2発現低下を認めた。LPSで刺激したKupffer細胞培養液をIL-1抗体で中和すると、CMOAT / MRP 2発現低下は抑制された。LPSで刺激したKupffer細胞培養液を肝細胞に加えると、MAPK (ERK, p38MAPK)の活性化を認めた。また、LPSで刺激したKupffer細胞培養液にERKまたはp38MAPK阻害剤を加えると、CMOAT / MRP 2発現低下は抑制された。

これらの結果は、LPS 刺激により Kupffer 細胞が活性化され、その結果 IL-1 が分泌され CMOAT / MRP 2 発現低下が生じること、及びこの細胞内情報伝達系に肝細胞内 MAPK が関与する事を示すもので、敗血症時の高ビリルビン血症の発症機序解明における新しい知見であり、学位に値すると思われる。