

令和三年度博士論文

Nucling is important for the maintenance of Kupffer cells.
ヌクリングと肝臓におけるクッパー細胞の維持
に関する研究

林 文琳

令和三年度博士論文

Nucling is important for the maintenance of Kupffer cells.
ヌクリングと肝臓におけるクッパー細胞の維持
に関する研究

林 文琳

指導教員 坂井隆志

目次

1	ABSTRACT	1
2	序言	2
3	材料と方法	5
3.1	動物と食事	5
3.2	クッパー細胞の分離と移植	5
3.3	食食能評価蛍光試験	5
3.4	ゲノム PCR	6
3.5	リアルタイム RT-PCR	7
3.6	フローサイトメトリー	8
3.7	免疫組織化学(IHC)染色	8
3.8	塩化ガドリニウム (GdCl ₃) 処理	9
3.9	LPS および PMA 処理	9
3.10	TNF α の測定	9
3.11	細胞死検出	10
3.12	統計分析	10
4	結果	11
4.1	KCs を腹腔投与されたヌクリング KO マウス肝でドナー由来の KCs を確認	11
4.2	移植 KCs の定着率の検討	11
4.3	腹腔投与された KCs が肝臓に移動することを WT マウスで確認	12
4.4	移植前および移植後のマウス肝臓から調製された KCs の評価	12
4.5	I. P. 投与 10 日後の移植 EGFP-KCs の移動率の推定	13
4.6	KCs 移植は肝臓 KCs のアポトーシスを誘発した	14
5	討論	16
6	謝辞	20
7	図	21
8	参考文献	33

1 ABSTRACT

Nucling is known as a regulator of several apoptosis pathways including NF- κ B signal. However, its physiological function is still unclear. We previously observed the decrease of Kupffer cells (KCs), residential macrophages in the liver, spontaneously in Nucling deficient mouse. Here we show the importance of Nucling in the maintenance of KCs distribution. We, at first, established the method of transplantation of KCs by intraperitoneal (i.p.) injection using PKH26 labeling cells, EGFP expressing cells (EGFP-KCs), and normal KCs. We demonstrated that KCs migrate to the liver following their i.p. injection. Engraftment in the liver was not observed for peritoneal macrophages (pMP). This suggests a sorting mechanism for KCs to migrate to the liver. In WT mice, KC injection decreased KCs in 24h and then recovered it in 10 days to the normal level. Also, the recovery to the normal level by KCs injection was observed in the mouse with KCs depletion introduced by GdCl₃. These results suggest the presence of a regulatory mechanism for controlling the number of KCs. Comparing to WT mice, KCs distribution was not strictly regulated in Nucling-KO mice after KCs transplantation. These results suggest the importance of Nucling to maintain KCs population.

2 序言

クッパー細胞 (KCs, 肝在住マクロファージ)

マクロファージは免疫応答において重要な役割を果たしている。例えば、リンパ球の活性化と増殖の制御や、抗原や感作された細胞による T リンパ球、B リンパ球の活性化プロセスに関与している。また反対に、活性化されたリンパ球によりマクロファージの活性化が誘導される¹。クッパー細胞 (Kupffer Cells; KCs) は、肝臓に存在する組織マクロファージである。食作用能力が高く、ウイルスや細菌などの異物やアポトーシス細胞を取り除く働きを有する。すなわち KCs は自然免疫応答のゲートキーパーとして重要な役割を果たしている²。KCs は門脈系から効率的に肝臓に侵入して肝類洞に定着する。さらに類洞内皮細胞に沿って移動できるため、効率的に外来抗原を取り除くことができる³。KCs は肝細胞の 5%~15%、組織マクロファージ全体の 80% を占めている。また KCs の起源は不明な点が多いが、少なくとも骨髄と卵黄嚢の 2 つの組織に由来する異なる系統が混在していること分かっている⁴⁻⁷。KCs は組織の損傷と修復においても主要な役割を担っている。KCs はサイトカイン (TNF- α など)、プロスタグランジン、活性酸素種などの炎症性メディエーターを、NADPH オキシダーゼや iNOS によって産生している^{8, 9}。また KCs の機能不全は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症に寄与することが報告されている¹⁰⁻¹¹。しかし、肝臓の代謝調節や代謝性疾患の病態形成における KCs の役割についての報告は少ない¹²。

マクロファージ移植法

KCs の肝臓への移植と生着率向上により、肝免疫 (微生物のクリアランス、抗原提示、組織の炎症あるいは修復等) における KCs の役割の解明が可能になるだろう^{5, 6, 13}。Simone らは KCs 移植による細胞療法や遺伝子治療へ

の応用の可能性を報告している⁷。これまでに報告されている KCs 移植法は門脈注射と静脈注射によるものであった^{7, 14, 15}。門脈注射は肝への移植としては最も信頼できるが、開腹によるアプローチが必要であるため侵襲性が高く、また高いスキルが要求される。一方、静脈注射による KCs 移植法は体循環系を經由して肝臓に達するため、移動中に様々な抗原や刺激物質と出会う可能性がある。今回、私達は新たな KCs 移植法として腹腔内注射 (i. p.) による投与を検討した。操作は門脈注射法よりも簡便で侵襲性も低く、また静脈注射法よりも速やかに肝臓に到達することが想定された。ラットの肝移植実験において、前処理として KCs の i. p. 投与を施すと、肝障害が軽減し移植肝の免疫耐性が高まったと報告されている¹⁶。ただしこの報告を含め i. p. 投与された KCs の体内における動態や肝臓への定着過程を詳細に検討した報告は無い。本研究では、腹腔内に投与された KCs が生理活性を維持したまま肝臓に移動し定着することを初めて明らかにした。

ヌクリング

新規 NF- κ B 制御分子ヌクリング (Nucling) は、アポトーシス誘導活性を有する分子である。種々のアポトーシスシグナルがヌクリング遺伝子発現を誘導する。ヌクリングによるアポトーシス誘導は複数の経路を介していることが明らかとなっている。①ミトコンドリアからのシトクロム C の放出を誘導する。シトクロム C は細胞質において、内因性アポトーシス誘導経路である Apaf-1/procaspase-9 複合体の形成を促進する。②抗アポトーシス分子ガレクチン-3 の発現を抑制することによりアポトーシスを促進する¹⁷⁻¹⁹。③NF- κ B の活性化を負に制御している。NF- κ B は転写因子として複数の抗アポトーシス分子の発現を制御しているため、その抑制はアポトーシス経路の活性化を引き起こす。

ヌクリングは心臓や肝臓で強い発現が認められる。しかしその生理学的機能はいまだ不明な点が多い。ヌクリング遺伝子欠失 (KO) マウスでは KCs が著減している一方、他の単球・マクロファージ系の細胞に異常は確認されていない。また NK 細胞も肝臓においてのみ著減しており、肝臓特異的な異常と考えられる。さらにヌクリング KO マウスでは、生後 1 年を経過した頃から肝機能障害や非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD)、肝臓の発症率が上昇する。これらの事実はヌクリングが肝臓のメンテナンス機構に重要な働きを担っていることを強く示唆している。

ヌクリング KO マウスにおける KCs の減少のメカニズムを明らかにすることにより、ヌクリングの生理学的機能の解明が期待される。そこで、KCs 移植実験を行うことにした。そのための簡便で有効な KCs 移植方法を確立した。本研究では、腹腔注射による新規 KCs 移植方法を実施した。貪食細胞標識トレーサーや緑色蛍光タンパク質 (EGFP) トランスジェニックマウスから調製した KCs (EGFP-KCs) などを使用して、腹腔内投与された KCs の動態を調べることで、この新規移植法の有用性を明らかにした。

3 材料と方法

3.1 動物と食事

野生型 (WT) マウス (C57BL/6J ; 対照用 3 ~ 5 匹、移植用 3 匹) と、同系統を遺伝的背景に持つヌクリング KO マウス (6 ~ 8 週齢) (対照用 4 匹、移植用 3 匹) を使用した。緑色蛍光遺伝子 (EGFP) トランスジェニックマウス (C57BL/6N 背景) は、熊本大学動物資源開発センター (CARD) から供与された。マウスは食餌 (通常食 Normal Chow Diet (NCD) : 54.4%CHO、23.6%タンパク質、5.3%脂肪) と水を常時供給にて飼育。飼育室内は 12 時間の明暗サイクルで一定の環境条件を維持。すべての動物実験は、徳島文理大学の実験動物取扱ガイドラインに従って実施した。

3.2 クッパー細胞の分離と移植

KCs は、Liver dissociation キット (MACS、米国) と MS カラム (MACS、米国) を使用して、マウス (7 週齢) の肝臓から単離した。腹腔マクロファージ (pMP) は同マウスより Avijit Ray と Bonnie N. Dittel の方法²⁰ を用いて単離した。1 匹のマウスから単離された全細胞を腹腔注射によってレシピエントマウスに投与した。投与した細胞の平均数はマウス 1 匹あたり 6.3×10^5 であった。対照群には細胞を含まない PBS を投与した。10 日後、移植マウスより KCs, pMP を回収し実験に用いた。

3.3 貪食能評価蛍光試験

単離された KCs および pMP は、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich、米国) を使用して、貪食能を検証した。蛍光標識処理された細胞を腹腔注射でレシピエントマウスに投与した。10 日後、KCs と pMP を回収し、蛍光顕微鏡 (Nikon、日本) を用いて観察・分析した。

3.4 ゲノム PCR

KCs からゲノム DNA を抽出した。抽出方法：抽出バッファー（10 mM Tris-HCl、0.1 M EDTA、0.5% SDS）および Proteinase K（0.2mg / ml、和光、日本）に KCs を懸濁後、50°C で 2~3 時間処理した。フェノールを含む TE 緩衝液（10mM Tris-HCl, pH7.5、1 mM EDTA）を加え、ゆっくりと転倒混和した後、1,200×g で 2 分間遠心分離した。上清を回収してクロロホルム/イソamilアルコール（24 : 1）混和後を等量加え、30 分間ゆっくり転倒混和した。溶液を 1,200×g で 2 分間遠心分離した後、上清を回収して 1/10 量の 3M CH₃COONa (pH 6.0) 及び 2 倍量のエタノールと混合した。溶液を 1,000×g で 10 分間遠心分離した後、上清を捨てた。DNA ペレットを 70%エタノールで洗浄し、半乾燥させた後、TE バッファーで溶解した。1 ng のゲノム DNA を DNA ポリメラーゼ（KODFX Neo : TOYOBO、日本）を含む PCR 反応液のテンプレートとして使用した。PCR 反応：94°C で 2 分（変性）、98°C で 10 秒間、62°C で 30 秒間、68°C で 120 秒/ kb を 35 サイクル（PCR サイクル）、68°C で 7 分間（伸長反応）。PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動で展開させた。WT マウス判別用のプライマー配列は、5'-TCCTCTACCTCATCTATGTGTACC-3'（Forward）及び 5'-TATCTCTGTGTTGCCTCCGAA-3'（Reverse）。ヌクリングマウス判別用のプライマー配列は、5'-CCGGTGGATATAGAATGTGTGCGAGG-3'（Forward）および 5'-CTCCGCGTATCTCTGTGTTGCCTCCGA-3'（Reverse）（Eurofins、日本）。

3.5 リアルタイム RT-PCR

マウスに塩化ガドリニウム ($GdCl_3$ 、和光、日本; 15mg / ml) (対照マウスは生理食塩水) を投与し、24 時間後、さらに KCs (対照マウスは生理食塩水) を投与した。24 時間後に肝臓を回収し、液体窒素で急速凍結。Trizol Reagent (Sigma-Aldrich、米国) を用いて total RNA を回収した。RNA の収量及び純度は JASCO V-630 Bio spectrophotometer (JASCO, 日本) を用いて測定した。Prime Script RT Master Mix (タカラ、日本) を使用して、1 μ g のトータル RNA を逆転写することにより cDNA を調製した。リアルタイム PCR は、7300 RT-PCR システム (Applied Biosystems、米国) と SYBR Premix Ex Taq II (タカラ、日本) を使用して実施した。すべてのサンプルは、単一の 96 ウェル反応プレート (FALCON、米国) で 2 回実行した。サーマルサイクリング条件は、95°C で 30 秒間、続いて 95°C で 5 秒間、61°C で 31 秒間を 40 サイクルで実行した。各遺伝子の発現は GAPDH mRNA に対して正規化され、比較サイクル閾値法 ($\Delta \Delta Ct$) を使用してベースラインコントロールと比較して計算した。プライマー配列を Table 1 に示す。

Table 1

遺伝子名		プライマー配列
GAPDH	Forward	5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
	Reverse	5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
TNF α	Forward	5' -CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
	Reverse	5' -TTGAGTTCCATGCCGTTG-3'
IL-1 β	Forward	5' -TGTAATGAAAGACGGCACACC-3'
	Reverse	5' -TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3'
IL-6	Forward	5' -CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3'

	Reverse	5' -CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTTC-3'
--	---------	-----------------------------------

3.6 フローサイトメトリー

EGFP マウス由来の KCs (EGFP-KC) を WT および KO マウスに腹腔投与した。10 日後、liver dissociation キットと MS カラムを使用して KCs を分離し、フローサイトメトリー分析 (FACs) を行った。細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定し、400×g で 10 分間遠心沈降させることによりバッファーを除去した。細胞ペレットを 10%FBS および 1%アジ化ナトリウム (NaN₃、和光、日本) を含む 100 μl の冷 PBS で懸濁し、再度 400×g で 10 分間遠心沈降させた。必要に応じて、3%BSA を含む抗 F4/80 抗体 (終濃度 10 μg / ml、Sigma、米国) に懸濁して 4°C で 1 時間反応した。次に細胞を 5%FBS および 20mM の NaN₃ 含有冷 PBS で 3 回洗浄し、二次抗体 (蛍光 (Alexa fluor 594) 標識抗ラット IgG) と反応 (4°C、1 時間) した。その後、洗浄ステップを 3 回繰り返した。細胞死検出用試料にヨウ化プロピジウム (PI) (2 μg / ml) を加えた。フローサイトメーター (Guava® easyCyte™, Luminex, 米国) で測定した。

