

201227038A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

炎症により誘導されるビタミンA非含有細胞の
マトリクス産生とその機序
—肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した
線維化防御標的の発見—

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝霧 成挙

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

炎症により誘導されるビタミンA非含有細胞のマトリクス産生とその機序 —肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した線維化防御標的の発見— 朝霧 成挙	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した臨床検体の解析	4
研究分担者 上本 伸二	
2. ビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞の性状解析	10
研究分担者 祝迫 恵子、池田 一雄	
3. 肝線維化モデルマウスの評価	14
研究分担者 武田 憲彦	

III. 研究成果の刊行に関する一覧

17

IV. 研究成果の刊行物・別刷

18

I. 総括研究報告

炎症により誘導されるビタミン A 非含有細胞のマトリクス産生とその機序
—肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した線維化防御標的の発見—

研究代表者 朝霧 成挙 京都大学 医学系研究科 特定准教授

研究要旨:

肝線維症は、肝臓におけるコラーゲンを主とした細胞外基質(ECM)の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変であり、肝硬変の治療法は肝移植を除けば対症療法のみである。肝線維化の進行を阻止する治療薬を開発することは、医学的にも医療経済上も重要であるが、現在、臨床的に有効な薬剤は存在しない。本研究は、線維化モデル動物を用いた基礎的な解析を基に、肝炎症において誘導されるビタミン A 非含有細胞に着目し、肝線維症の新たな治療標的としての可能性を見い出すことを目的とするものである。

A. 研究目的

慢性肝炎病態では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の産生・沈着があるが、肝内での過剰な ECM 沈着には、肝実質細胞の絶対数の減少が伴い、肝機能低下をもたらす。さらに近年、詳細は不明なもの、ECM 沈着 が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者の QOL を考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

当該共同研究グループ祝迫、上本、朝霧ら、ならびに カリフォルニア大学 David Brenner らは、Collagen promoter-GFP マウスを用いた実験から、ビタミン A を含有しない細胞系列(非肝星細胞系列)も、肝硬変進行時にコラーゲンを産生するという予備知見を得ている。

肝臓の筋線維芽細胞は、慢性肝障害に応じて活性化され、コラーゲンを主体とした ECM を盛んに分泌して組織の線維性瘢痕変性を導く。一方、肝星細胞は、肝傷害時

に増殖してコラーゲンを産生することから、慢性肝炎における肝線維化の責任細胞と目されていた。実際、肝硬変治療薬の多くは、肝星細胞を標的として研究が進められてきた経緯がある。しかし、広範の研究にもかかわらず、肝硬変の進行途上で ECM を分泌する細胞(筋線維芽細胞)が、肝星細胞系列だけで構成されているのか否かについては決着がついていない。もし、活性化肝星細胞以外にも、ECM の過剰沈着に関与する細胞があり、肝星細胞とは異なる mode of action で炎症に反応して ECM を産生したり、あるいは肝内で特異的局在を示すとしたら、肝硬変の進行を遮断するための治療ターゲットとなる可能性がある。

B. 研究方法

そこで本研究では、下記目的を設定し、研究を推進した。

(I) 動物モデルを用いて、肝障害、炎症時にコラーゲンを産生し、肝線維化に関与する細胞系列 (およびその起源)を網羅的に同定。

(II) 同定した細胞(群)が、どのようなメカニズムで肝障害、炎症に呼応して ECM を産生するのか(またその機序は肝星細胞とは異なるのか)を検討。

—また平成 25 年度以降、(I)、(II)に

ついて一定の成果が得られた場合の発展的課題として、-

(Ⅲ) ヒト細胞(生検検体、病理検体)において、ECM 産生細胞をモニターできる系を確立し、ヒトのウイルス性肝炎、あるいは、他の種々肝炎病態において、肝星細胞以外の細胞が、ECM 産生に関与するの可否かを検討する。また、肝臓移植時のサンプルを用いて、肝炎や肝硬変の進行具合により、細胞系列ごとの肝線維化への寄与率が変化するかを検討する。

以上の検討により、直接的には、肝硬変を阻止するための新たな治療標的の候補を上げることを平成 24 年度の課題とした。

遺伝子組換え動物の扱いは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と、その関係法令に従い、適切な拡散防止措置を講じて行うこととした。具体的には、京都大学組換え DNA 実験安全管理委員会の承認を経て、「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程」と「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程施行細則」に沿って実施する。動物実験は、京都大学医学系研究科・動物実験委員会の承認を経て、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」と「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」に沿って行うものとした。

C. 研究結果

肝炎モデルマウスからコラーゲン産生細胞を分取する方法を確立

Collagen $\alpha 1(I)$ promoter-GFP トランスジェニックマウス[説明: 蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子と、これに連結した Collagen $\alpha 1(I)$ 遺伝子座の制御シーケンスが遺伝子導入されたマウスであり、この系統では細胞内で Collagen $\alpha 1(I)$ promoter が活性化した場合に GFP を発現する仕組みが構築されている]を用いて、四塩化炭素投与、bile duct ligation を行い、

