

201320031A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 朝霧 成挙

平成26(2014)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—— 研究分担者 上本 伸二	4
2. ビタミン A 非含有細胞の定量的解析—— 研究分担者 祝迫 恵子、池田 一雄	11
3. 肝線維化における細胞外マトリクス産生細胞の定性的解析—— 研究分担者 武田 憲彦	14

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本研究を企画し解析をすすめている。

肝臓の筋線維芽細胞は、慢性肝障害に依りて活性化され、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癒痕

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。我々は、この星細胞とは異なる細胞系列に着目し、解析をしている。

B. 研究方法

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 年度は、(I)、(II) について得られた成果に基づき、追加の課題として

(III) コラーゲン産生細胞の構成を線維化の病因別、病期別に定量的に解析することを試みた。また起源の異なるコラーゲン産生細胞を in vivo やヒト細胞(生検検体、病理検体)においても特定することができるように各細胞の定性的な解析を行い、各々の得的なマーカーを検証した。

更に最終年度では、

(IV) 星細胞、胆管周囲芽細胞がコラーゲン産生細胞に形質転換し、コラーゲンを産生するメカニズムについての解析。

(V) 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 産生に関与するのか否かを検討する。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、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が本研究の課題とした。

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

ビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞の定量的解析

Collagen $\alpha 1(I)$ promoter-GFP トランスジェニックマウスを用いて、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。急性期と慢性期で 2step 灌流法により採取した肝非実質細胞を我々が確立した FACS(ビタミン A 含有 \times GFP 発現を指標とする)によって、コラーゲン産生細胞に占めるビタミン A 非含有細胞の割合について定量的な解析を行った。四塩化炭素投与モデルにおいては、急性期、慢性期と病期に関わらず、コラーゲン産生細胞のうち約 80%が肝星細胞を起源とするビタミン A 含有 GFP 陽性細胞で、肝星細胞を起源とする細胞群が病期を通じて、病態形成に大きく寄与すると考えられた。一方、bile duct ligation モデルでは、結紮後 5 日目では、コラーゲン産生細胞の約 70%が主たる構成細胞であり、慢性期にはビタミン A 含有 GFP 陽性細胞は増加してきて、その比率が約 50%程度に低下することが分かった。病因、さらに病期によってコラーゲン産生細胞の構成は異なり、病態を形成する過程が異なることが示唆された。

細胞外マトリクス産生細胞の定性的解析(特異的マーカーを求めて)

前年度、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、いくつかの分子がビタミン 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。今年度は、臨床検体を用いて星細胞、ビタミン A 非含有 GFP 陽性細胞の起源である胆管周囲線維芽細胞の局在を組織学的に検討した。臨床検体においても閉塞性黄疸を合併した線維肝では、Thy1、Mesothelin 陽性細胞が門脈域に認められた。一方、慢性 C 型肝炎の線

維肝では、陽性細胞がほとんど見られなかった。

D. 考察

胆汁鬱滞を伴う肝炎、肝線維化で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臨床検体でも確認され、その特異的マーカーとして Mesothelin が有用であることが分かった。

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、星細胞以外の胆管周囲線維芽細胞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。

胆管周囲線維芽細胞は、肝星細胞と異なる膜蛋白を発現しており、これらが筋線維芽細胞への形質転換に関与している可能性があることから、これらが抗線維化治療の標的となることが期待される。

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胆管周囲線維芽細胞であることが示された。

マウス胆管周囲線維芽細胞に特異的に発現していると考えられる分子は、臨床検体においても胆汁鬱滞を伴う線維肝の門脈域に高発現しており、胆管周囲線維芽細胞のマーカーとして有用であることが示された。

今後は、これらのマーカーと筋線維芽細胞への形質転換の関連を検討し、抗線維化治療の標的となりうるか否かを検討する。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Soeno Y, Asagiri M et al. Generation of a mouse model with down-regulated U50 snoRNA (SNORD50) expression and its organ-specific phenotypic modulation. PLoS One. 2013;8(8):e72105.