3.7 免疫組織化学(IHC)染色

冷 PBS で灌流したマウスの肝臓を 4%パラホルムアルデヒドで 4°C で 2 時間固定後 PBS で洗浄し、10%スクロースで 2 時間、続いて 20%スクロースで 2 時間、次に 30%スクロースで 4°C で一晩ゆっくりと振とうした。次に、組織を OCT コンパウンド (Tissue-Tek®, MILES、米国) 中で、ドライアイスを含む 100%エタノールで急速冷凍し、-80°C で保存した。5 μm の凍結切片をクリオスタット (Leica biosystem、ドイツ) を用いて作製した。5%FBS を含む PBS 中で室温、45 分間ブロッキングした後、ラット抗マウス F4/80 抗体

(Sigma、米国) で 37°C で 30 分間インキュベートした。二次抗体として Alexa fluor594 または 488 標識抗ラット IgG 抗体 (ブロッキング溶液で 400 倍希釈) と 37°C で 30 分間反応した。作成したスライド標本を BZ-X710 蛍光顕微鏡 (Keyence、日本) を使用して観察・画像のデータ化を行った。

3.8 塩化ガドリニウム (GdCl₃) 処理

GdCl₃ を腹腔投与 (投与量=15μg/体重 (g) ; 最終濃度は一匹当たり 15mg/kg) した WT マウス (n = 4) に KCs を移植した。生理食塩水 (投与した GdCl₃ と等量) を注射したマウス (n=3) を対照マウスとした。24 時間後、KCs を回収した。

3.9 LPS および PMA 処理

マウス一匹から KCs を回収後、DMEM/10% FBS 培地中に播種し、24 時間後、リポ多糖 (LPS) 2μg / ウェル (24 well-plate、FALCON、米国) または PMA (ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート) (Sigma、米国) (Sigma Chemical) 0.4 μg / ウェル入りの培地に交換し、24 時間培養した。グループごとに 3 匹のマウスを使用した。

3.10 TNFα の測定

LPS または PMA 処理 (3.9 参照) 後に培地を回収した。マウス TNFα 用 Quantikine ELISA キット (フナコシ、日本) を用いて TNFα 濃度を測定した。

3.11 細胞死検出

細胞を LPS または PMA 処理後、RIPA バッファーにて溶解・抽出した。細胞死は、細胞死検出キット (Sigma、米国) を使用し、マイクロプレートリーダー (BERTHOLD、ドイツ) にて測定した。実験グループごとに 3 匹のマウスを使用した。

3.12 統計分析

すべての実験は triplicate で行い、結果は平均値±標準誤差で表した。統計比較方法は、分散解析を行った後にスチューデント T 検定を用いて行った。結果 (P 値) が、0.05 未満の場合を有意差有りとした。

4 結果

4.1 KCs を腹腔投与されたヌクリング KO マウス肝でドナー由来の KCs を確認

KCs が腹腔内から肝臓に移動できるかどうかを検討した。WT マウスの肝臓から KCs を調製し、i. p. 注射によりヌクリング KO マウスに投与した。10 日後、移植されたマウスの肝臓から KCs を回収した。移植した KCs のマーカーとして、ヌクリング遺伝子のエクソンを PCR 法を用いて検出した。ゲノム PCR により、移植された KCs (WT マウス由来) がヌクリング KO マウスの肝臓に移動することが明らかになった (図 1A)。この結果から、KCs は i. p. 投与によって肝臓に移植可能であると結論付けた。

4.2 移植 KCs の定着率の検討

次に、i. p. 投与法で移植された KCs の肝臓への定着率を調べた。WT マウスから KCs および比較対照として pMP を調製した。細胞を蛍光色素 PKH26red で標識し、i. p. 投与によりヌクリング KO マウスに移植した。10 日後、移植されたマウスから KCs と pMP を収集し、蛍光顕微鏡で細胞を観察し、標識細胞の数を数えた。その結果、pMP 投与群の肝臓から蛍光標識細胞数は $100 \mu\text{l}$ の細胞溶液あたり平均で 1.0 細胞検出された。一方、腹腔内においては 243.2 個の細胞が検出された。つまり接種された pMP のほとんどは腹腔内にとどまっていた (0.004%; 243.2 個 vs 1.0 個/ $100 \mu\text{l}$; $p < 0.01$)。次の KCs 投与群を検討したところ、KCs 投与群の肝臓からの細胞調製液 $100 \mu\text{l}$ 中、平均 7.0 個の細胞が検出された。腹腔細胞調製液では 59.7 個の細胞が検出された (KCs の肝臓定着率は約 11.7%; 59.7 細胞 vs 7.0 細胞/ $100 \mu\text{l}$; $p < 0.01$)。これらの結果は、KCs には腹腔から選択的に肝臓へ移動・定着する能力が備わっており、これは pMP にはない機能であるということを示している (図 1B)。

4.3 腹腔投与された KCs が肝臓に移動することを WT マウスで確認

WT マウスから単離した KCs (WT-KCs) を i. p. 投与後のマウス肝における KCs の数と分布を確認するために、F4/80 抗体を使用して免疫組織化学染色を実施した。予想通り、F4/80 陽性細胞は KCs 移植後のヌクリング KO マウス肝で有意に増加していた (図 2A、B)。一方、WT マウスでは KCs 投与後の KCs 数の上昇は観察されなかった。この結果は、以下のような可能性を示唆している。

- ① 投与された KCs の肝臓への移動は、ヌクリング KO マウスへの移植では特異的または高効率に発生し、WT マウスへの移植ではそれが何らかの理由により阻害されている。
- ② KCs 集団を一定数に維持するための調節メカニズムがあり、その機構がヌクリング KO マウスでは障害されている。

①の可能性を検討するために、WT マウスへ投与された KCs の肝臓への移動を確認した。移植用 KCs として EGFP-KCs を用意した。FACs (図 3A、B) および免疫組織化学的分析 (図 3C) によって、WT マウスに投与された KCs の肝臓への移動を確認した。ドナー-KCs の半分が腹腔から肝臓に移動したと推定された。したがって、腹腔投与された KCs の肝臓への移動は WT マウスにおいても妨げられないと結論付けた。従って、ヌクリング KO マウスでは KC 集団の調節機構に問題があるという仮説を検討することにした。

4.4 移植前および移植後のマウス肝臓から調製された KCs の評価

移植前後の KCs に占める損傷細胞の割合を、PI 染色を用いた FACs によって検証した (図 4)。単離した移植前 EGFP-KCs の $15.3 \pm 0.3\%$ を PI 陽性細胞が占めていた。また、EGFP^{high} 細胞は約 17%、F4 / 80^{high}

細胞は約 13% だった (図 5)。その EGFP^{high} 細胞の約 70% が PI 陽性であった。I. p. 投与にはマウス一匹あたり平均 6.3×10^5 個の KCs を使用したので、機能的な KCs の数は約 5.4×10^4 個と推定される。

WT マウスから単離した KCs は、EGFP-KCs より PI 陽性細胞が多かった (32.3% 対 15.7%、図 4)。これは遺伝的背景の違いに由来している可能性がある。ヌクリング KO マウスにおける KCs の PI 陽性率は EGFP-KCs とほぼ同レベルであった (図 4)。WT マウスへの EGFP-KCs 投与は、移植後再分離された KCs の PI 陽性細胞を最大 18% 減少させた (図 4)。一方、ヌクリング KO マウスへの EGFP-KCs 投与は、PI 陽性細胞を最大 23% 増加させた (図 4)。ヌクリング KO マウスから調整した KCs は WT-KCs よりも LPS 刺激に過敏だった (図 6)。さらに、KCs 移植ヌクリング KO マウスから再単離された KCs は、WT-KCs よりも LPS に対してはるかに感受性が高かった (図 6)。興味深いことに、TNF α の発現量は、移植後に再単離された KCs で抑制されていた (図 6B)。

4.5 I. p. 投与 10 日後の移植 EGFP-KCs の移動率の推定

FACs による解析の結果、EGFP-KCs 移植マウス肝の KCs の ~2% を EGFP-陽性細胞が占めた (図 5)。一方、無損傷 (PI 陰性) の EGFP 陽性細胞は EGFP マウス由来の KCs の ~4% を占めていた (図 4)。一匹のマウスから単離された全 KCs を移植用マウスに投与した。したがって、無損傷の投与された KCs のほぼ半分が腹腔から肝臓に移動したと推定された。

4.6 KCs 移植は肝臓 KCs のアポトーシスを誘発した

移植された KCs に対するヌクリング遺伝子欠損背景の影響を確認するために、塩化ガドリニウム ($GdCl_3$) 処理を施した WT およびヌクリング KO マウスをレシピエントマウスとして使用した。 $GdCl_3$ は、KCs を枯渇させ、KCs の活性化を阻害することが知られている。興味深いことに、移植した KCs の $GdCl_3$ 未処理マウスへの移植実験では、WT マウスとヌクリング KO マウスの両方で投与 24 時間後の肝 KCs の数が減少した (図 7A (1) 対 (2)、(5) 対 (6))。対照的に、 $GdCl_3$ 処理マウスへの KCs の移植では、WT マウスとヌクリング KO マウスの両方で KCs の数が正常レベルまで回復した (図 7A (4) と (8))。さらに、炎症性サイトカイン ($TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、および $IL-6$) は、KCs 移植後の対照マウス ($GdCl_3$ 未処理の WT および KO マウス) の KCs で発現が上昇した。これは、KCs の活性化を意味すると考えられる (図 7B (2)、(6))。サイトカインの発現誘導は、 $GdCl_3$ 処理マウスでは観察されなかった (図 7B (4)、(8))。一方、TUNEL 法 (in situ アポトーシス検出キット、タカラ、日本) で移植 KCs のアポトーシスを調べた。KCs 投与 10 日後、F4/80 陽性細胞はヌクリング KO 肝で増加したが、WT 肝では増加しなかった (図 8)。しかし、TUNEL 陽性細胞数はそれらの間で有意差はなかった (図 8)。これらのデータから、移植された KCs が KCs アポトーシスを誘導し、また KCs の活性化にレシピエントの KCs が寄与していることを示唆している。 $GdCl_3$ 処理によって KO マウスの KCs の約半分が枯渇 (PBS/ $GdCl_3$ (7)) した後、KCs の移植により (WT-KC/ $GdCl_3$ (8))、KCs 数がヌクリング KO マウスの正常レベル (PBS/PBS (5)) に回復した (図 7A)。一方、 $GdCl_3$ で処理した WT マウスでは、KCs 移植によりヌクリング KO マウスよりも効率的に KCs の数が回復した。つまり WT マウスの通常 KCs 数 (PBS/PBS (1)) よりも、 $GdCl_3$ で処理した WT マウスの方が有意に多くの KCs が肝臓で確

認された (WT-KC/GdCl₃ (4))。ヌクリング KO マウスとは対照的に、KC の数は GdCl₃ 処理によって WT マウスでわずかに減少した (PBS/GdCl₃ (3) 対 PBS/PBS (1))。KCs 移植後 24 時間では WT およびヌクリング KO マウスの両方で KCs が減少した (WT-KC/PBS 対 PBS/PBS) (図 7A)。また、炎症性サイトカイン (TNF α 、IL1 β 、IL-6) の発現誘導は GdCl₃ 処理マウスへの KCs 移植実験では観察されなかった (図 7B (4) および (8))。この結果は、移植された KCs がレシピエントの KCs と相互作用することにより KCs の枯渇および活性化を引き起こしたことを強く示唆している。

5 討論

一般に、KCs 移植実験は門脈または尾静脈を介して行われてきた。これら従来の方法は信頼性が高く、肝臓への高い定着率を得ることができる⁷。ただし、これらの方法には高度なスキルが必要である。我々は新たな手法としてKCsのi.p.投与による移植を確立した。この新しい試みは、従来の方法より簡便で低侵襲性である。この手法では、移植された細胞の20%が24時間で肝臓に移動した。さらに、KCsの移植によって、炎症性サイトカイン

(TNF α 、IL1 β 、およびIL-6)の発現誘導とともに肝臓におけるKCs数が減少した。肝KCs総数の減少は、GdCl₃による前処理によってKCsを枯渇させた後の移植実験では見られなかった。この結果は、移植されたKCsが元のKCsに作用してアポトーシスを誘導したことを示唆している。これまでの研究報告では、GdCl₃処理によりKCsを枯渇させたマウスに移植したKCsの定着率が増加することが報告されている^{7,21}。我々の実験でも、GdCl₃処理したマウスでは、KCs移植によって肝臓のKCsの数は正常レベルに回復した。これは、投与されたKCsのほとんど(91%)が肝臓に移動したことを意味する。したがって、KCsのi.p.投与法は、KCsの移植に非常に有用だと考えられる。

前述のように、KCs移植24時間後のWTマウスおよびヌクリングKOマウスでは肝臓のKCsが減少した(図7A)。一方、移植10日後のWTマウスではKCsの数は通常レベルに回復していた(図2B)。移植10日後のヌクリングKOマウスでは、その数が通常レベルよりもさらに増加していた(図2B)。この増加の理由は、少なくとも3つの可能性が考えられる。