肝炎・肝臓線維化モデルを作成した。Collagenase type IV をマウスの門脈から灌流して肝組織を消化し、肝非実質細胞(細胞外マトリクス産生細胞を含む)を採取した。FACS にて、ビタミン A 含有×GFP 発現を指標に解析を行ったところ、四塩化炭素投与モデルでは、GFP を発現する細胞(コラーゲンを主とした細胞外マトリクスを産生する細胞)の 80%以上がビタミン A を含有しているのに対し、bile duct ligation モデルの GFP 陽性細胞のビタミン A 含有細胞は 56%であることがわかった(図 1)。ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞を各モデルからセルソーターで分取し、プラスチックディッシュ上での培養を試みた。初代培養肝星細胞の培養法でいずれの分画も培養が可能であった。形態観察から、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞の起源は肝星細胞、ビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞の起源は、胆管周囲線維芽細胞と考えられる。

ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の性状解析

ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞をセルソーターにより分取し、培養を行った。細胞外マトリクス産生の刺激因子である TGF $\beta 1$ や肝星細胞のアポトーシスを誘導する β NGF を添加し、関連遺伝子の発現レベルを RT-PCR で比較した。TGF $\beta 1$ の添加により、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞のいずれにおいても Collagen $\alpha 1(I)$, α SMA, TIMP1 などの発現が上昇し、両者に差は認められなかった。一方、 β NGF の添加では、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞のみで Bcl-2family の遺伝子発現が上昇し、ビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞では反応がみられなかった。

ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞のマーカーを同定

ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞について、マイク

ロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、Mesothelin がビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞に高発現していることを見出した。マウス肝の免疫組織学的解析によって、蛋白レベルでの発現を確認したところ、図2 に示すように Mesothelin の発現は、胆管結紮モデルの肝非実質細胞に認められた。

D. 考察

肝炎症時に誘導されるビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の存在が確認され、その特異的のマーカーとして Mesothelin が同定された。

これまで、肝硬変治療薬の多くは肝星細胞を標的として研究が進められてきたが、臨床的に有効な薬剤は皆無と言わざるをえないのが現状である。このことは、従来の肝線維化の治療が、星細胞以外の細胞系列を起源とする細胞外マトリクス産生細胞には、無効であった可能性が考えられる。

肝星細胞は筋線維芽細胞に形質転換する際、ビタミン A を含有する細胞内の油滴を放出するといわれているが、僅かながら残存しており FACS で感知することは可能と判断した。これに基づき、細胞外マトリクス産生細胞をビタミン A 含有、非含有に分けたところ、これらの細胞群は異なる性質を有し、起源を異にすると考えられた。我々は、この起源を胆管周囲線維芽細胞と考えて、さらに解析を進めている。

E. 結論

肝炎症時に誘導されるビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の存在が確認され、起源が肝星細胞とは異なる細胞系列であることが示された。

肝星胞以外の細胞系列を起源とするこれらの細胞外マトリクス産生細胞は、新たな線維化治療の標的となりうると期待される。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shih VF, Asagiri M et al. Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- κ B pathways.

Nature Immunology. 2012;13(12):1162-70.

Wang VY, Asagiri M et al. The transcriptional specificity of NF- κ B dimers is coded within the κ B DNA response elements.

Cell Reports. 2012 Oct 25;2(4):824-39.

Kanemaru K, Asagiri M et al. Epidermal phospholipase C δ 1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice.

Nature Communications. 2012 Jul 17;3:963.

H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。

II. 分担研究報告

肝硬変の進行遮断と肝機能の再生を目指した臨床検体の解析

研究分担者 上本 伸二 京都大学 医学研究科 肝胆膵・移植外科学 教授

研究要旨:

肝線維症は、肝臓におけるコラーゲンを主とした細胞外基質の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変であり、肝硬変の治療法は肝移植を除けば対症療法のみである。

当科では肝臓、胆道、膵臓の悪性腫瘍に対する外科的切除、および内科的に治療不可能な末期の肝疾患に対して肝移植を行っている。原疾患としては、ウイルス性肝硬変、肝細胞癌、胆汁うっ滞性肝硬変が移植症例の約90%を占める。肝移植後のグラフト機能低下時の肝生検の病理像では、線維化の進行を認めることが多い。また、肝切除後の肝再生不良は、術後肝不全という重篤な病態に陥る危険がある。

外科の立場からも、肝硬変の進行遮断と肝機能の再生のための治療法開発は急務である。基礎的な研究で得られた結果を臨床検体で検証すべく、患者さんの同意を得て、臨床検体の採取・保管し解析を行っている。

A. 研究目的

慢性肝炎では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクスの産生・沈着があるが、肝内での過剰な細胞外マトリクス沈着は、肝実質細胞の絶対数の減少を伴い、肝機能低下をもたらす。さらに近年、詳細は不明なものの、細胞外マトリクス沈着が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者のQOLを考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

生体肝移植が、健常ドナーの肝臓の4～6割と生理的な肝臓に比較して小さな肝臓をグラフトして移植するのに対し、脳死肝移植では、10割の肝体積が確保される。これは、肝再生を必須とする生体肝移植よりも術後の肝機能回復において圧倒的に有利な状況である。2010年7月の改正臓器移植法案全面施行後、脳死肝移植症例数は