Saito S, Asagiri M et al. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. Hepatol Res. 2013 (in press)

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。一般市民への啓蒙、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 24～25 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。

前年度の解析により、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、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ため、肝星細胞のマーカーとして Vimentin を用い、 α SMA 陽性かつ Vimentin 陰性細胞を星細胞以外の細胞系列を起源とする筋線維芽細胞と考えた。

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

Beppu T, Uemoto S et al. Optimal cut-off value for the number of colorectal liver metastases: a project study for hepatic surgery of the Japanese Society of

Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014;21:169-75.

Chihara Y, Uemoto S et al. Predictive factors for reintubation following noninvasive ventilation in patients with respiratory complications after living donor liver transplantation. PLoS One. 2013;8:e81417.

Egawa H, Uemoto et al. Risk factors for alcohol relapse after liver transplantation for alcoholic cirrhosis in Japan. Liver Transpl. 2014;20:298-310.

Egawa H, Uemoto S et al. Disease recurrence plays a minor role as a cause for retransplantation after living-donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis: A multicenter study in Japan. Hepatol Res. 2013;43:502-7.

Endo K, Uemoto S et al. Impact of preoperative uncontrollable hepatic hydrothorax and massive ascites in adult liver transplantation. Surg Today. 2014 (in press).

Fukuda A, Uemoto S et al. Living donor liver transplantation for Budd-Chiari syndrome with hepatic inferior venacava obstruction after open pericardial procedures. Surg Today. 2013;43:1180-4.

Fukudo M, Uemoto S et al. Exposure-toxicity relationship of sorafenib in Japanese patients with renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma. Clin Pharmacokinet. 2014;53:185-96.

Hammad A, Uemoto S et al. Perioperative nutritional therapy in liver transplantation. Surg Today. 2014 (in press).

Hata T, Uemoto S et al. Transplantable liver production plan: "Yamaton"—liver project, Japan. Organogenesis. 2013 Oct 1;9:235-8.

Hayakawa N, Uemoto S et al. Clinical utility and limitations of FDG PET in detecting recurrent hepatocellular carcinoma in postoperative patients. Int J Clin Oncol. 2013 (in press)

Hori T, Uemoto S et al. Matrix metalloproteinase-9 as a therapeutic target for the progression of fulminant liver failure with hepatic encephalopathy: A pilot study in mice. Hepatol Res. 2014;44:651-62.

Hori T, Uemoto S et al. Matrix metalloproteinase-9 after the cold ischemia/reperfusion injury and/or shear stress with portal hypertension: an overview. Surg Today. 2014;44:201-3.

Hori T, Uemoto S et al. Oxidative stress and extracellular matrices after hepatectomy and liver transplantation in rats. World J Hepatol. 2014;6:72-84.

Hori T, Uemoto S et al. How to successfully resect 70 % of the liver in pigs to model an extended hepatectomy with an insufficient remnant or liver transplantation with a small-for-size graft. Surg Today. 2014 (in press).

Hori T, Uemoto S et al. How do transplant surgeons accomplish optimal portal venous flow during living-donor liver transplantation? Noninvasive measurement of indocyanine green elimination rate. Surg Innov. 2014;21:43-51.

Hori T, Uemoto S et al. Graft harvest of right posterior segment for living-donor liver transplantation. *Int J Surg Case Rep.* 2014;5:516-22.

Hori T, Uemoto S et al. Adult with primary hyperoxaluria type 1 regrets not receiving preemptive liver transplantation during childhood: report of a case. *Surg Today.* 2013;43:1185-7.

Hori T, Yamagiwa K, Hayashi T, Yagi S, Iida T, Taniguchi K, Kawarada Y, Uemoto S. Malignant pheochromocytoma: Hepatectomy for liver metastases. *World J Gastrointest Surg.* 2013 Nov 27;5(11):309-13. doi: 10.4240/wjgs.v5.i11.309. PubMed PMID: 24520430; PubMed Central PMCID: PMC3920120.

