



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Liver injury induced by lipopolysaccharide is mediated by TNFR-1 but not by TNFR-2 or Fas in mice

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 清水, 省吾 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/14867">http://hdl.handle.net/20.500.12099/14867</a>

氏名(本籍)	清水省吾(岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙第 1406 号
学位授与日付	平成 17 年 7 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Liver injury induced by lipopolysaccharide is mediated by TNFR-1 but not by TNFR-2 or Fas in mice
審査委員	(主査) 教授 森 脇 久 隆 (副査) 教授 清 島 満 教授 中 島 茂

## 論文内容の要旨

### 目的

エンドトキシン血症は主としてlipopolysaccharide (LPS) により誘導され、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ などの各種サイトカインを介して肝細胞アポトーシスを惹起する。このアポトーシスがTNF- $\alpha$ もしくはFas ligand (FasL) 単独で誘導されるのか、それとも両者を必要とするのかは不明である。またTNF- $\alpha$ のシグナル伝達は一般にTNF receptor-1 (TNFR-1) を介するものとみなされてきたが、近年、concanavalin A肝障害モデルにおける肝細胞のアポトーシスには、TNF receptor-2 (TNFR-2) によるシグナル伝達に関与していると報告されている。

今回、我々はLPSにより引き起こされる肝細胞アポトーシスが、TNF- $\alpha$ のみによって生じているのかどうか、さらにTNF receptor-1 knockout (TNFR-1 KO) マウスとTNF receptor-2 knockout (TNFR-2 KO) マウスを用いて、どちらのTNF receptor (TNFR) が関与しているかを検討した。

### 方法

- (1) エンドトキシン血症での肝障害を確認するために、wild type (WT)マウス、TNFR-1 KO マウス、TNFR-2 KO マウスにLPSを10  $\mu$ g, 20  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g/body腹腔内投与し、血清ALT活性の経時的変化と肝組織像を検討した。
- (2) LPS投与後の肝細胞アポトーシスを確認するため、TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase nick end-labeling) 染色を行い、陽性細胞数を検討した。
- (3) LPS投与後の血清サイトカイン (TNF- $\alpha$ , interleukin(IL)-6, IL-10, interferon(IFN)- $\gamma$ ) 濃度と肝組織中のTNF- $\alpha$ 濃度をELISA法にて測定した。
- (4) 肝組織中でのmRNA発現をRNase protection assayで、またタンパク発現をWestern blot法で検討した。
- (5) TNFR下流に存在するアポトーシス関連分子のmRNAの発現をRNase protection assayで検討した。

### 結果

- (1) 血清ALT活性はWTマウス、TNFR-2 KOマウスでLPS投与後3時間をピークに量依存性に上昇したが、TNFR-1 KOマウスでは有意な上昇を認めなかった ( $P < 0.05$ )。肝の組織学的所見ではWTマウス、TNFR-2 KOマウスにリンパ球浸潤とspottyな肝細胞壊死を認めたが、TNFR-1 KOマウスではminimal changeのみであった。またWTマウス、TNFR-1 KOマウス、TNFR-2 KOマウスはいずれも死亡しなかった。
- (2) TUNEL陽性細胞数はWTマウス、TNFR-2 KO マウスでLPS投与1時間後に増加し始め、3~5時間でピークの約8%に到達した。一方、TNFR-1 KO マウスではわずかしか見られなかった ( $P < 0.05$ )。
- (3) 3種類すべてのマウスで血清TNF- $\alpha$ は1時間後にピークを示し、2時間後に正常化した。IL-6はLPS投与後0.5時間で発現、4時間でピークに達した。IL-10はすべてのマウスで1時間にピークを迎え、その後減少した。IFN- $\gamma$ はWTマウスとTNFR-2 KO マウスでは3~5時間まで上昇を続け、TNFR-1 KO マウスでは3時

間に一過性のピークを迎えた。また肝組織中TNF- $\alpha$ は、すべてのマウスで1時間にピークを迎え5時間後には正常化した。これら、各種血清サイトカイン、肝組織内TNF- $\alpha$ の経時的変化について、WTマウス、TNFR-2 KO マウス、TNFR-1 KO マウスの間に有意な差を認めなかった。

- (4) 肝組織中TNFR-1 mRNAはLPS投与後3時間でWTマウスとTNFR-2 KO マウスでのみ誘導され、TNFR-1 KO マウスではみられなかった。3種類すべてのマウスでFas mRNAが誘導されたが、FasLの誘導はみられなかった。肝組織中Fas、FasLのWestern blotも同様の結果を示した。
- (5) WTマウスとTNFR-2 KOマウスではLPS投与後3-5時間のbcl-Xの発現がみられたが、TNFR-1 KOマウスではみられなかった。

## 考案

TNFR-1はdeath domain (TRADD) を有し、caspaseの活性化、アポトーシスに至るが、一方、TNFR-2はこのようなdeath domainを持たない。対照的にTNFR-1とTNFR-2は共にTRAF2 (TNFR-associating factor-2) 結合部位をもち、NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase) とproinflammatory signaling pathwayの発現につながる。したがってアポトーシスの誘導にはTNFR-1シグナルが優位を占める一方、炎症過程には両方のTNF受容体が寄与している。しかしながら最近の報告では、TNFR-2も炎症細胞のアポトーシスにシグナルを送ることができることから、より複雑なシグナルパターンが提言されている。すなわち膜貫通性TNF- $\alpha$ がTNFR-2のligand、分泌性TNF- $\alpha$ がTNFR-1のligandであるが、膜貫通性TNF- $\alpha$ がD-galactosamine/LPSや、concanavalin Aによる肝障害モデルでの肝細胞アポトーシス・壊死に重要な役割を果たすことが報告されている。我々のエンドトキシン血症を用いた実験では、WT、TNFR-1 KO、TNFR-2 KOマウスで血清、肝TNF- $\alpha$ が同様の動態を示したにもかかわらず、WTマウス、TNFR-2 KO マウスのみで肝細胞アポトーシスが見られた。

このことからLPSによる肝細胞アポトーシスはTNFR-1を介するTNF- $\alpha$ シグナルによるものと考えられた。またLPSによるアポトーシスはFasを介すると多くの研究で報告されている。本研究ではFas mRNAは3種類のマウスいずれの肝臓でもLPS投与後同様に上昇したが、FasLはいずれも誘導されなかった。以上より本エンドトキシン血症モデルでの肝細胞アポトーシスについてはFas-FasLシステムは関与していないことが示唆された。

## 結語

LPSによる肝細胞アポトーシスはTNFR-1を介した分泌型TNF- $\alpha$ シグナルの結果生じる。本モデルでFasやTNFR-2は肝障害に重要な役割を果たしていない。エンドトキシン血症でTNF- $\alpha$ は、TNFR-1を介するシグナル伝達により肝障害に主な役割を発揮する。

## 論文審査の結果の要旨

申請者 清水省吾は、LPSによる肝細胞アポトーシスはTNFR-1を介した分泌型TNF- $\alpha$ シグナルの結果生じることを、ノックアウトマウスを用いた実験により明らかにした。さらに、Fas mRNAは3種類のマウスいずれの肝臓でもLPS投与後同様に上昇したが、FasLはいずれも誘導されなかった事実を示した。エンドトキシン血症でTNF- $\alpha$ は、TNFR-1を介するシグナル伝達により肝障害の誘導に主な役割を発揮することを明確にした。本研究の成果は、消化器病学、肝臓学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Liver injury induced by lipopolysaccharide is mediated by TNFR-1 but not by TNFR-2 or Fas in mice

Hepatology Research 31, 136-142 (2005).