増加している。しかし、まだ我が国の臓器提供数は欧米に比し極端に少ない。ドナーアクションプログラムの導入、臓器移植ネットワークの強化、一般市民への啓蒙等、実践すべき課題は山積している。医療現場での課題として、適合ドナーの出現までの待機期間に肝機能を悪化させないこと、移植後の肝機能を良好に維持することがあげられる。肝線維化の抑制は、肝機能維持に直結する重要な戦略と期待される。

臨床検体でも α smooth muscle actin (SMA)陽性細胞として肝臓の筋線維芽細胞は識別可能である。筋線維芽細胞は、慢性肝障害に呼応して出現し、コラーゲンを主体とした細胞外マトリクスを盛んに分泌して組織の線維性瘢痕変性を導く。

肝星細胞は、肝線維化の責任細胞と目され、多くの研究が行われてきたが、in vitroで肝星細胞による細胞外マトリクス産生抑制効果が認められても、in vivoでは肝線維化抑制効果が十分得られない。

新たな線維化の治療標的を見い出すため、臨床検体を用いて細胞外マトリクス産生細胞の詳細な解析を行う。

B. 研究方法

ヒト細胞(病理組織検体)において、細胞外マトリクス産生細胞をモニターできる系を確立する。肝移植の適応となるウイルス性肝硬変、胆道閉鎖症、先天性代謝異常症、バッド・キアリ症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、二次性胆汁性肝硬変、進行性肝内胆汁うっ滞、移植肝不全など、肝線維化を伴う肝疾患の手術検体を採取・保管する。

種々の肝疾患において、肝星細胞以外の細胞が、細胞外マトリクス産生に関与するのか否かを検討する。また、肝細胞以外を起源とする細胞系列が細胞外マトリクスを産生することが確認された場合は、細胞系列ごとの肝線維化への寄与率が変化するかを検討する。

以上の検討を行うため、平成 24 年度は臨床検体の採取・保管と解析の環境整備を課題とした。

患者試料の使用とヒト遺伝子解析研究の必要性が生じた場合には、厚生労働省と文部科学省の臨床研究に関する倫理指針と疫学研究に関する倫理指針に沿い、京都大学の「臨床研究倫理指針」「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「ヒトを対象とした医学研究の倫理指針」に従いインフォームド・コンセントによる同意書を得た上、京都大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究管理規程の定めるところにより、ヒトゲノム・遺伝子解析研究管理委員会の審査と、総長の承認をもって執り行い、いずれもステップにおいても個人情報の取り扱いに特段の配慮を講じ、法令に従って実施することとした。

C. 研究結果

ウイルス性肝硬変、アルコール性肝硬変、胆道閉鎖症(再移植を含む)、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎で肝移植を施行した症例の手術標本を採取・保管した。

マウスでは、肝星細胞の特異的マーカーとして Desmin, Vimentin, GFAP (Glial fibrillary acidic protein)が用いられているが、今回行った検討では、ヒト肝臓の場合、Desmin の発現は少なく、Vimentin がヒト肝星細胞のマーカーとして有用であることがわかった。GFAP は、ヒト肝星細胞では発現していないという報告があり、我々の解析でも発現は認められなかった。

D. 考察

これまで、肝硬変治療薬の多くは肝星細胞を標的として研究が進められてきたが、臨床的に有効な薬剤は皆無と言わざるをえないのが現状である。このことは、従来の肝線維化の治療が、星細胞以外の細胞系列を起源とする細胞外マトリクス産生細胞には、無効であった可能性が考えられる。

マウス線維化モデルで確認された、ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞に特異的に発現している膜抗原について、病理標本を用いて免疫組織学的解析を進めているところである。

E. 結論

肝炎症時に誘導されるビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞は、肝星細胞以外の細胞系列を起源とすると考えられる。これらの細胞外マトリクス産生細胞は、新たな線維化治療の標的となりうると期待される。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yagi S, Uemoto S. Small-for-size syndrome in living donor liver transplantation. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2012 Dec 15;11(6):570-6.

- Kitamura K, Uemoto S et al. Orthotopic small bowel transplantation in rats. *J Vis Exp*. 2012 Nov 6;(69).
- Kaido T, Uemoto S et al. Pre- and perioperative factors affecting infection after living donor liver transplantation. *Nutrition*. 2012 Nov-Dec;28(11-12):1104-8.
- Ishibashi H, Uemoto S et al. Genome-wide association study identifies TNFSF15 and POU2AF1 as susceptibility loci for primary biliary cirrhosis in the Japanese population. *Am J Hum Genet*. 2012 Oct 5;91(4):721-8.
- Miyagawa-Hayashino A, Uemoto S et al. Progressive graft fibrosis and donor-specific human leukocyte antigen antibodies in pediatric late liver allografts. *Liver Transpl*. 2012 Nov;18(11):1333-42.
- Takada Y, Uemoto S et al. Long-term quality of life of donors after living donor liver transplantation. *Liver Transpl*. 2012 Nov;18(11):1343-52.
- Kajiwara M, Uemoto S et al. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):12538-43.
- Nakamura K, Uemoto S et al. Sorafenib attenuates monocrotaline-induced sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol*. 2012 Nov;57(5):1037-43.
- Aini W, Uemoto S et al. Telomere shortening and karyotypic alterations in hepatocytes in long-term transplanted human liver allografts. *Transpl Int*. 2012 Sep;25(9):956-66.
- Elgend HM, Uemoto S et al. Pre transplant serum magnesium level predicts outcome after pediatric living donor liver transplantation. *Ann Transplant*. 2012 Apr-Jun;17(2):29-37.
- Hori T, Uemoto S et al. Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique. *World J Gastroenterol*. 2012 Jun 14;18(22):2767-74.
- Abdelaziz O, Uemoto S et al. Endovascular management of early hepatic artery thrombosis after living donor liver transplantation. *Transpl Int*. 2012 Aug;25(8):847-56.
- Murase K, Uemoto S et al. Use of noninvasive ventilation for pediatric patients after liver transplantation: decrease in the need for reintubation. *Liver Transpl*. 2012 Oct;18(10):1217-25.
- Hori T, Uemoto S et al. How transplant surgeons can overcome the inevitable insufficiency of allograft size during adult living-donor liver transplantation: strategy for donor safety with a smaller-size graft and excellent recipient results. *Clin Transplant*. 2012 May-Jun;26(3):E324-34.
- Ohashi N, Uemoto S et al. Matrix metalloproteinase-9 contributes to parenchymal hemorrhage and necrosis in the remnant liver after extended hepatectomy in mice. *World J Gastroenterol*. 2012 May 21;18(19):2320-33.
- Sakamoto S, Uemoto S et al. The role of liver transplantation for congenital extrahepatic portosystemic shunt. *Transplantation*. 2012 Jun 27;93(12):1282-7.