Hori T, Uemoto S et al. Pretreatment of liver grafts in vivo by γ -aminobutyric acid receptor regulation reduces cold ischemia/warm reperfusion injury in rat. *Ann Transplant.* 2013;18:299-313.

Hori T, Uemoto S et al. Liver graft pretreated in vivo or ex vivo by γ -aminobutyric acid receptor regulation. *J Surg Res.* 2013;182:166-75.

Hori T, Uemoto S et al. Pretreatment of Small-for-Size Grafts In Vivo by γ -Aminobutyric Acid Receptor Regulation against Oxidative Stress-Induced Injury in Rat Split Orthotopic Liver Transplantation. *Int J Hepatol.* 2013;2013:149123.

Hosohata K, Uemoto S et al. Association between CYP3A5 genotypes in graft liver

and increase in tacrolimus biotransformation from steroid treatment in living-donor liver transplant patients. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014;29:83-9.

Iguchi K, Uemoto S et al. The impact of posthepatectomy liver failure on the recurrence of hepatocellular carcinoma. *World J Surg.* 2014;38(1):150-8.

Ikeda A, Uemoto S et al. Leptin receptor somatic mutations are frequent in HCV-infected cirrhotic liver and associated with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2014;146:222-32.

Ishii T, Uemoto S et al. High risk of lung metastasis after resection of hepatocellular carcinoma more than 7 cm in diameter. *Surg Today.* 2014 Oct;44:1900-5.

Ishii T, Uemoto S et al. Sorafenib in a hepatocellular carcinoma patient with end-stage renal failure: A pharmacokinetic study. *Hepatol Res.* 2014 ;44:685-8.

Ishii T, Uemoto S et al. A case of xanthogranulomatous cholecystitis suspected to be adenocarcinoma based on the intraoperative peritoneal washing cytology. *Int J Surg Case Rep.* 2014;5:138-41.

Itatani Y, Uemoto S et al. Loss of SMAD4 from colorectal cancer cells promotes CCL15 expression to recruit CCR1+ myeloid cells and facilitate liver metastasis. *Gastroenterology.* 2013;145:1064-1075.

Iwasaki J, Uemoto S et al. Portocaval shunt for hepatocyte package: challenging application of small intestinal graft in animal

models. *Organogenesis*. 2013;9:273–9.

Jobara K, Uemoto S et al. Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. *Nutrition*. 2014;30:1195–207.

Kageyama S, Uemoto S et al. Graft reconditioning with nitric oxide gas in rat liver transplantation from cardiac death donors. *Transplantation*. 2014;97:618–25.

Kaido T, Uemoto S et al. Usefulness of the Kyoto criteria as expanded selection criteria for liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Surgery*. 2013;154(5):1053–60.

Kasahara M, Uemoto S et al. Effect of graft size matching on pediatric living-donor liver transplantation in Japan. *Exp Clin Transplant*. 2014;12:1–4.

Kasahara M, Uemoto S et al. Tatsuo K, Kato S. Living donor liver transplantation for pediatric patients with metabolic disorders: the Japanese multicenter registry. *Pediatr Transplant*. 2014;18:6–15.

Kikuchi M, Uemoto S et al. Successful telaprevir treatment in combination of cyclosporine against recurrence of hepatitis C in the Japanese liver transplant patients. *Biol Pharm Bull*. 2014;37:417–23.

Kim SK, Uemoto S et al. A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer*. 2014;134:1067–76.

Koyama Y, Uemoto S et al. Effects of oral intake of hydrogen water on liver

fibrogenesis in mice. *Hepatol Res*. 2014;44:663–677.

Kurita A, Uemoto S et al. Endoscopic stent placement above the intact sphincter of Oddi for biliary strictures after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol*. 2013;48:1097–104.

Meng F, Uemoto S. Expression of SOX9 in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Pancreas*. 2014;43:7–14.