- ① KCの移行は10日で徐々に進行した。
- ② 移植後24時間でKCsが減少した後、レシピエント由来のKCsが自発的に供給された。

③ 移植され定着したドナー由来の KCs が 10 日で自己増殖した。

EGFP-KCs を用いた実験では、EGFP をトレーサーとして KCs の腹腔から肝臓への移動を確認した (図 3)。ただし、EGFP^{high} 細胞の集団は WT マウスとヌクリング KO マウスの両方で非常に低かった (~2%)。一方、EGFP マウスから調製した KCs に含まれる EGFP^{high} 細胞の割合は約 16% だった (図 2A)。この観点から、移植されたドナー細胞の自己増殖による可能性は低いと思われる。EGFP マウス由来の KCs には、約 12% の F4 / 80^{high} 細胞と約 10% の F4 / 80^{high} / EGFP^{high} 細胞が含まれ (図 5A)、F4 / 80^{high} 細胞の 80% が EGFP^{high} であった。また、EGFP-KC 移植したヌクリング KO マウス (KO / EGFP-KCinj) の F4 / 80^{high} 集団は、約 21% まで増加した。これに対し、対照 (KO/PBS) は 12% だった (図 5B)。KO / EGFP-KCinj では、F4 / 80^{high} / EGFP^{high} 細胞は約 2% と非常に少ない (図 5B では 2.01%)。これはつまり F4 / 80^{high} 細胞の 16% が EGFP^{high} であることを示しており、これは EGFP-KCs の 80% (図 5B) に比べて非常に少ない。WT/EGFP-KCinj でもほぼ同じ結果が得られた (データ未掲載)。以上の結果から、移植後 10 日における KCs の増加は、レシピエントの KCs の自発的な供給によるものであると結論付けた。

また、i. p. 投与された腹腔マクロファージでは、肝臓への移動はほぼ見られなかった。これは、遊走化因子などによる独自のメカニズムによって、KCs が特異的に肝臓に移動することを意味する。GdCl₃ で処理されたヌクリング KO マウスでは、移植された KCs の移動定着率はレシピエントとして WT マウスを使用した場合よりも低かった。これは、KCs 移行のメカニズムにおけるヌクリングの重要性を示唆している。

ヌクリング KO マウスでもともと KCs が著減している理由の 1 つは、この移動定着率が低いことにあると考えられる。しかし、ヌクリング KO マウスでも GdCl₃ 投与により KCs を枯渇化した後で KCs 移植を行うと KCs が正常なレベルまで回復した点を見ると (図 6A)、十分な理由とはならないかもしれない。ヌクリング KO マウスでの KCs 著減原因をさらに検討するために、同マウスの肝臓での移植 KCs のアポトーシス応答を調べた。移植された KCs のアポトーシスを TUNEL 法でチェックした。予想通り、KCs 投与 10 日後、F4 / 80 陽性細胞はヌクリング KO 肝で増加したが、WT 肝では増加しなかった (図 8)。しかし、TUNEL 陽性細胞数はそれらの間で有意差はなかった (図 8)。これは、KCs の数には調節メカニズムが存在し、KCs が肝臓に移動・定着する前の段階で働いていることを示唆している。肝類洞領域またはその内皮細胞は、KCs の数の調節メカニズムに重要な役割を果たす可能性がある。さらに、ストレスに対する KCs の応答を調べた。LPS または PMA を使用した細胞ストレス刺激は、WT の KCs よりもヌクリング KO マウス由来の KCs に対してより効果的にアポトーシスを誘導した (図 6A)。LPS による炎症性サイトカイン (TNF α) 産生レベルは、WT マウスよりもヌクリング KO マウスで有意に高かった (図 6B)。この結果は、ヌクリング KO マウスの KCs がアポトーシスを誘導するストレスに対してより敏感であることを示している。これが、ヌクリング KO マウスで KCs がもともと減少している理由の 1 つである可能性がある。またこれらの結果は、KCs の分布を調節するメカニズムの存在を示唆している。この仮説を検証するために、KCs 移植マウスと対照マウスの肝臓における KCs の分布を比較した。その結果、KCs の分布と細胞数が KCs 移植 WT マウスと対照 WT マウスの間で有意差がなかった (図 2)。一方、KCs 移植されたヌクリング KO マウスの肝臓では対照 KO マウス肝より KCs 数は増加した。さらに KCs 移植マウス同士を比較しても、移植ヌクリング KO マウスの KCs 数は、移植 WT マウス肝臓の KCs よりも有意に増加した。このことからヌ

クリング KO マウスには、肝における KCs 定着数の制御メカニズムに欠陥がある可能性がある。

本研究では i. p. 投与法による KCs の移植方法を確立した。KCs が i. p. 接種後に肝臓に移動・定着することを確認し、KCs が肝臓に移動するための選別メカニズムの存在を示した。KCs 数を制御するためのヌクリングに関連する新規制御メカニズムの存在が想定される。この新規アポトーシス制御分子による KCs 制御機構を解明するためのさらなる研究が望まれる。

6 謝辞

本研究にあたり、御指導、御助言を賜りました徳島文理大学大学院 人間生活学研究科 坂井隆志教授、石堂一巳教授に心から感謝致します。

フローサイトメーター実験に関して、御助言受け賜りました徳島文理大学 薬学部 角大悟教授に心から感謝致します。

免疫組織化学染色実験に関して、御助言受け賜りました徳島文理大学 薬学部 原貴史教授に心から感謝致します。

ゲノム PCR 実験に関して、御助言受け賜りました徳島大学 先端酵素学研究所 病態システム酵素学分野 福井清教授に心から感謝致します。

ゲノム PCR 実験に関して、御助言受け賜りました徳島大学 先端酵素学研究所 病態システム酵素学分野 宍戸裕二先生に心から感謝致します。

研究生生活以外にも大変お世話になりました徳島文理大学留学生の方々にも心から感謝致します。

7 図

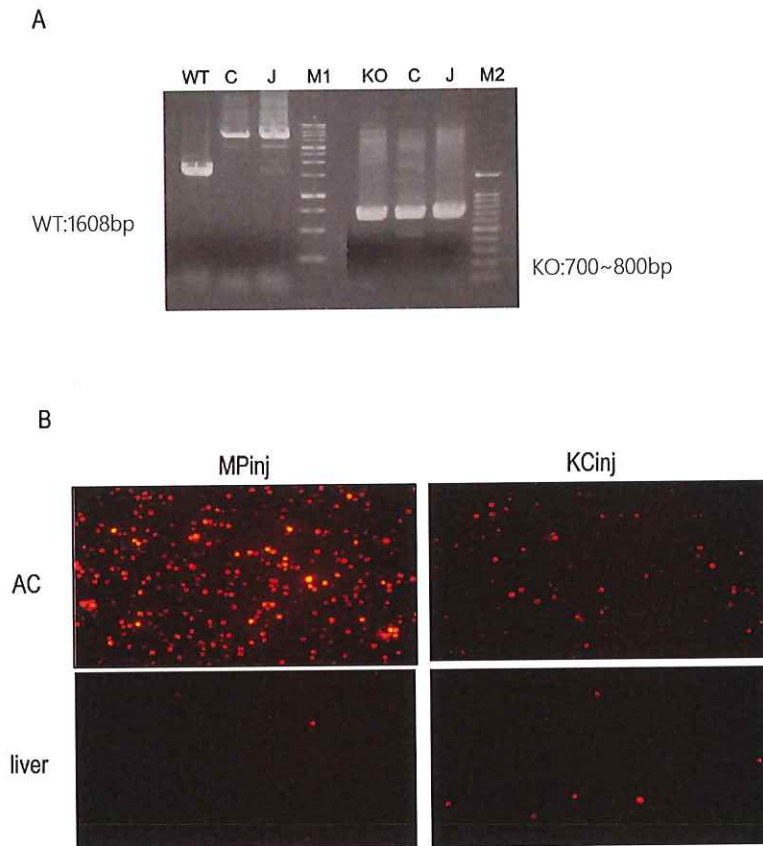


図1 腹腔投与されたクッパー細胞が肝臓で確認された

(A) WT マウスから調製した KCs をヌクリング KO マウスに腹腔投与した。移植された KCs は、PCR を使用してヌクリング遺伝子を検出することによって確認された。(B) PKH26 Red 蛍光標識された KCs およびマクロファージ (pMP) を腹腔投与し、10 日後に細胞を回収して蛍光顕微鏡で観察した。KCs 接種では、約 60% (赤色蛍光細胞の比率) が腹腔内に残り、約 11.7% が肝臓に移行した (N=3) (P < 0.01)。一方、pMP 接種ではほとんどの接種細胞が腹腔内に残った。(M1: マーカー-ExcelBand™1KB DNA ladder (SMOBIO、台湾); M2: マーカー-ExcelBand™100bp DNA ladder (SMOBIO、台湾); WT: 野生型 (未処理、n = 3); C: 対照 (PBS 注射ヌクリング KO マウス、n =

3) ; J : KC 注射 KO マウス、 $n = 3$; KO : ヌクリングノックアウト (未処理)、 $n = 4$) 。

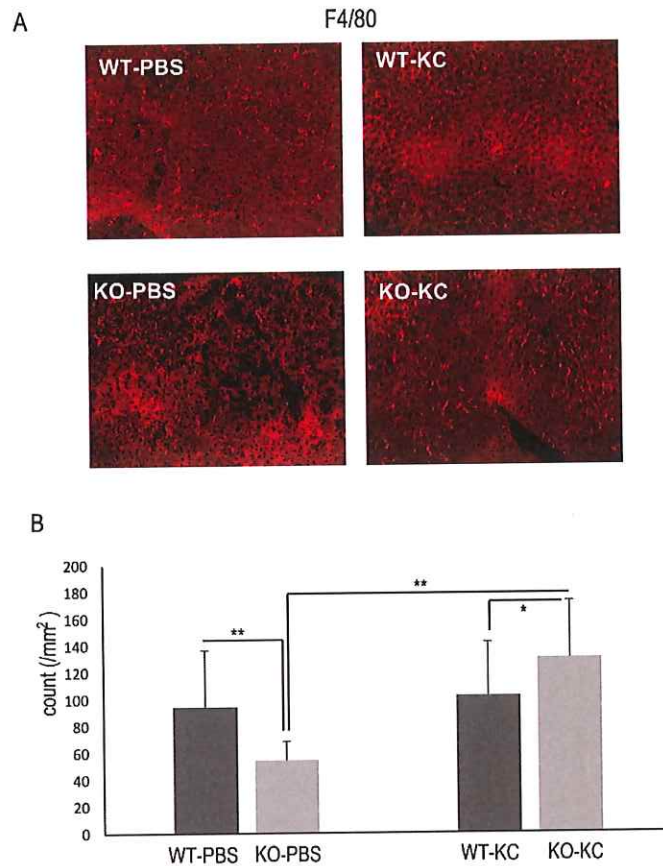


図2 F4 / 80 陽性細胞は、KCs 接種後に増加した

(A) WT マウスから単離した KCs を i. p. 注射した WT マウス (WT-KC、n = 3) およびヌクリング KO マウス (KO-KC) の移植 10 日後の肝臓における F4 / 80 陽性 (赤) 細胞の分布を明らかにした (免疫組織染色)。生理食塩水を注射した WT マウス (WT-PBS、n = 3) およびヌクリング KO マウス (KO-PBS、n = 3) を対照マウスとして用意した。(B) 免疫組織染色における F4 / 80 陽性細胞の数をカウントした。KO-PBS は、WT-PBS よりも少ない F4 / 80 陽性細胞を示した。さらに、ヌクリング KO 肝では WT-KC のレベルを超えて増加した (* p < 0.05、** p < 0.01)。

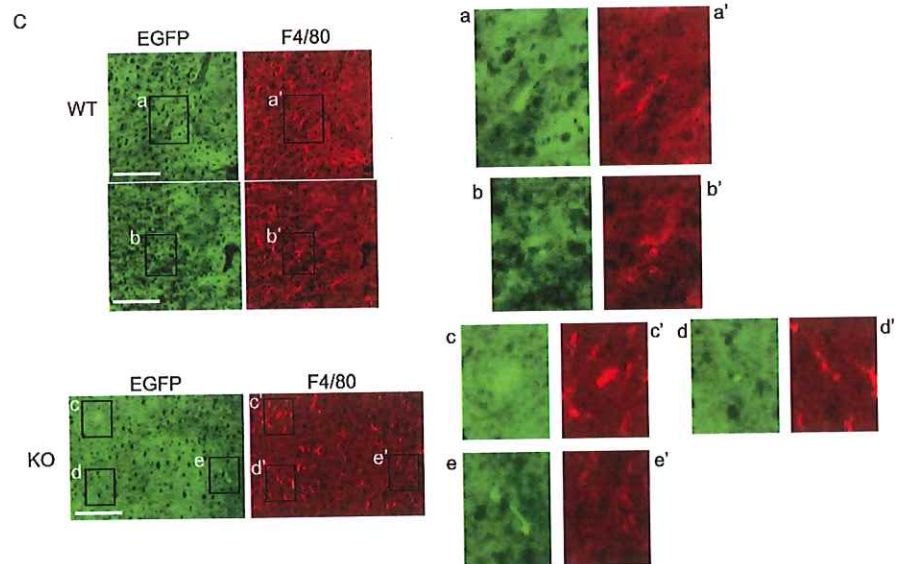
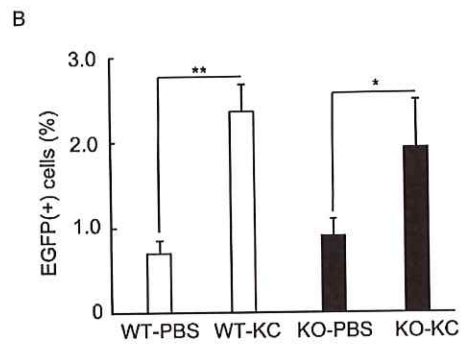
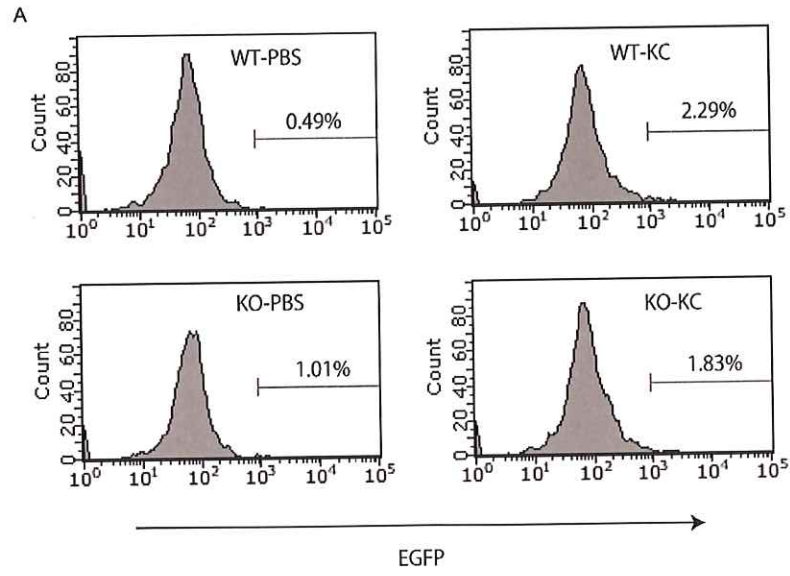