Yamamoto K, Uemoto S et al. An eClinical trial system for cancer that integrates with clinical pathways and electronic medical records. *Clin Trials*. 2012 Aug;9(4):408–17.

Hori T, Uemoto S et al. Hepatic arterial reconstruction for orthotopic liver transplantation in the rat. *J Surg Res*. 2012 Dec;178(2):907–14.

Gardner LB, Uemoto S et al. Effect of specific activation of γ -aminobutyric acid receptor in vivo on oxidative stress-induced damage after extended hepatectomy. *Hepatol Res*. 2012 Nov;42(11):1131–40.

Yamashiki N, Uemoto S et al. Outcomes after living donor liver transplantation for acute liver failure in Japan: results of a nationwide survey. *Liver Transpl*. 2012 Sep;18(9):1069–77.

Hori T, Uemoto S et al. Impact of hepatic arterial reconstruction on orthotopic liver transplantation in the rat. *J Invest Surg*. 2012 Aug;25(4):242–52.

Egawa H, Uemoto S et al. Non-inflammatory centrilobular sinusoidal fibrosis in pediatric liver transplant recipients under tacrolimus withdrawal. *Hepatol Res*. 2012 Sep;42(9):895–903.

Nishijima N, Uemoto S et al. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One*. 2012;7(4):e35052.

Kamimura R, Uemoto S et al. Comparative study of transplantation of hepatocytes at

various differentiation stages into mice with lethal liver damage. *Cell Transplant*. 2012;21(11):2351–62.

Hori T, Uemoto S et al. Hepatic arterial reconstruction with a short-term patency by using micro T-tube in rat liver transplantation. *Microsurgery*. 2012 Mar;32(3):253–4.

Shehata MR, Uemoto S et al. Use of recipient's left colic artery for arterial reconstruction during liver transplantation in Alagille syndrome with vasculopathy: a case report. *Transplantation*. 2012 Mar 27;93(6):e20–1.

Tsuruyama T, Uemoto S et al. Invariant natural killer T cells infiltrate intestinal allografts undergoing acute cellular rejection. *Transpl Int*. 2012 May;25(5):537–44.

Kaido T, Uemoto S et al. Effects of post-transplant enteral nutrition with an immunomodulating diet containing hydrolyzed whey peptide after liver transplantation. *World J Surg*. 2012 Jul;36(7):1666–71.

Horikoshi Y, Uemoto S et al. Successful living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure that manifested immediately after cesarean delivery. *ASAIO J*. 2012 Mar–Apr;58(2):174–6.

Kanamune J, Uemoto S et al. Attenuation of murine graft-versus-host disease by a tea polyphenol. *Cell Transplant*. 2012;21(5):909–18.

Okamoto T, Uemoto S et al. Prevention of trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis by oral administration of a poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere

containing prostaglandin E₂ receptor subtype 4 agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 May;341(2):340–9.

Mori A, Uemoto S et al. Standard hepatic vein reconstruction with patch plasty using the native portal vein in adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2012 May;18(5):602–7.

Yamanaka K, Uemoto S et al. Early evaluation of transcatheter arterial chemoembolization–refractory hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2012 Mar;47(3):343–6.

Masui T, Uemoto S et al. Delayed gastric emptying improved by straight stomach reconstruction with twisted anastomosis to the jejunum after pylorus–preserving pancreaticoduodenectomy (PPPD) in 118 consecutive patients at a single institution. *Surg Today.* 2012 May;42(5):441–6.

Tanizawa K, Uemoto S et al. Chin K. Beneficial effects of continuous positive airway pressure therapy in a pediatric intestinal transplant recipient with obstructive sleep apnea. *Sleep Med.* 2012 Mar;13(3):321.

Masui T, Uemoto S et al. Successful neoadjuvant treatment with radiochemotherapy and systemic chemotherapy for the locally advanced pancreatic head cancer: report of a case. *Hepatogastroenterology.* 2011 Sep–Oct;58(110–111):1809–13.