Nagasaka H, Uemoto S et al. Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle in non-hyperammonemic carriers of ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2013;109:251–4.

Nakamura A, Uemoto S et al. Radiotherapy for patients with isolated local recurrence of primary resected pancreatic cancer. Prolonged disease-free interval associated with favorable prognosis. *Strahlenther Onkol*. 2014;190:485–90.

Ohashi N, Uemoto S et al. Matrix metalloproteinase-9 in the initial injury after hepatectomy in mice. *World J Gastroenterol*. 2013;19:3027–42.

Ohashi N, Uemoto S et al. Hypothermia predicts hepatic failure after extensive hepatectomy in mice. *World J Hepatol*. 2013;5:170–81.

Ohtsuru S, Uemoto S et al. Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients: ultradeep sequencing analysis. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3645–52.

Okamoto T, Uemoto S et al. Suppression of acute rejection by administration of prostaglandin E2 receptor subtype 4 agonist in rat organ transplantation models. *J Surg Res.* 2013;183:852–9.

Raut V, Uemoto S et al. Review of the surgical approach to prevent small-for-size syndrome in recipients after left lobe adult LDLT. *Surg Today.* 2014;44:1189–96.

Sakamoto S, Uemoto S et al. ; Japanese Liver Transplantation Society. Nationwide survey of the outcomes of living donor liver transplantation for hepatoblastoma in Japan. *Liver Transpl.* 2014;20:333–46.

Salah A, Uemoto S et al. Application of complement component 4d immunohistochemistry to ABO-compatible and ABO-incompatible liver transplantation. *Liver Transpl.* 2014;20:200–9.

Saito S, Uemoto S et al. Cilostazol attenuates hepatic stellate cell activation and protects mice against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Hepatol Res.* 2013 (in press)

Shinke H, Uemoto S et al. Effectiveness of sirolimus in combination with cyclosporine against chronic rejection in a pediatric liver transplant patient. *Biol Pharm Bull.* 2013;36:1221–5.

Takada Y and Uemoto S. Living donor liver transplantation for hepatitis C. *Surg Today.* 2013;43:709–14.

Takada Y, Uemoto S. Randomized, multicenter trial comparing tacrolimus plus mycophenolate mofetil to tacrolimus plus steroids in hepatitis C virus-positive

recipients of living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* 2013;19:896–906.

Takemoto K, Uemoto S et al. Assessment of [(18)F]-fluoroacetate PET/CT as a tumor-imaging modality: preclinical study in healthy volunteers and clinical evaluation in patients with liver tumor. *Ann Nucl Med.* 2014;28:371–80.

Ueda Y, Uemoto S et al. Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living-donor liver transplantation. *Transplantation.* 2014;97:344–50.

Ueno T, Uemoto S et al. Impact of pediatric intestinal transplantation on intestinal failure in Japan: findings based on the Japanese intestinal transplant registry. *Pediatr Surg Int.* 2013;29:1065–70.

Xue P, Uemoto S et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio for predicting palliative chemotherapy outcomes in advanced pancreatic cancer patients. *Cancer Med.* 2014;3:406–15.

Yabuta M, Uemoto S et al. Long-term outcome of percutaneous interventions for hepatic venous outflow obstruction after pediatric living donor liver transplantation: experience from a single institute. *J Vasc Interv Radiol.* 2013;24:1673–81.

Yamanaka K, Uemoto S et al. A single-center analysis of the survival benefits of adjuvant gemcitabine chemotherapy for biliary tract cancer. *Int J Clin Oncol.* 2014;19:485–9.

Yamanaka K, Uemoto S et al. Effect of olprinone on liver microstructure in rat partial liver transplantation. J Surg Res. 2013;183:391-6.

2. 学会発表

Uemoto S. Deceased donor liver transplantation in a living donor community, the Japanese experience. STEPS (Safwa Therapeutic Experts in Practice Sessions) 2013. Sharm El Sheikh, Egypt

Uemoto S. Living liver and kidney donation. 7th Congress of the International Pediatric Transplant Association. Warsaw, Poland

Uemoto S. Extending graft survival beyond 20 years. Cast 2013. Kyoto, Japan.