図3 移植された KCs は腹腔から肝臓に移動する

(A) EGFP-KCs を i. p. 注射後 10 日の WT マウス (WT-KC、n = 3) 及びヌクリング KO マウス (KO-KC、n = 3) の肝臓での EGFP 発現細胞が確認された。生理食塩水を注射した WT (WT-PBS、n = 3) およびヌクリング KO (KO-PBS、n = 3) マウスを対照として用意した。EGFP 陽性細胞の割合は移植群 (WT-KC、KO-KC) で有意に高かった。(B) WT-PBS、WT-KC、KO-PBS、および KO-KC 間の EGFP 陽性細胞の割合 (n = 3、3 回の実験) (* p < 0.05、** p < 0.01)。(C) WT およびヌクリング KO マウスの肝臓における F4 / 80 陽性細胞 (赤) および EGFP 陽性細胞 (緑) の分布 (免疫組織染色)。代表的な陽性細胞を、拡大画像 (a (a') - e (e')) で示している。スケールバー; 100 μ M。

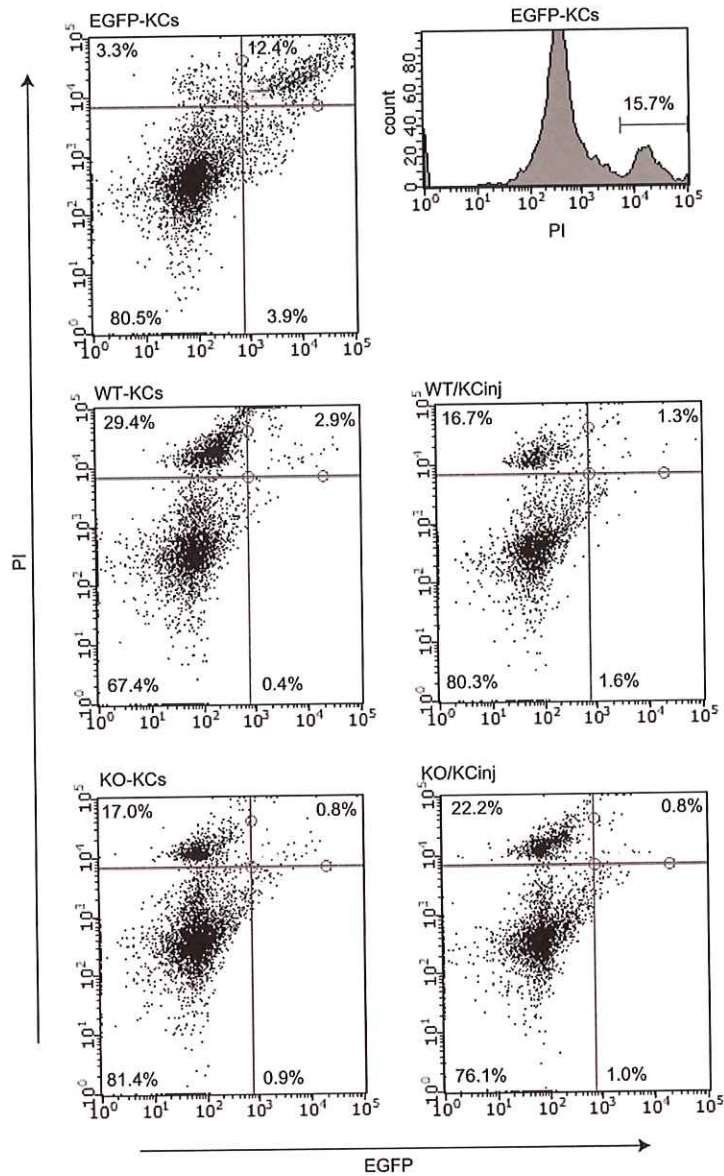


図4 移植用クッパー細胞の品質評価

調製した KCs の品質を確認するために、単離後の PI 陽性細胞の比率を確認した。代表的なドットプロットデータをここに示している。EGFP と PI 染色で展開し、4つの象限の細胞の各比率を図中に示す (%)。EGFP-KCs, EGFP マウスから調製した KCs。WT-KCs : 野生型マウスの KCs (PBS を投与後回収)、WT / KCinj : 野生型マウスの KCs (EGFP-KC を投与後回収)、KO-KCs : ヌクリング KO マウスの KCs (PBS を投与後回収)、KO / KCinj : ヌクリング KO マウスの KCs (EGFP-KC を投与後回収)。

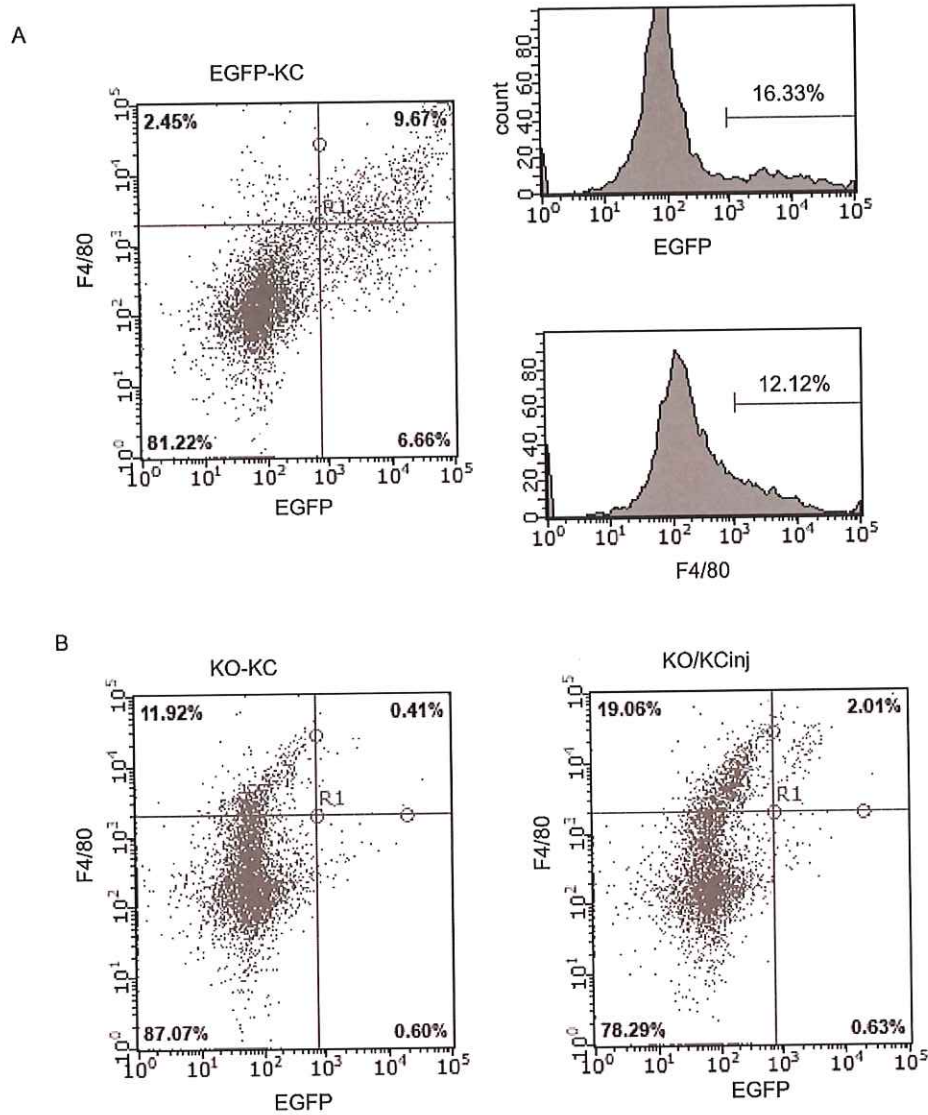


図5 回収した KCs における EGFP および F4 / 80 発現の評価

移植用に調整した KCs を検定するために、EGFP 陽性率と F4 / 80 陽性率を検証した。代表的なドットプロットをここに示す。EGFP (横軸) と F4 / 80

(縦軸) で、4 つの象限の各比率 (%) を図中に示す。EGFP-KCs : EGFP マウスから調製された KCs、KO-KC : ノックアウトマウスの KCs (PBS を投与後回収)。KO / KCinj : ノックアウトマウスの KCs (EGFP-KC を投与後回収)。

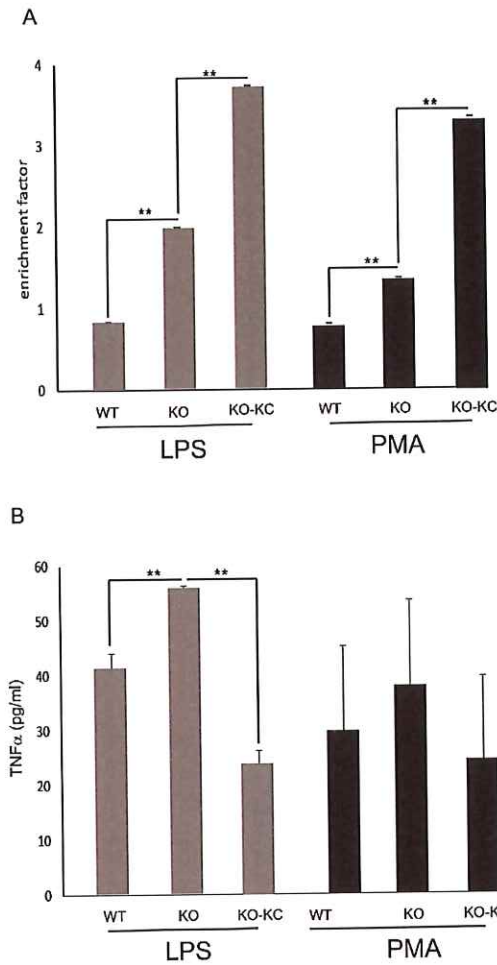


図6 細胞ストレスに対するWTマウスおよびヌクリングKOマウスKCsの比較

WT、ヌクリングKO (KO)、およびWT-KCsを注射したヌクリングKOマウス (KO-KC) から分離したクッパー細胞でLPSまたはPMAを含む培養液で24時間処理した。(A) 細胞損傷の程度を、モノヌクレオソームおよびオリゴヌクレオソームの蓄積(enrichment factor)として示している。(B) 培地中のTNF α の比較。ストレス反応性の指標として培地中のTNF α 濃度を測定した。LPS刺激に対してはWT, KO, KO-KC間で有意差が認められた。一方、PMA処理では違いは見られなかった。 (**、 $p < 0.01$)