Ogawa E, Uemoto S et al. Living–donor liver transplantation for moderate or severe porto–pulmonary hypertension accompanied

by pulmonary arterial hypertension: a single–centre experience over 2 decades in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2012 Nov;19(6):638–49.

Yano I, Uemoto S et al. Significance of trough monitoring for tacrolimus blood concentration and calcineurin activity in adult patients undergoing primary living–donor liver transplantation. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012 Mar;68(3):259–66.

Murakawa Y, Uemoto S et al. Liver transplantation for severe hepatitis in patients with common variable immunodeficiency. *Pediatr Transplant.* 2012 Sep;16(6):E210–6.

Koike A, Uemoto S et al. Dynamic mobility of immunological cells expressing S100A8 and S100A9 in vivo: a variety of functional roles of the two proteins as regulators in acute inflammatory reaction. *Inflammation.* 2012 Apr;35(2):409–19.

Kimura Y, Uemoto S et al. Improved hypothermic short–term storage of isolated mouse islets by adding serum to preservation solutions. *Islets.* 2013 Jan–Feb;5(1):45–52.

Nagai K, Uemoto S et al. Impact of venous–systemic oxygen persufflation with nitric oxide gas on steatotic grafts after partial orthotopic liver transplantation in rats. *Transplantation.* 2013 Jan 15;95(1):78–84.

Zhao X, Uemoto S et al. Intragraft V δ 1 γ δ T cells with a unique T–cell receptor are closely associated with pediatric semiallogeneic liver transplant tolerance. *Transplantation.* 2013 Jan 15;95(1):192–202.

Odori S, Uemoto S et al. GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function. *Metabolism*. 2013 Jan;62(1):70-8.

Ueda Y, Uemoto S et al. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living-donor liver transplantation. *Hepatol Res*. 2013 Jan;43(1):67-71.

Tsuruyama T, Uemoto S et al. Histology of intestinal allografts: lymphocyte apoptosis and phagocytosis of lymphocytic apoptotic bodies are diagnostic findings of acute rejection in addition to crypt apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 2013 Feb;37(2):178-84.

2. 学会発表

Uemoto S. Microsurgery in biliary anastomosis/The pros and cons Asian living donor liver transplantation conference 2012. Seoul (Korea)

Uemoto S. Evolution of pediatric liver transplantation in Kyoto and role of pediatric surgeons. The 51th annual congress of Taiwanese association of pediatric surgeons. Taipei (Taiwan)

上本 伸二. 門脈血栓症を有する症例の生体肝移植レシピエント手術／教育ビデオシンポジウム3 (肝臓). 第 67 回日本消化器外科学会総会. 富山

上本 伸二. 肝移植レシピエント手術／State of Art 講演2. 第 48 回日本移植学会総会. 名古屋

上本 伸二. 肝臓移植の 24 年／特別講演 第 8 回日本移植・再生医療看護学会. 京都

H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。

ビタミン A 非含有マトリクス産生細胞の性状解析

研究分担者 祝迫 恵子 大阪市立大学 医学研究科 病院講師

研究分担者 池田 一雄 大阪市立大学 医学研究科 教授

研究要旨：

肝線維症は、肝臓におけるコラーゲンを主とした細胞外基質(ECM)の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変であり、肝硬変の治療法は肝移植を除けば対症療法のみである。肝線維化の進行を阻止する治療薬を開発することは、医学的にも医療経済上も重要であるが、現在、臨床的に有効な薬剤は存在しない。本研究は、線維化モデル動物を用いた基礎的な解析を基に、肝炎症において誘導されるビタミン A 非含有細胞に着目し、肝線維症の新たな治療標的としての可能性を見出すことを目的とするものである。

A. 研究目的

慢性肝炎病態では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の産生・沈着があるが、肝内での過剰な ECM 沈着には、肝実質細胞の絶対数の減少が伴い、肝機能低下をもたらす。さらに近年、詳細は不明なものの、ECM 沈着が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者の QOL を考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

当該共同研究グループ祝迫、上本、朝霧ら、ならびに カリフォルニア大学 David Brenner らは、Collagen promoter-GFP マウスを用いた実験から、ビタミン A を含有しない細胞系列(非肝星細胞系列)も、肝硬変進行時にコラーゲンを産生するという予備知見を得ている。

肝臓の筋線維芽細胞は、慢性肝障害に応じて活性化され、コラーゲンを主体とした ECM を盛んに分泌して組織の線維性瘢痕変性を導く。一方、肝星細胞は、肝傷害時

に増殖してコラーゲンを産生することから、慢性肝炎における肝線維化の責任細胞と目されていた。実際、肝硬変治療薬の多くは、肝星細胞を標的として研究が進められてきた経緯がある。しかし、広範の研究にもかかわらず、肝硬変の進行途上で ECM を分泌する細胞(筋線維芽細胞)が、肝星細胞系列だけで構成されているのか否かについては決着がついていない。もし、活性化肝星細胞以外にも、ECM の過剰沈着に関与する細胞があり、肝星細胞とは異なる mode of action で炎症に反応して ECM を産生したり、あるいは肝内で特異的局在を示すとしたら、肝硬変の進行を遮断するための治療ターゲットとなる可能性がある。