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 非含有細胞の定量的解析

研究分担者 祝迫 恵子 大阪市立大学 医学研究科 助教

（平成 25 年 11 月 1 日より 京都大学 標的治療腫瘍学 特定講師）

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するという予備知見を得て、解析を進めてきた。

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。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、慢性肝炎における筋線維芽細胞の主たる起源と目されていた。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。我々は、活性化肝星細胞以外の ECM 産生細胞として胆管周囲線維芽細胞の存在に着目し解析を進めている。この細胞系列は、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

本年度は、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の構成を病因別、病期別に解析した。

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

①肝炎モデルマウスからコラーゲン産生細胞を分離し、ビタミンA含有、非含有の比率を解析した、

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、総胆管結紮を行い、肝炎・肝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、四塩化炭素を投与し始めてから5日目の急性期でも14日目の慢性期でもコラーゲン産生細胞の約80%がビタミンAを含有し、ビタミンA非含有細胞は20%以下と病期で比率が変化しなかった。一方、総胆管結紮モデルのGFP陽性細胞のビタミンA非含有細胞は、総胆管結紮5日目の急性期は、70%であるが17日目の慢性期になると約50%に低下することが分かった(図1)。

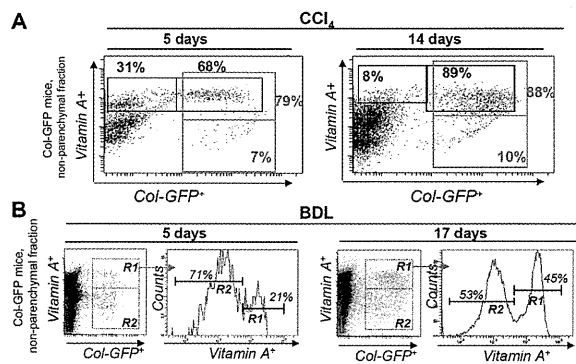


図1 FACSによるコラーゲン産生細胞の解析：(A) 四塩化炭素投与モデルでは、GFP陽性細胞に占めるビタミンA含有細胞と非含有細胞の比率は、投与から5日目(急性期)でも14日目(慢性期)でも変わらない。(B) 総胆管結紮モデルでは、GFP陽性細胞に占めるビタミンA含有細胞と非含有細胞の比率は結紮から5日目(急性期)は71:21で、17日目(慢性期)には53:45と圧倒的優位だったビタミンA非含有細胞の比率が低下する。

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、病因、病期によって星細胞の比率は変化し胆管周囲線維芽細胞が同等もしくは星細胞以上に病態形成に寄与していることが分かった。このことから、肝硬変に対する治療は、胆管周囲線維芽細胞も標的としなければ制御できないことが示唆された。

E. 結論

ビタミンA非含有細胞外マトリクス産生細胞は、胆管周囲線維芽細胞を起源とし、病因、病期によってコラーゲン産生細胞に占める割合が変化することが分かった。特に胆汁鬱滞を伴う肝炎・肝線維化では、急性期にコラーゲン産生細胞の主たる起源である。

肝星胞以外の筋線維芽細胞(コラーゲン産生細胞)は、これまで肝線維症・肝硬変の治療標的としてとらえられておらず、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

Jobara K, Iwaisako K et al.
Whey-hydrolyzed peptide-enriched
immunomodulating diet prevents progression
of liver cirrhosis in rats. Nutrition.
2014;30(10):1195-207.

Koyama Y, Iwaisako K et al. Effects of oral
intake of hydrogen water on liver
fibrogenesis in mice. Hepatol Res.
2014;44(6):663-677.