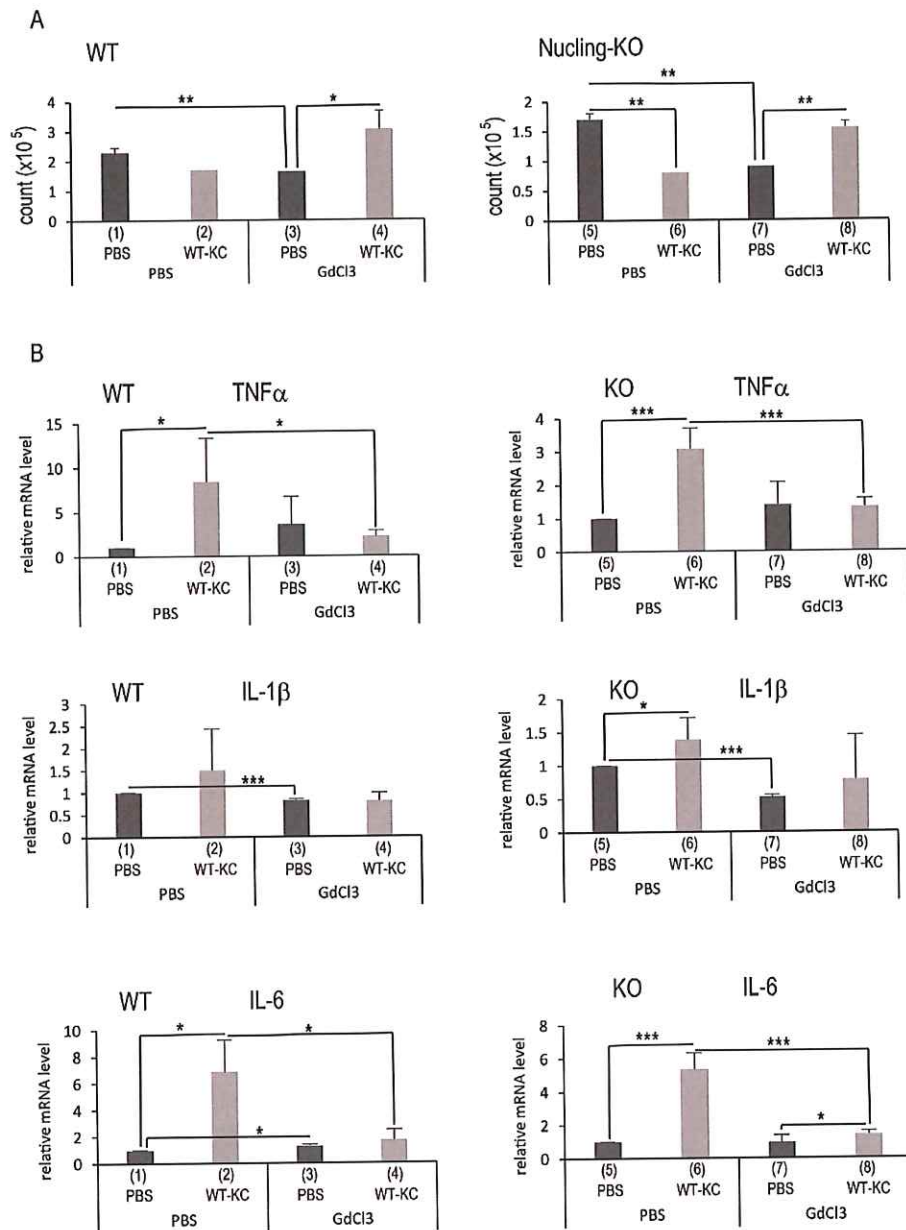


図7 GdCl₃ 前処理の KCs 移植への影響

KCs 以外の影響を検討するために塩化ガドリニウム (GdCl₃) による KCs 枯渴の前処理を施した WT マウス及びヌクリング KO マウスを用意した

(GdCl₃, 15mg / kg, n = 3)。これら KCs 枯渴マウスに WT マウス由来の KCs (WT-KCs) を接種した。対照として PBS 前処理マウスおよび PBS 接種マウスを用意した。(A) WT マウス (WT) およびヌクリング KO マウス (Nucling-KO) へ GdCl₃ 前処理/ WT-KCs i. p. 投与後 24 時間での肝 KCs。(B) サイトカイン

(TNF α 、IL-1 β およびIL-6)の発現チェック(定量的RT-PCR)。TNF α およびIL-6の発現は、KCs注射によりWTおよびKOマウスで有意に上昇した。IL-1 β は注射によってヌクリングKOマウスのみで有意に上昇し、その反応はGdCl₃前処理によって抑制された。(* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001)

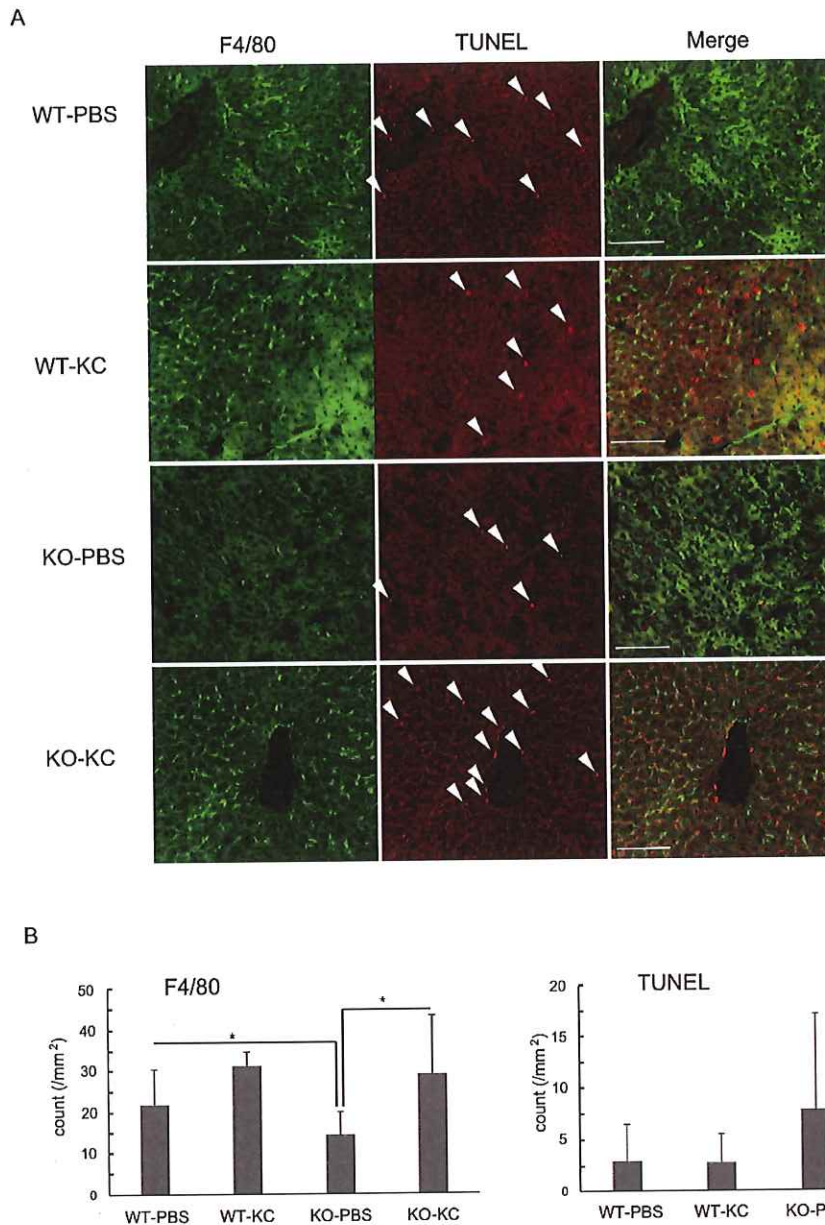


図8 KCs 移植肝におけるアポトーシスの検証

KCs 投与 10 日後の WT マウス (WT-KC、n = 3) またはヌクリング KO マウス (KO-KC、n = 3) の肝臓における F4 / 80 陽性 (緑) および TUNEL 陽性 (赤 ; 白の矢じり) 細胞の分布を調べた。PBS を注射した WT マウス (WT-PBS、n = 3) およびヌクリング KO マウス (KO-PBS、n = 3) を対照とした。スケールバー ; 100 μ m。 (B) 画像データ中の F4 / 80 陽性細胞および TUNEL 陽性細胞をカウントした。F4 / 80 陽性細胞数は KO-PBS 肝において WT-PBS 肝よりも有意に少なかった。さらに、F4 / 80 陽性細胞は、対照と比較して

移植後に増加した (*、 $p < 0.05$)。一方、TUNEL 陽性細胞の数はどのグループ間でも有意差はなかった。

8 参考文献

- [1] Elhelu MA. The role of macrophages in immunology. *J Natl Med Assoc* 1983; 75:314–7.
- [2] Gao B, Jeong W Il, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* 2008; 47:729–36. <https://doi.org/10.1002/hep.22034>.
- [3] Sato K, Hall C, Glaser S, Francis H, Meng F, Alpini G. Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury. *Am J Pathol* 2016; 186:2238–47. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.003>.
- [4] Crofton RW, Diesselhoff-Den Dulk MMC, Van Furth R. The origin, kinetics, and characteristics of the kupffer cells in the normal steady state. *J Exp Med* 1978; 148:1–17. <https://doi.org/10.1084/jem.148.1.1>.
- [5] Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 2006. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.008>.
- [6] Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John B, Wuensch SA, Topham DJ, et al. Kupffer cell heterogeneity: Functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages. *Blood* 2007; 110:4077–85. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-073841>.
- [7] Merlin S, Bhargava KK, Ranaldo G, Zanolini D, Palestro CJ, Santambrogio L, et al. Kupffer cell transplantation in mice for elucidating monocyte/macrophage biology and for potential in cell or gene therapy. *Am J Pathol* 2016; 186:539–51. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.002>.

- [8] DECKER K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192:245–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19222.x>.
- [9] Neyrinck A, Gomez C, Delzenne N. Precision-cut liver slices in culture as a tool to assess the physiological involvement of Kupffer cells in hepatic metabolism. *Comp Hepatol* 2004;3: S45. <https://doi.org/10.1186/1476-5926-2-S1-S45>.
- [10] Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: Implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:2557–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2557>.
- [11] Anna Diehl MAE. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:1–5.
- [12] Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, De Backer F, Bindels LB, Delzenne NM. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385:351–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.070>.
- [13] Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Sato A, Nakashima M, Miyazaki H, et al. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *J Leukoc Biol* 2013; 94:1325–36. <https://doi.org/10.1189/jlb.0313144>.

- [14] Yang C-Y, Chen J-B, Tsai T-F, Tsai Y-C, Tsai C-Y, Liang P-H, et al. CLEC4F Is an Inducible C-Type Lectin in F4/80-Positive Cells and Is Involved in Alpha-Galactosylceramide Presentation in Liver. *PLoS One* 2013;8: e65070.
- [15] Meng D, Qin Y, Lu N, Fang K, Hu Y, Tian Z, et al. Kupffer cells promote the differentiation of adult liver hematopoietic stem and progenitor cells into lymphocytes via ICAM-1 and LFA-1 interaction. *Stem Cells Int* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4848279>.
- [16] Chen GS, Qi HZ. Effect of Kupffer cells on immune tolerance in liver transplantation. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5:970–2. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60184-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60184-9).
- [17] Sakai T, Liu L, Teng X, Mukai-Sakai R, Shimada H, Kaji R, et al. Nucling recruits Apaf-1/pro-caspase-9 complex for the induction of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279:41131–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402902200>.
- [18] Liu L, Sakai T, Sano N, Fukui K. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor κ B signalling. *Biochem J* 2004; 380:31–41. <https://doi.org/10.1042/BJ20031300>.
- [19] Teng X, Sakai T, Liu L, Sakai R, Kaji R, Fukui K. Attenuation of MPTP-induced neurotoxicity and locomotor dysfunction in Nucling-deficient mice via suppression of the apoptosome pathway. *J Neurochem* 2006; 97:1126–35. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03833.x>.
- [20] Ray A, Dittel BN. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J Vis Exp* 2010:9–11. <https://doi.org/10.3791/1488>.

- [21] Zeng TS, Liu FM, Zhou J, Pan SX, Xia WF, Chen LL. Depletion of Kupffer cells attenuates systemic insulin resistance, inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice. *Endocr J* 2015; 62:615–26. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ15-0046>.



Functional kupffer cells migrate to the liver from the intraperitoneal cavity

Wen-Ling Lin, Mizuki Mizobuchi, Mina Kawahigashi, Otoki Nakahashi, Yuuki Maekawa, Takashi Sakai*

Institute for Health Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Nishihama-bouji, Yamashiro-cho, Tokushima, 770-8514, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

EGFP
Liver macrophage
Intraperitoneal injection
Kupffer cells
Transplantation

ABSTRACT

We established a method of KC transplantation by intraperitoneal (i.p.) injection using EGFP-expressing cells (EGFP-KCs) and normal KCs. The novel method is easier and less invasive than conventional methods so that it is not only technically advantageous but also ethically preferable for experiments using animals. We demonstrated that KCs migrated to the liver following i.p. injection. Engraftment in the liver was not observed for peritoneal macrophages (pMPs). This suggests that KCs migrate to the liver via a sorting mechanism. KC injection decreased the KC number at 24 h and then recovered the KCs at 10 days to a normal level. Additionally, recovery to the normal level by KC injection was observed in mice with KC depletion induced by GdCl₃. These results suggest that a regulatory mechanism exists for controlling the number of KCs.

1. Introduction

Kupffer cells (KCs) are resident macrophages in the liver. They localize mainly in the hepatic sinusoids and can move around in the liver. They have a high phagocytic capability, allowing them to take out foreign substances, such as viruses and bacteria, apoptotic cells, and cellular debris. Thus, KCs have an important role as gatekeepers in the innate immune response [1]. KCs represent 5%–15% of liver cells and constitute 80% of resident macrophages in the body. However, the origin of KCs has been complicated because KCs consist of heterogeneous lineages coming from at least two tissues, bone marrow and yolk sac [2–5]. KCs play a major role in immunity and tissue injury and repair. KCs produce various inflammatory mediators, including cytokines (TNF- α), prostaglandins, and reactive oxygen species, namely, through NADPH oxidase or inducible NO synthase (iNOS) activities [6, 7]. KC dysfunction contributes to the pathogenesis of the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [8,9]. However, the role of KCs in the regulation of liver metabolism and the occurrence of the metabolic disease remains enigmatic [10]. Therefore, if KCs were transplanted successfully in the liver with engraftment and survival over the long term, major issues could be addressed regarding their roles in microbial clearance, antigen presentation, and tissue inflammation or repair [3,4, 11]. Several studies have shown that KC transplantation is useful. Simone et al. showed that KC transplantation has potential in cell or

gene therapy [5]. They reported that KCs could be transplanted by intravenous injection [12]. Portal vein and intravenous injection are usually used for KC transplantation [5,12,13]. Using the portal vein is reliable, but it is highly invasive, and the skill level is difficult. Then, following intravenous injection, KCs must pass through the blood circulation to the liver.