B. 研究方法

そこで本研究では、下記目的を設定し、研究を推進した。

(I) 動物モデルを用いて、肝障害、炎症時にコラーゲンを産生し、肝線維化に関与する細胞系列 (およびその起源)を網羅的に同定。

(II) 同定した細胞(群)が、どのようなメカニズムで肝障害、炎症に呼応して ECM を産生するのか(またその機序は肝星細胞とは異なるのか)を検討。

遺伝子組換え動物の扱いは、「遺伝子組

換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と、その関係法令に従い、適切な拡散防止措置を講じて行うこととした。具体的には、京都大学組換え DNA 実験安全管理委員会の承認を経て、「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程」と「京都大学組換え DNA 実験安全管理規程施行細則」に沿って実施する。動物実験は、京都大学医学系研究科・動物実験委員会の承認を経て、「京都大学における動物実験の実施に関する規程」と「京都大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」に沿って行うものとした。

C. 研究結果

① 肝炎モデルマウスからコラーゲン産生細胞を分取する方法の確立

Collagen $\alpha 1(I)$ promoter-GFP トランスジェニックマウス[説明: 蛍光タンパク質 GFP をコードする遺伝子と、これに連結した Collagen $\alpha 1(I)$ 遺伝子座の制御シーケンスが遺伝子導入されたマウスであり、この系統では細胞内で Collagen $\alpha 1(I)$ promoter が活性化した場合に GFP を発現する仕組みが構築されている]を用いて、四塩化炭素投与、bile duct ligation を行い、肝炎・肝臓線維化モデルを作成した。Collagenase type IV をマウスの門脈から灌流して肝組織を消化し、肝非実質細胞(細胞外マトリクス産生細胞を含む)を採取した。FACS にて、ビタミン A 含有×GFP 発現を指標に解析を行ったところ、四塩化炭素投与モデルでは、GFP を発現する細胞(コラーゲンを主とした細胞外マトリクスを産生する細胞)の 80%以上がビタミン A を含有しているのに対し、bile duct ligation モデルの GFP 陽性細胞のビタミン A 含有細胞は 56%であることがわかった(図 1)。ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞を各モデルからセルソーターで分取し、プラスチックディッシュ上で

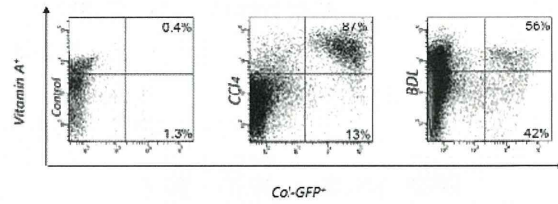


図 1 FACS による細胞外マトリクス産生細胞の解析: コントロールでは GFP 陽性細胞はほとんど存在しないが、四塩化炭素投与モデルではビタミン A を含有した GFP 陽性細胞が出現する。一方、胆管結紮モデルでは、ビタミン A 非含有細胞が GFP 陽性細胞の約半数を占めている。

の培養を試みた。初代培養肝星細胞の培養法でいずれの分画も培養が可能であった。形態観察から、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞の起源は肝星細胞、ビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞の起源は、胆管周囲線維芽細胞と考えられる。

② ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の性状解析

ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞をセルソーターにより分取し、培養を行った。細胞外マトリクス産生の刺激因子である TGF $\beta 1$ 、肝星細胞の増殖刺激因子 PDGF、肝星細胞のアポトーシスを誘導する β NGF をそれぞれ添加し、関連遺伝子の発現レベルを RT-PCR で比較した。TGF $\beta 1$ の添加により、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞のいずれにおいても Collagen $\alpha 1(I)$ 、 α SMA、TIMP1 などの pro-fibrogenic genes の発現が上昇し、両者

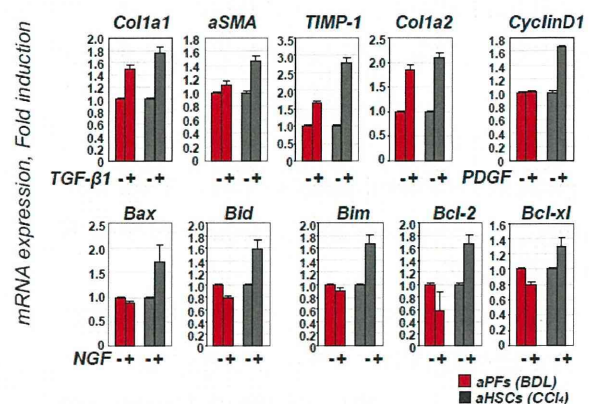


図 2 mRNA 発現解析

に差は認められなかった。一方、PDGFの添加では、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞のみで CyclinD1 の発現が上昇した。 β NGF の添加では、ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞のみで Bcl-2family の遺伝子発現が上昇し、ビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞では反応がみられなかった(図2)。

③ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞のマーカーを同定

ビタミン A 含有 GFP 陽性細胞とビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞について、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、MesothelinとThy1 がビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞に高発現していることを見出した。マウス肝の免疫組織学的解析によって、蛋白レベルでの発現を確認したところ、図 3 に示すように Mesothelin の発現は、胆管結紮モデルの肝非実質細胞に認められた。