KCs will meet with antigens and experience some stress in the blood vessel before arriving in the liver. It has been reported that inflammatory macrophages can migrate from the peritoneum to lymph nodes [14]. It is supposed to be a mechanism for the fate of the inflammatory macrophages during the resolution of inflammation. Besides, the report clearly shows the existence of the route from the peritoneum to the circulation system. Thus, we speculate if the residential macrophages have the potency to migrate to the proper place, the KCs might migrate to the liver by intraperitoneal (i.p.) injection through the circulation system. Therefore, we considered injection as an alternative method for the KCs transplantation into the liver. A previous study reported that i.p. injection of KCs in rats reduced liver injury and raised immune tolerance against liver transplantation [15]. However, whether KCs can engraft in the liver is still unclear. In this report, we showed that i.p. injection was useful for KC transplantation and that KCs maintained their functions in mice.

We introduced KC transplantation experiments. It was important to establish a simple and useful method for the transplantation of KCs.

Abbreviations: KCs, Kupffer cells; pMP, peritoneal macrophages; i.p., intraperitoneal.

* Corresponding author.

E-mail address: tsakai@tks.bunri-u.ac.jp (T. Sakai).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101103>

Received 20 June 2021; Received in revised form 28 July 2021; Accepted 11 August 2021

2405-5808/© 2021 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Here, we show an available method using intraperitoneal injection. We investigated the dynamics of exogenous KCs using several materials, including phagocytic cell labeling tracers and KCs prepared from green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals and diets

Wild-type (WT) and Nucling-Knockout (KO) male mice (6–8 weeks of age) (ref. for KO mice.) were prepared. The background of the Nucling-KO (control, $n = 4$; transplantation, $n = 3$) and WT (control, $n = 3$ –5) mice was C57BL/6J. Enhanced green fluorescent gene transgenic mice (EGFP mice with a C57BL/6 N background) were provided by the Center for Animal Resources and Development (CARD) at Kumamoto University, Japan. Mice were fed a normal chow diet (54.4% CHO, 23.6% protein, 5.3% fat; NCD) and water ad libitum. The animals were kept under constant environmental conditions with a 12-h light-dark cycle. All animals received humane care in compliance with the institutional guidelines. Mice were sacrificed after all the tests were finished. All animal experiments comply with the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2. Cell isolation and transplantation

Kupffer cells (KCs) were isolated from mouse (7 weeks old) livers using a liver dissociation kit and MS columns (MACS, USA) for transplantation. Peritoneal macrophages (pMPs) were isolated using the method of Avijit Ray and Bonnie N. Dittel [16]. Whole cells isolated from one mouse were transplanted into a recipient mouse by i.p. injection. The average number of transplanted cells was 6.3×10^5 /mouse. After 10 days, the transplanted cells were collected for further experiments. (See the supplementary data for the characterization of isolated cells from control and transplanted mice.)

2.3. Phagocytotic fluorescence test

Isolated KCs and pMPs were dyed using the PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma-Aldrich, USA) according to the manufacturer's protocol. The labeled cells were immediately injected intraperitoneally into recipient mice. Ten days after injection, KCs and pMPs were collected and analyzed using a fluorescence microscope (Nikon, Japan).

2.4. Real-time quantitative PCR

Mice were killed 24 h after KC or saline injection following single $GdCl_3$ or saline administration. The liver was carefully dissected and immersed in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was extracted using TRI reagent (Sigma-Aldrich, USA). cDNA was prepared by reverse transcription of 1 μg total RNA using Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) (Takara, Japan). Real-time PCR was performed using a 7300 RT-PCR System (Applied Biosystems, USA) with SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Japan). GAPDH RNA was chosen as a housekeeping gene. All samples were run in duplicate in a single 96-well reaction plate. Thermal cycling conditions were 30 s at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 5 s and 61°C for 31 s. The expression of each gene was normalized to GAPDH mRNA and calculated relative to the baseline control using the comparative cycle threshold method ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Primers for GAPDH (control) were 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (Forward) and 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (Reverse). Primers for TNF α were 5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3' (Forward) and 5'-ITGAGTTCATGCCGTTG-3' (Reverse). Primers for IL-1 β were 5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3' (Forward) and 5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3' (Reverse). Primers for IL-6 were 5'-CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA-3' (Forward) and 5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATCATTTTC-3' (Reverse).

2.5. Flow cytometry

EGFP KCs were injected into WT and Nucling-KO mice. Ten days after injection, KCs were isolated using a MACS kit and MS columns followed by flow cytometric analysis. The cells were fixed for 30 min with 4% paraformaldehyde and centrifuged at 400 g for 10 min to remove the buffer. Cells were diluted in 100 μl cold PBS with 10% FBS and 1% sodium azide (NaN_3) spun at 400 g for 10 min and, where necessary, incubated with F4/80 antibody with 3% BSA (final con. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma, USA) for 1 h at 4°C . Cells were washed with cold PBS with 5% FBS and 20 mM NaN_3 3 times. Fluorescently labeled (Alexa Fluor 594) goat anti-rat IgG was added to the samples for 1 h at 4°C in the dark, and the wash step was repeated 3 times. Propidium iodide (PI) (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used as a viability marker for FACS. EGFP- and F4/80-positive cells were measured by Guava® easyCyte™ (Luminex, USA).

2.6. Immunohistochemistry

The perfused livers of mice were fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 2 h, washed in PBS, and suspended in a 10% sucrose gradient for 2 h followed by 20% sucrose for 2 h and then 30% sucrose at 4°C overnight. Tissue was then flash-frozen in Tissue-Tek® OCT embedding compound in 100% ethanol with dry ice and stored at -80°C . Five-micrometer-thick sections were cut using a cryostat (Leica Biosystems, Germany). Following blocking with PBS containing 5% FBS at RT for 45 min, sections were incubated with rat anti-mouse F4/80 antibody (Sigma, USA) at 37°C for 30 min and then incubated with Alexa Fluor 594 or 488 goat anti-rat IgG antibody (Invitrogen), 1:400, diluted in blocking solution for 37°C for 30 min. The images were viewed by using a BZ-X710 fluorescence microscope (Keyence, Japan).

2.7. Gadolinium chloride ($GdCl_3$) treatment

To confirm the effect of the Nucling-KO background on the phenotype of transplanted KCs, we alternatively transplanted KCs into WT mice ($n = 4$) with or without gadolinium chloride ($GdCl_3$, Wako, Japan; $n = 3$) (15 mg/ml in PBS) treatment. Saline-injected (PBS, $n = 3$) mice were prepared as control mice. After 24 h, KCs were collected for further experiments.

2.8. TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTPnick-end labeling) assay

The TUNEL assay was performed on frozen sections (5 μm thick) using the in situ Apoptosis Detection Kit (Takara, Japan).

2.9. PCR assay

Genomic DNA was extracted from KCs using extraction buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.5% SDS) and Proteinase K (20 mg/ml) to digest the cells at 50°C for 2–3 h. TE buffer with phenol was added and mixed slowly before centrifugation at 1200g for 2 min. The supernatant was then collected and supplemented with chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and mixed slowly for 30 min. The solution was centrifuged at 1200 g for 2 min. Then, the supernatant was collected and supplemented with a 1/10 volume of 3 M CH_3COONa and two volumes of ethanol and mixed. The solution was centrifuged at 1000 g for 10 min, and the supernatant was discarded. The resulting DNA pellet was rinsed with 70% ethanol and dried. DNA was then dissolved with TE buffer. One nanogram of genomic DNA was used as a template for PCR using DNA polymerase KOD FX Neo (TOYOBO, Japan) with 35 cycles at 94°C for 2 min, 98°C for 10 s, 62°C for 30 s, 68°C for 120 s/kb, and final elongation at 68°C for 7 min. PCR products were resolved in 2% agarose gels. Primers for WT mice were 5'-TCCTCTACCTCATCTATGIGTACC-3' (Forward) and 5'-TATCTCTGTGTGCCTCCGAA-3' (Reverse). Primers for Nucling were 5'-CCGGTGGATATAGAATGTGTGCGAGG-3'

(Forward) and 5'-CTCCGCGTATCTCTGTGTGCCTCCGA-3' (Reverse) (Eurofins, Japan).

2.10. Reagent

Proteinase K and NaN₃ were obtained from Wako, Japan. Tissue-Tek® OCT compound was from MILES, USA. Ethidium bromide (EtBr) was obtained from Sigma, USA.

2.11. Statistical analysis

Data were expressed as means ± SE. Differences were analyzed by Student's t-test. P values < 0.05 were considered significant.

3. Result

I.p. Injected donor KCs were confirmed in the livers of the recipient mice.

We checked whether KCs could migrate to the liver following i.p.

Injection. We prepared KCs from the livers of EGFP mice (EGFP-KCs) and then transplanted them into WT mice by i.p. Injection. After 10 days, we collected KCs from the livers of treated mice. Flow cytometric analysis (FACS) revealed that EGFP-positive cells accounted for ~2.3 % of KCs in EGFP-KC-transplanted mouse livers (Fig. 1A). The number of EGFP-positive cells was significantly different between PBS- and KCs-injection groups (Fig. 1B). In addition, immunohistochemical analysis revealed the migration of the injected KCs into the liver of WT mice (Fig. 1C). Moreover, we prepared KCs from the livers of WT mice and then transplanted them into Nucling-KO WT mice by i.p. Injection because the Nucling gene can be a marker for transplanted KCs in KO mice. After 10 days, we collected KCs from the livers of treated mice. PCR using the genomic DNA of the KCs revealed that the transplanted KCs successfully migrated to the liver (Fig. 1D). Thus, we concluded that i.p. Injection is available for KCs to transplant into the liver.

FACS revealed that EGFP-positive cells accounted for 16.3 % of the transplanted cells and F4/80-positive cells accounted for 12.1 % (Fig. 2A). On the other hand, EGFP-positive cells accounted for 2.3 % of KCs in the transplanted mouse livers (Fig. 1A). The total number of KCs

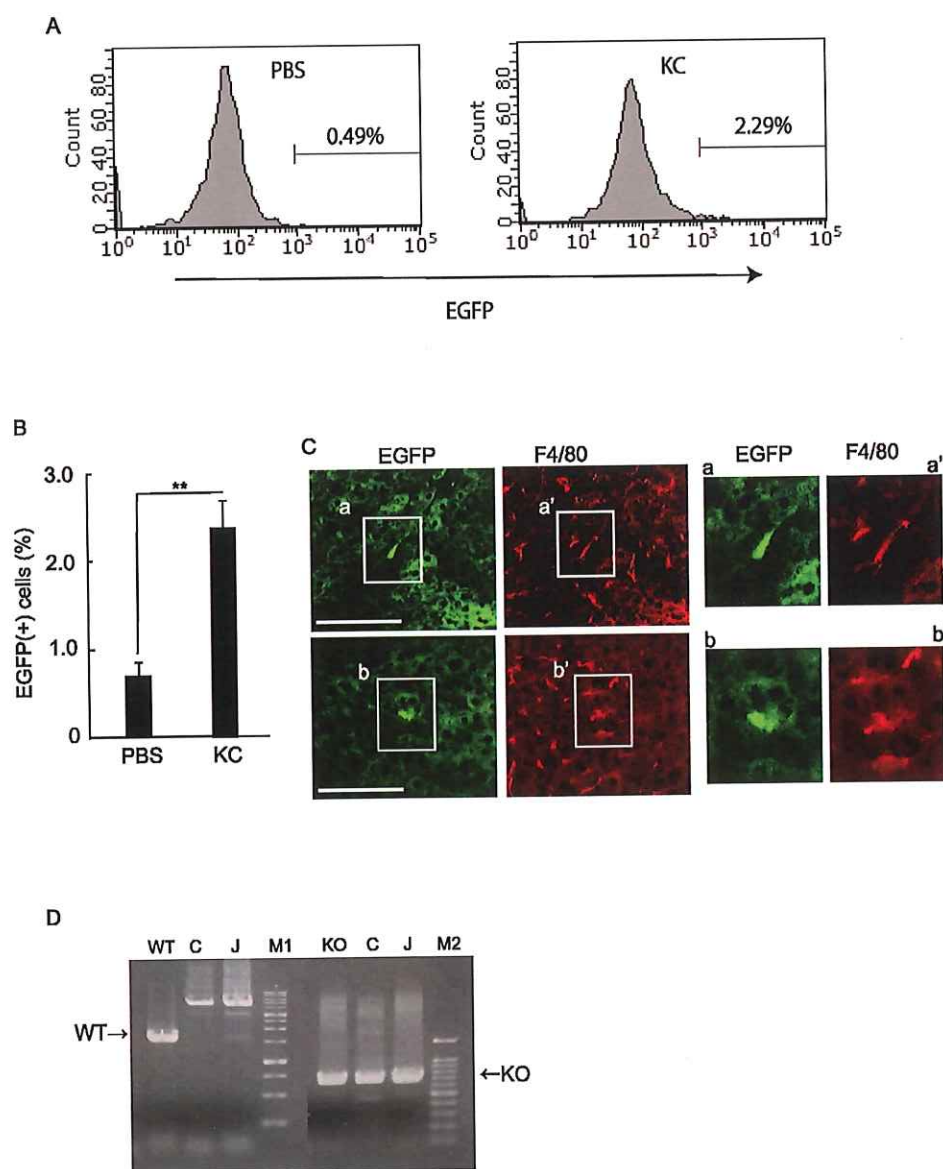


Fig. 1. Exogenous KCs migrate into the liver of transplanted mice.