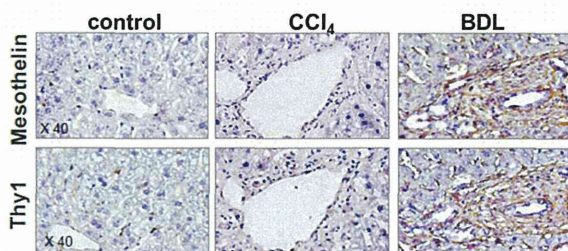


図3 マウス免疫組織染色

D. 考察

肝星細胞は筋線維芽細胞に形質転換する際、ビタミン A を含有する細胞内の油滴を放出するといわれているが、ビタミン A は僅かながら残存しており FACS で感知することが可能であると考えた。これに基づき、細胞外マトリクス産生細胞をビタミン A 含有、非含有に分けた。この解析から、ビタミン A 含有、非含有細胞が線維化に寄与する割合が線維化の原因によって異なることが明らかとなった。

細胞外マトリクス産ビタミン A 非含有細胞

の起源は、胆管周囲線維芽細胞と考えられ、特異的なマーカーとして Mesothelin が同定された。

これまで、肝硬変治療薬の多くは肝星細胞を標的として研究が進められてきたが、臨床的に有効な薬剤は皆無と言わざるをえないのが現状である。このことは、従来の肝線維化の治療が、星細胞以外の細胞系列を起源とする細胞外マトリクス産生細胞に無効であった可能性が考えられる。今回我々が同定した、ビタミン A を含有しない細胞外マトリクス産生細胞 (= 肝星細胞以外の細胞系列を起源とする筋線維芽細胞) はその治療標的と期待される。

E. 結論

肝炎症時に誘導されるビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の存在が確認され、起源が肝星細胞とは異なる細胞系列であることが示された。

肝星胞以外の細胞系列を起源とするこれらの細胞外マトリクス産生細胞は、新たな線維化治療の標的となりうると期待される。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Brenner DA, Iwaisako K et al. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012 Jun 6;5 Suppl 1:S17.

Cong M, Iwaisako K et al. Cell signals influencing hepatic fibrosis. *Int J Hepatol*. 2012;2012:158547.

Hirota T, Iwaisako K et al. Identification of small molecule activators of cryptochrome. *Science*. 2012 Aug 31;337(6098):1094-7.

Nakamura K, Iwaisako K et al. Sorafenib attenuates monocrotaline-induced

sinusoidal obstruction syndrome in rats through suppression of JNK and MMP-9. *J Hepatol.* 2012 Nov;57(5):1037-43.

Meng F, Iwaisako et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology.* 2012 Sep;143(3):765-76.

Kisseleva T, Iwaisako K et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 12;109(24):9448-53.

Iwaisako K, Brenner DA et al. Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 22;109(21):E1369-76.

Iwaisako K. et al. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*;27:65-8, 2012.

2. 学会発表

Iwaisako K. et al. Protection from liver fibrosis by a PPAR agonist. the 18th Annual Meeting of the Korean Association for the Study of the Liver Seoul (Korea)

祝迫 恵子. 筋線維芽細胞の起源—肝線維化の基礎研究—、第 9 回大阪肝臓病ワークショップ. 大阪

H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。

肝線維化モデルマウスの評価

研究分担者 武田 憲彦 東京大学医学部附属病院 助教

研究要旨:

研究要旨:

肝線維症は、肝臓におけるコラーゲンを主とした細胞外基質(ECM)の蓄積であり、この病態反応は、ほぼ全ての原因による慢性肝炎に共通である。慢性肝炎の終末像は肝硬変であり、肝硬変の治療法は肝移植を除けば対症療法のみである。肝線維化の進行を阻止する治療薬を開発することは、医学的にも医療経済上も重要であるが、現在、臨床的に有効な薬剤は存在しない。本研究は、線維化モデル動物を用いた基礎的な解析を基に、肝炎症において誘導されるビタミン A 非含有細胞に着目し、肝線維症の新たな治療標的としての可能性を見い出すことを目的とするものである。

A. 研究目的

慢性肝炎病態では組織の傷害と修復反応が繰り返されている。持続的な修復反応の一つに、筋線維芽細胞による細胞外マトリクス (extra cellular matrix: ECM) の産生・沈着があるが、肝内での過剰な ECM 沈着には、肝実質細胞の絶対数の減少が伴い、肝機能低下をもたらす。さらに近年、詳細は不明なものの、ECM 沈着が細胞癌化を促進する可能性も示されている。これらに加え、肝線維化・肝硬変が進行して重篤な肝機能不全に陥ると、現在のところ肝臓機能を人工的に代替する医療は完成されていないため、肝移植しか治療の手立てがない。このため、肝硬変の進行を食い止めることは、患者の QOL を考える上でも、医療経済学的にも大きな意義をもつ。

当該共同研究グループ祝迫、上本、朝霧ら、ならびに カリフォルニア大学 David Brenner らは、Collagen promoter-GFP マウスを用いた実験から、ビタミン A を含有しない細胞系列(非肝星細胞系列)も、肝硬変進行時にコラーゲンを産生しようという予備知見を得ている。

肝臓の筋線維芽細胞は、慢性肝障害に反応して活性化され、コラーゲンを主体とした ECM を盛んに分泌して組織の線維性瘢痕変性を導く。一方、肝星細胞は、肝傷害時

に増殖してコラーゲンを産生することから、慢性肝炎における肝線維化の責任細胞と目されていた。実際、肝硬変治療薬の多くは、肝星細胞を標的として研究が進められてきた経緯がある。しかし、広範の研究にもかかわらず、肝硬変の進行途上で ECM を分泌する細胞(筋線維芽細胞)が、肝星細胞系列だけで構成されているのか否かについては決着がついていない。もし、活性化肝星細胞以外にも、ECM の過剰沈着に関与する細胞があり、肝星細胞とは異なる mode of action で炎症に反応して ECM を産生したり、あるいは肝内で特異的局在を示すとしたら、肝硬変の進行を遮断するための治療ターゲットとなる可能性がある。

B. 研究方法

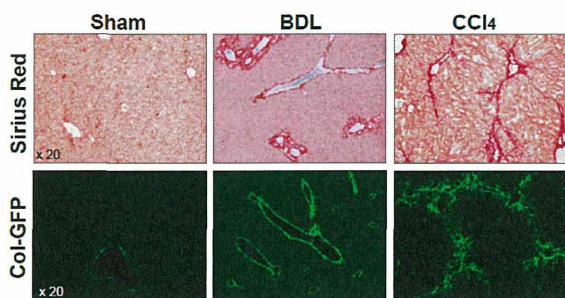
本研究では、Collagen 1(I) promoter-GFP トランスジェニックマウスを用いて、肝線維化モデルを作成した。四塩化炭素による肝線維化は、コーンオイルにより4倍希釈した四塩化炭素 2 μ l/body weight g を3日毎に計 12 回経口投与、Bile duct ligation モデルは、全身麻酔下に開腹し、総胆管を結紮切離し3週間飼育した。

線維肝について病理組織学的、生化学的評価を行った。蛍光顕微鏡下で凍結切片を観察し、GFP の発現によってコラーゲン産

生細胞を同定、確認した。
 遺伝子組換え動物の扱いは、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と、その関係法令に従い、適切な拡散防止措置を講じて行うこととした。具体的には、東京大学組換えDNA 実験安全管理委員会の承認を経て、「東京大学組換えDNA 実験安全管理規程」と「東京大学組換えDNA 実験安全管理規程施行細則」に沿って実施する。動物実験は、東京大学医学系研究科・動物実験委員会の承認を経て、「東京大学における動物実験の実施に関する規程」と「東京大学大学院医学研究科・医学部における動物実験の実施に関する規程」に沿って行うものとした。

C. 研究結果

四塩化炭素投与モデルの肝線維化は Bridging fibrosis を呈し、ヒドロキシプロリン 338.9 ± 21.2 ng/liver mg と野生型の四塩化炭素投与モデルと同等の線維化を示した。Bile duct ligation モデルも portal area 優位な著しい線維化を呈し、ヒドロキシプロリン 547.4 ± 120.6 ng/liver mg と、こちらも野生型の同モデルと同等の線維化を示し



た。GFP の発現を観察すると四塩化炭素投与モデルでは、Bridging fibrosis の部位を中心に portal area にも発現がみられたが、Bile duct ligation モデルでは portal area に集中していた。肝組織のシリウスレッド染色により線維の領域とGFPの発現領域が重なることが確認された。

D. 考察

Collagen $\alpha 1(I)$ promoter-GFP トランスジェ

ニックマウスの線維化は、野生型と同等に誘導されており、細胞外マトリクスの集積部位(=シリウスレッドで染まる部位)とGFPの発現は重なった。よって、マウス肝線維化モデルにおいて、GFP 陽性細胞=細胞外マトリクス産生細胞ということが出来る。

E. 結論

Collagen $\alpha 1(I)$ promoter-GFP トランスジェニックマウスの線維化は、野生型と同等に誘導されていることが確認できた。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Semba H, Takeda N et al. Basic echocardiographic features of patients with latent left ventricular outflow tract obstruction without left ventricular hypertrophy. *Int Heart J.* 2012;53(4):230-3.

Nakao T, Takeda N et al. The efficacy of real-time three-dimensional transoesophageal echocardiography in detecting unicuspid aortic valve. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2012 Nov;13(11):966.

Abe H, Takeda N et al. Sinus of Valsalva aneurysm accompanying bicuspid aortic valve. *Intern Med.* 2012;51(10):1275.

Abe H, Takeda N et al. Successful surgical repair of a giant coronary-pulmonary artery fistula: role of magnetic resonance imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2012 Oct;13(10):826.

Kim JW, Takeda N et al. Loss of fibroblast HIF-1 α accelerates tumorigenesis. *Cancer*

Res. 2012 Jul 1;72(13):3187-95.

Kato N, Takeda N et al. Depressive symptoms are common and associated with adverse clinical outcomes in heart failure with reduced and preserved ejection fraction. J Cardiol. 2012 Jul;60(1):23-30.

Soma K, Takeda N et al. Myocardial involvement in patients with osteogenesis imperfecta. Int Heart J. 2012;53(1):75-7.

Semba H, Takeda N et al. Preliminary report of tolvaptan treatment in Japanese patients with heart failure. Int Heart J. 2012;53(1):72-4.

H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。