(A) Representative EGFP expression in KCs prepared from the liver 10 days after EGFP-KCs i.p. Injection into WT (WT-KC, n = 3) mice. Saline-injected WT (WT-PBS, n = 3) mice were prepared as controls. The percentage of EGFP-positive cells was higher in the transplantation groups (WT-KC). (B) The frequency of EGFP (+) cells among WT-PBS and WT-KC (n = 3, 3 experiments) (*p<0.05, **p<0.01). (C) IHC was performed to clarify the distribution of F4/80-positive (red) cells and EGFP-positive (green) cells in WT mice. Some of the positive cells are shown with magnified images an (a')-b (b')) as representatives. Scale bar; 100 μm. (D) KCs prepared from WT mice were transplanted intraperitoneally into Nucling-KO mice. The transplanted KCs were confirmed by detecting the Nucling gene using PCR. (M1, ExcelBand™1KB DNA ladder (SMOBIO, Taiwan); M2, ExcelBand™100bp DNA ladder (SMOBIO, Taiwan); WT, wild type (untreated, n = 3); C, control (PBS injected KO mouse, n = 3); J, KC injected KO mouse, n = 3; KO, Nucling knockout (untreated), n = 4). Arrows, specific bands for WT or Nucling-KO genome. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

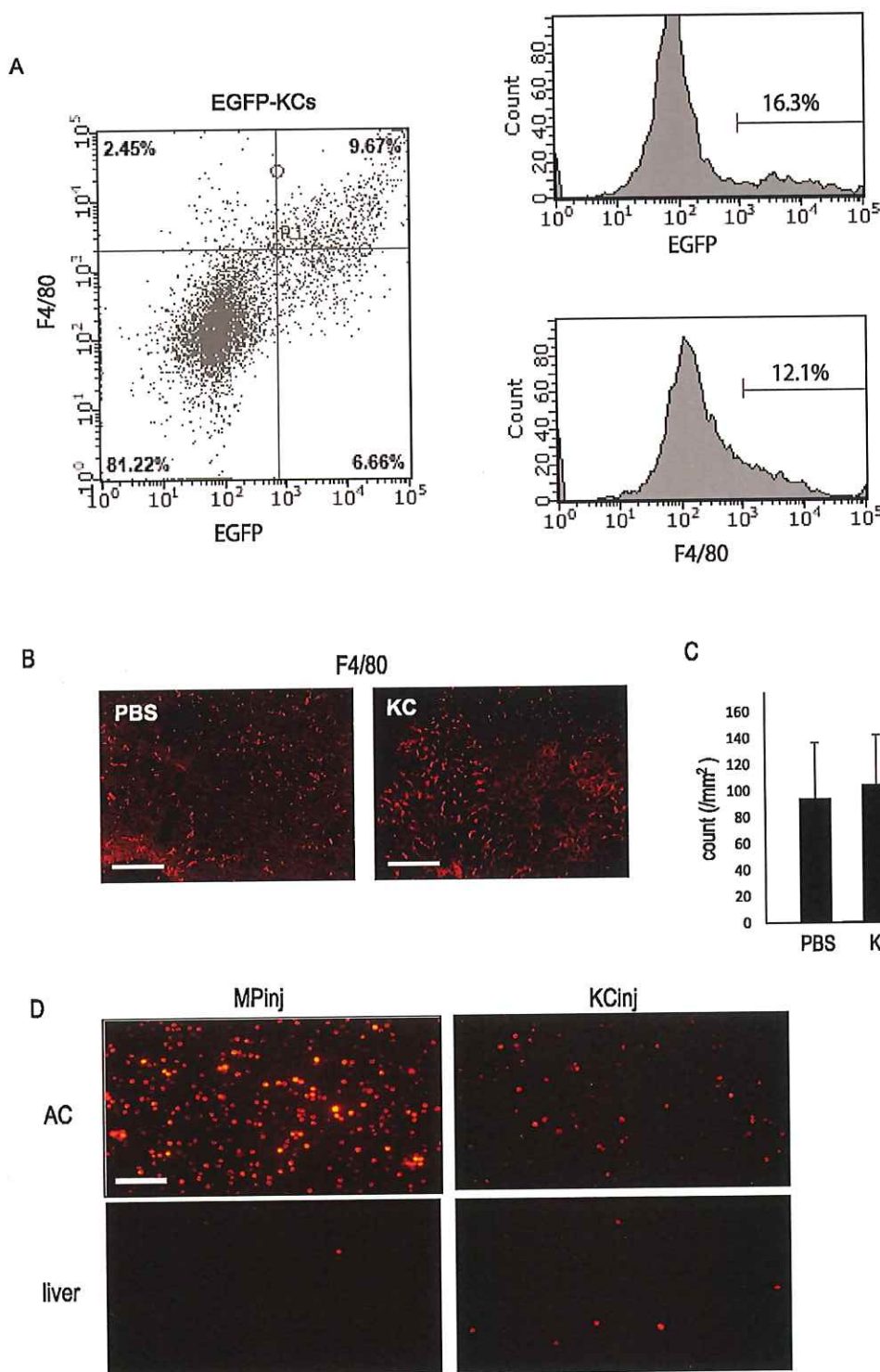


Fig. 2. F4/80-positive cells were increased after KC injection. (A) To characterize the prepared KCs, we checked the ratio of EGFP-positive cells and F4/80-positive cells following isolation. Representative dot plots are shown here to depict the EGFP^{high} cells and F4/80-positive cells, accompanied by each ratio (%) of cells in four quadrants. EGFP-positive cells accounted for 16.3 % of the transplanted cells and F4/80-positive cells accounted for 12.1 %. EGFP-KCs, KCs prepared from EGFP mouse. (B) Immunohistochemistry (IHC) was performed to clarify the distribution of F4/80-positive (red) cells in the liver 10 days after i.p. Injection into WT (WT-KC, n = 3) mice. Saline-injected WT (WT-PBS, n = 3) mice were prepared as control mice. (C) The number of F4/80-positive cells was counted in IHC images. F4/80-positive cells were not different between PBS and WT-KC. Scale bar; 100 μ m. (D) We used the PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit to dye isolated KCs and macrophages (MPs), and cells were collected and observed by fluorescence microscopy. On KC injection, approximately 60% (ratio of red fluorescent cells) remained in the abdominal cavity. The results showed that most KCs remained in the abdominal cavity in the MP group (n = 3), and approximately 11.7% migrated to the liver in the KC group (n = 3) (p<0.01). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

was not changed by the transplantation (Fig. 2B–C). Thus we concluded that the engraftment ratio of KCs in the liver was approximately 14% (=2.3/16.3). Most of the migrated KCs are conceivable as maintaining physiological functions. We investigated the engraftment rate of transplanted KCs with retention of macrophage functions in the liver by the i.p. method. We prepared KCs and pMP from WT mice. The cells were labeled with the fluorescent dye PKH26 red using phagocytotic activity and transplanted by i.p. Injection. After 10 days, we collected KCs and

pMPs from the recipient mice, observed the cells by fluorescence microscopy, and counted the number of labeled cells. The results showed that only 1 cell was detected by fluorescence microscopy in a 100 μ l cell solution when we calculated the KC number from the livers of the MP injection group. Most of the injected pMPs stayed in the abdominal cavity (0.004%; 243 cells vs. 1 cell/100 μ l; p<0.01). However, a few cells (mean 7 cells) were detected in the 100 μ l cell preparation of KCs from the livers of the KC injection group. 60 cells were detected in the

MP solution. The KC engraftment ratio was approximately 11.7% in the liver (60 cells vs. 7 cells/100 μ l; $p < 0.01$) (Fig. 2D). The estimation ratio was almost the same as that using the data of EGFP-KCs transplantation. Thus we concluded that most of the migrated KCs were retaining phagocytotic functions.

Transplanted KCs induced KC depletion, and the activation of KCs was correlated with endogenous KCs.

To confirm the effect of the phenotype of transplanted KCs, we alternatively transplanted WT-KCs into mice with or without gadolinium chloride ($GdCl_3$) treatment. $GdCl_3$ is known to deplete KCs and inhibit KC activation. Interestingly, simple transplantation of WT-KCs decreased the number of KCs in the control (PBS-injected) mice (1) vs (2), in Fig. 3A) at 24 h. In contrast, transplantation of KCs into $GdCl_3$ -treated mice recovered the number of KCs in the liver (4) in Fig. 3A). In addition, inflammatory cytokines ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, and $IL-6$) were upregulated in the KCs of control mice after KC transplantation (2) in Fig. 3B), which indicates the activation of KCs. Such upregulation of cytokines was not observed in the $GdCl_3$ -treated mice (4) in Fig. 3B). These data suggest that exogenous KCs induced KC depletion and that the activation of KCs was correlated with endogenous KCs. We concluded that KC transplantation led to inflammatory reactions by interacting exogenous KCs with endogenous cells.

To confirm the effect of transplanted KCs, we transplanted KCs into WT mice (WT-KC, $n = 4$) with or without gadolinium chloride ($GdCl_3$,

15 mg/kg, $n = 3$) treatment. Vehicle (PBS)-injected ($n = 3$) mice were prepared as a control. (A) The number of KCs was counted to clarify the distribution of KCs in the liver 24 h after WT KCs and $GdCl_3$ i.p. Injection into WT. (B) Quantitative RT-PCR was performed to check the expression of cytokines ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, and $IL-6$). $TNF\alpha$ and $IL-6$ expression was significantly upregulated in WT mice by KC injection. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Next, to confirm the effect of apoptosis of transplantation KCs. TUNEL assay was performed to assess apoptosis following KC (WT-KC) injection. TUNEL-positive cell numbers were not different among them (Fig. 4). This may suggest that the regulatory mechanism of the KC population consists of earlier stages, including stages before migration into the parenchymal area of the liver.

IHC was performed to clarify the distribution of F4/80-positive (green) and apoptotic TUNEL-positive (red, white arrowhead) cells in the liver 10 days after i.p. Injection into WT (WT-KC, $n = 3$) mice. Vehicle-injected WT (WT-PBS, $n = 3$) mice were prepared as a control. Scale bar; 100 μ m. (B) F4/80-positive cells and TUNEL-positive cells were counted in IHC images. F4/80-positive cells were increased after transplantation compared to the control (*, $p < 0.05$). On the other hand, there was no significant difference in the number of TUNEL-positive cells among any groups.

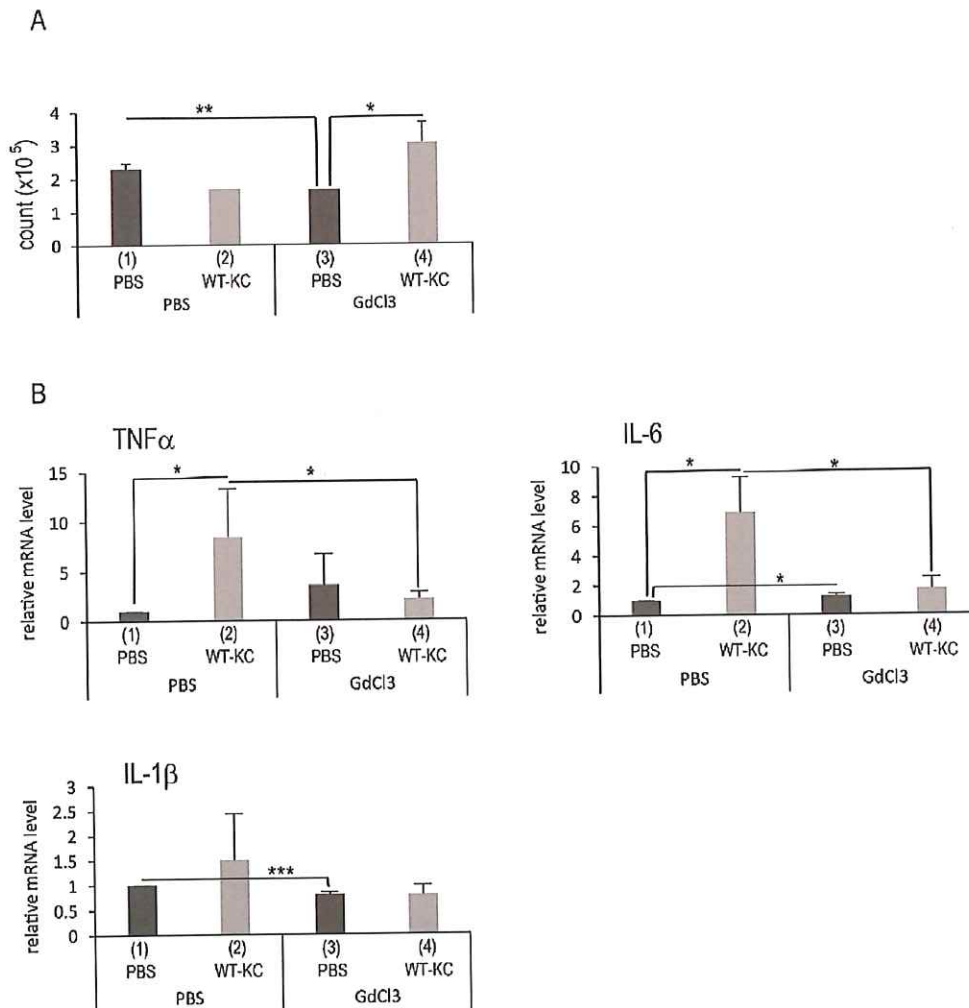


Fig. 3. Number and functionality of KCs isolated from WT KC-injected mice pretreated with or without $GdCl_3$.

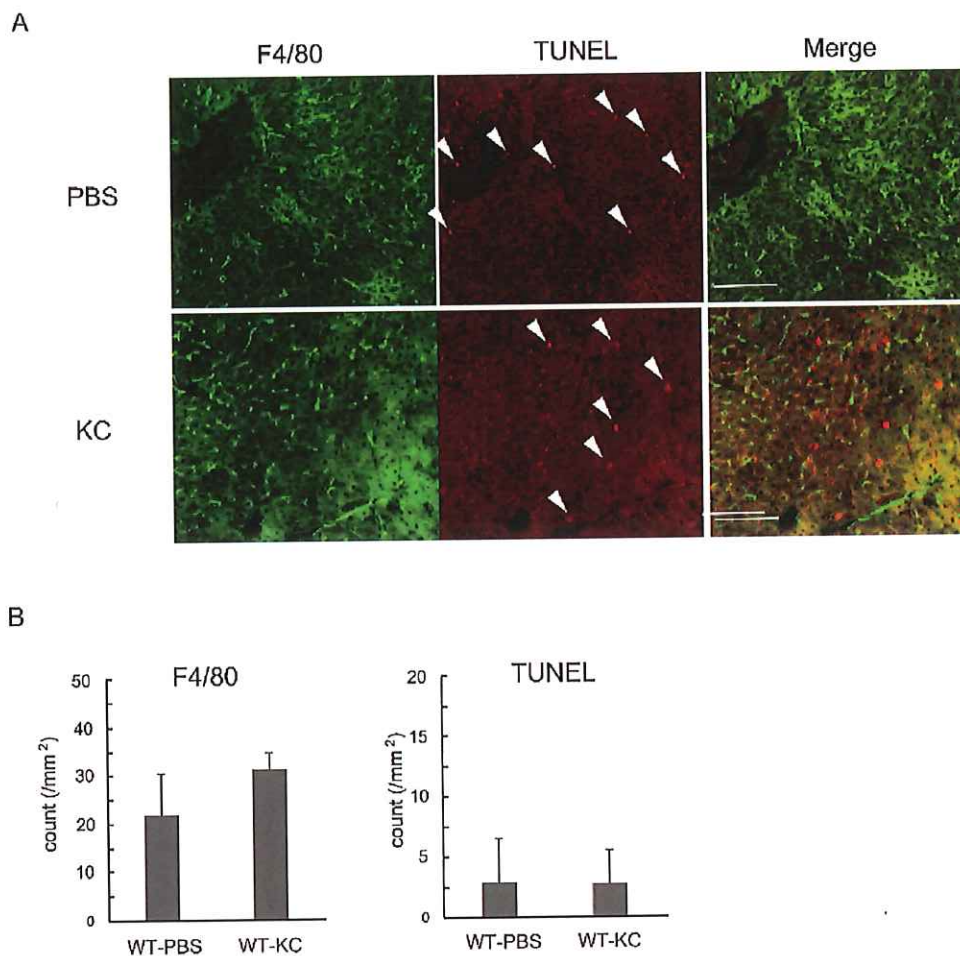


Fig. 4. Apoptosis in the liver of KC-transplanted mice.

4. Discussion

In general, KC transplantation is performed through the portal vein or tail vein because conventional methods are reliable and achieve a high migration rate to the liver [5]. However, these methods require highly sophisticated skills. Here, we performed i.p. Injection to transplant KCs in the liver. This novel method is easier and less invasive than conventional methods. Hoppo et al. reported that liver cells could be transplanted by i.p. Injection. They developed hepatized lymph nodes with liver function in the abdominal cavity to improve the lethal hepatic failure, but the expression of KC has not been found in these lymph nodes [17].

Little is known about the life span of KCs. Several reports mention the life span of KCs as several days, several weeks, or up to one year [18]. It is becoming a consensus that macrophages consist of heterogenic populations from monocytes, residential progenitors, or self-renewal cells [19]. However, the renewal mechanisms of KCs are unrevealed. Thus it is difficult to identify the renewal span of KCs, meaning that it is difficult to calculate the migration rate of exogenous KCs. So we use the word “engraftment ratio” instead of the word “migration rate.” In the experiment, we prepared KCs from EGFP-mice, which contain 16.3% EGFP^{high} cells. All the KCs prepared from one mouse were i.p. Injected into one recipient mouse. Then the KCs were collected from the recipient, and the EGFP^{high} population was investigated. Average 2.3% of the KCs were EGFP^{high}. So we concluded that the engraftment ratio of the exogenous KCs was 14% (=2.3/16.3) in ten days. We also checked the migration of KCs in 24h after i.p. Injection of EGFP-KCs into mice. We observed no

migration of the exogenous KCs in the liver. On the other hand, we observed 30%–66% of the injected KCs remaining in the peritoneal cavity in 24h (data not shown). The ratio was almost the same level as the ratio at ten days (Fig. 2D), suggesting that approximately half of the transplanted KCs start migrating from the peritoneal cavity in 24h. We speculate that the KCs might migrate to the liver by i.p. Injection through the circulation system. However, we have not confirmed the migration of KCs to lymph nodes by i.p. Injection yet. Further studies are necessary to reveal the migration mechanism of KCs.

The total number of KCs was reduced by transplantation along with the upregulation of inflammatory cytokines (TNF α , IL1 β , and IL-6). Such a reduction was suppressed by pretreatment with GdCl₃ i.p. Injection. These results suggest that exogenous KCs induced an apoptotic decrease in endogenous KCs. Some studies have indicated that GdCl₃ can increase the KC engraftment rate by depleting KCs before transplantation [5,20]. In fact, in WT mice treated with GdCl₃, the number of KCs increased than normal levels after transplantation. This means that most of the exogenous cells migrated to the liver. Thus, the method using i.p. Injection is very useful for the transplantation of KCs.

As mentioned, KC transplantation led to a decrease in endogenous KCs in WT mice (Fig. 3A) at 24 h. On the other hand, the KC population was higher than control in WT mice at 10 days (Fig. 1B). The increase in KCs at 10 days can be explained by at least three reasons. 1, KC migration gradually progressed in 10 days. 2, Following the decrease in KCs in 24 h, native KCs were spontaneously supplied. 3, The migrated exogenous KCs proliferated in 10 days. In the experiment using KCs prepared from EGFP mice (EGFP-KCs), we confirmed the migration of

EGFP-KCs into the liver (Fig. 1). However, the population of EGFP^{high} cells was very low (~2.3%). On the other hand, transplanted KCs prepared from EGFP mice contain approximately 16% of the EGFP^{high} population (Fig. 2). From that point of view, it seems to be difficult to explain the proliferation of the transplanted cells. The preparation of KCs from EGFP mice contained approximately 12% F4/80^{high} cells and approximately 10% F4/80^{high}/EGFP^{high} cells (Fig. 2), indicating that 80% of the F4/80^{high} cells were EGFP^{high}. Thus, we concluded that the increase in KCs in 10 days comes from the spontaneous supply of native KCs. We also observed that exogenous peritoneal macrophages had difficulty migrating to the liver. This means that KCs are moved to the liver by some unique mechanism using specific attractants. We checked the apoptotic response during KC transplantation. A TUNEL assay was performed to assess apoptosis following KC (WT-KC) injection. However, TUNEL-positive cell numbers were not different among them (Fig. 4). This may suggest that the regulatory mechanism of the KC population consists of earlier stages, including stages before migration into the parenchymal area of the liver. The liver sinusoidal area or its endothelial cells (LSECs) may play an important role.

These results suggest the existence of a mechanism for regulating the number of KCs. To confirm this hypothesis, we compared the distribution of KCs in the liver between KC-transplanted mice and control (PBS-injected) mice. IHC revealed that KC distribution and cell numbers were not different between KC-transplanted mice and control mice (Fig. 2).

To confirm the KC migration into the liver by genetic approach, we used Nucling-KO mice. On the other hand, we are interested in the KO mice to reveal the importance of KCs to develop inflammatory diseases, including metabolic syndrome. We previously reported that Nucling deficiency led to a decrease of KCs in the liver. Nucling is expressed in both parenchymal cells and nonparenchymal cells including KCs in the liver of mice [21]. In addition, Nucling-KO mice have shown a tendency to suffer from nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD) (unpublished data), which may lead to metabolic syndrome. However, the physiological function of Nucling in the liver is still unclear. We are planning to experiment using Nucling-KO mice to reveal the importance of KCs in developing inflammatory liver diseases.

Here we showed that i.p. injection is very useful for the transplantation of KCs and that native KCs can be spontaneously supplied through external stimulation. However, the mechanism still needs to be elucidated.

Funding

This work was supported by MEXT KAKENHI, Japan [Grant Number JP16K15333]

Declaration of interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to express our gratitude to all those who helped during the writing of this paper. The authors would like to express our heartfelt gratitude to Professor Kazumi Ishidoh and Professor Kenji Aki. The authors are also greatly indebted to many students of Tokushima Bunri University, who helped take care of the mice and clean

the animal room. The authors are also greatly indebted to Dr. Yuji Shishido of Tokushima University, who helped us obtain the paper resources, and many people of Tokushima University, who also provided help. The authors are also greatly indebted to Dr. Daigo Sumi and Dr. Takafumi Hara of Tokushima Bunri University, who helped us use Guava@easyCyte™ and BZ-X710 fluorescence microscopy.

Last, our thanks would go to our beloved family for their loving considerations and great confidence in us throughout these years.

References

- [1] B. Gao, W. Il Jeong, Z. Tian, Liver: an organ with predominant innate immunity, *Hepatology* 47 (2) (2008) 729–736.
- [2] R.W. Crofton, M.M.C. Diesselhoff-Den Dulk, R. Van Furth, The origin, kinetics, and characteristics of the kupffer cells in the normal steady state, *J. Exp. Med.* 148 (1) (1978) 1–17.
- [3] D.A. Hume, The mononuclear phagocyte system, *Curr. Opin. Immunol.* (2006).
- [4] I. Klein, J.C. Cornejo, N.K. Polakos, B. John, S.A. Wuensch, D.J. Topham, et al., Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow-derived and sessile hepatic macrophages, *Blood* 110 (12) (2007) 4077–4085.
- [5] S. Merlin, K.K. Bhargava, G. Ranaldo, D. Zanolini, C.J. Palestro, L. Santambrogio, et al., Kupffer cell transplantation in mice for elucidating monocyte/macrophage biology and for potential in cell or gene therapy, *Am J Pathol [Internet]* 186 (3) (2016) 539–551, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.002>. Available from: .
- [6] K. Decker, Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells), *Eur. J. Biochem.* 192 (2) (1990) 245–261.
- [7] A. Neyrinck, C. Gomez, N. Delzenne, Precision-cut liver slices in culture as a tool to assess the physiological involvement of Kupffer cells in hepatic metabolism, *Comp. Hepatol.* 3 (Suppl 1) (2004) S45.
- [8] S.-Q. Yang, H.Z. Lin, M.D. Lane, M. Clemens, A.M. Diehl, Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (6) (1997) 2557–2562.
- [9] M.A.E. Anna Diehl, Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282 (1 45–1) (2002) 1–5.
- [10] A.M. Neyrinck, P.D. Cani, E.M. Dewulf, F. De Backer, L.B. Bindels, N.M. Delzenne, Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity, *Biochem Biophys Res Commun [Internet]* 385 (3) (2009) 351–356, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.070>. Available from: .
- [11] M. Ikarashi, H. Nakashima, M. Kinoshita, A. Sato, M. Nakashima, H. Miyazaki, et al., Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 94 (6) (2013) 1325–1336.
- [12] C.-Y. Yang, J.-B. Chen, T.-F. Tsai, Y.-C. Tsai, C.-Y. Tsai, P.-H. Liang, et al., CLEC4F is an inducible C-type lectin in F4/80-positive cells and is involved in alpha-galactosylceramide presentation in liver [Internet], *PLoS One* 8 (6) (2013 Jun 6), e65070, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065070>. Available from: .
- [13] D. Meng, Y. Qin, N. Lu, K. Fang, Y. Hu, Z. Tian, et al., Kupffer cells promote the differentiation of adult liver hematopoietic stem and progenitor cells into lymphocytes via ICAM-1 and LFA-1 interaction, *Stem Cells Int.* 2019 (2019).
- [14] G.J. Bellington, H. Caldwell, S.E. Howie, I. Dransfield, C. Haslett, In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes, *J Immunol [Internet]* 157 (6) (1996) 2577–2585. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8805660>.
- [15] G.S. Chen, H.Z. Qi, Effect of Kupffer cells on immune tolerance in liver transplantation, *Asian Pac J Trop Med [Internet]* 5 (12) (2012) 970–972, [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60184-9](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60184-9). Available from: .
- [16] A. Ray, B.N. Dittel, Isolation of mouse peritoneal cavity cells, *J Vis Exp* 35 (2010) 9–11.
- [17] T. Hoppo, J. Komori, R. Manohar, D.B. Stolz, E. Lagasse, Rescue of lethal hepatic failure by hepatic lymph nodes in mice, *Gastroenterology* 140 (2) (2011) 656–666, e2.
- [18] A.T. Nguyen-Lefebvre, A. Horuzsko, Kupffer cell metabolism and function, *J Enzymol Metab [Internet]* 1 (1) (2016) 1–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26937490> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4771376>.
- [19] P. Italiani, D. Boraschi, From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation, *Front. Immunol.* 5 (OCT) (2014) 1–22.
- [20] T.S. Zeng, F.M. Liu, J. Zhou, S.X. Pan, W.F. Xia, L.L. Chen, Depletion of Kupffer cells attenuates systemic insulin resistance, inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice, *Endocr. J.* 62 (7) (2015) 615–626.
- [21] T. Sakai, L. Liu, X. Teng, N. Ishimaru, R. Mukai-Sakai, N.H. Tran, et al., Inflammatory disease and cancer with a decrease in Kupffer cell numbers in Nucling-knockout mice, *Int J Cancer* 126 (5) (2010) 1079–1094.