Saito S, Iwaisako K et al. Cilostazol
attenuates hepatic stellate cell activation
and protects mice against carbon
tetrachloride-induced liver fibrosis. Hepatol
Res. 2013 (in press)

2. 学会発表

祝迫 恵子. 胆汁鬱滞時に誘導されるコラ
ーゲン産生細胞の解析 と抗線維化治療標
的の探索 第 68 回日本消化器外科学会総
会. 宮崎

H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。

肝線維化における細胞外マトリクス産生細胞の定性的解析

研究分担者 武田 憲彦 東京大学医学研究科 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、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。

我々は、活性化肝星細胞以外の ECM 産生細胞として胆管周囲線維芽細胞の存在に着目し解析を進めている。この細胞系列は、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。

原疾患による胆汁排泄障害、肝移植を含めた肝胆道系手術後の胆汁鬱滞は、肝線維化を進行させ肝機能を低下させる。ヒトの胆汁鬱滞による肝線維化は、ウイルス肝炎とは異なり、門脈域に優位な線維化を呈する。門脈域にコラーゲン産生細胞が存在することは知られているが、その起源や性質はほとんど明らかになっていない。胆汁鬱

滞の原因を取り除くことが困難な場合、この細胞は肝線維化の治療標的になり得ると考えられる。

B. 研究方法

前年度、祝迫らによってビタミン A 非含有細胞外マトリクス産生細胞のマーカーとして同定された Mesothelin について、臨床検体免疫組織学解析にて、胆管周囲線維芽細胞のマーカーとしての妥当性を検証した。

C. 研究結果

臨床検体(胆汁鬱滞性線維肝)の免疫染色でも門脈域に胆管周囲線維芽細胞と考えられる Mesothelin 陽性細胞が認められた。一方、慢性 C 型肝炎を背景とする肝線維症では、 α SMA 陽性細胞は類洞に沿って多数みられ、門脈域にも多くの α SMA 陽性細胞が存在するものの、Mesothelin 陽性細胞は、ほとんど認められなかった(図1)。

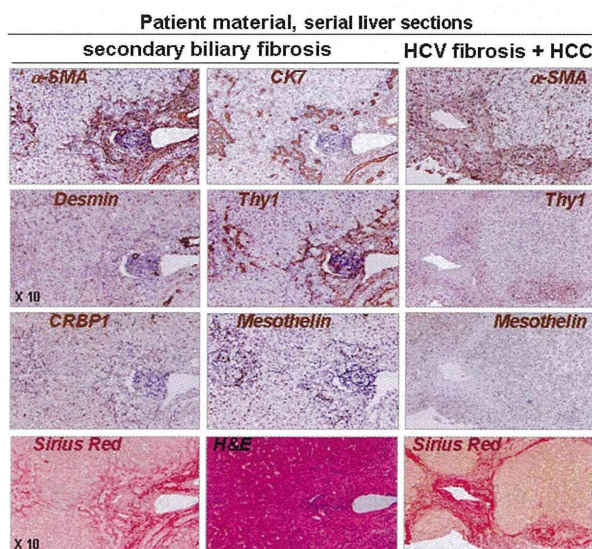


図1 臨床検体の免疫組織学的解析。肝門部胆管癌で二次性の閉塞性黄疸により胆汁鬱滞性の肝線維症をきたした例では、門脈域に多数の Mesothelin 陽性細胞を認めるが、慢性 C 型肝炎による肝硬変では Mesothelin 陽性細胞はほとんど見られない。

D. 考察

臨床検体においても、胆汁鬱滞を起点として発症した肝炎・肝線維症では、胆管周囲線維芽細胞を起源とするコラーゲン産生細胞が線維化に大きく寄与していることが示唆された。

E. 結論

ヒトにおいても胆管周囲線維芽細胞は、胆汁鬱滞を原因とする肝線維症・肝硬変の病態形成に大きく寄与し、マウスと同じく Mesothelin を特異的に発現していることが確認された。今後は、正常肝における活性化していない胆管周囲線維芽細胞の同定を試みたいと考えている。

F. 健康危険情報

特に無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

Cowburn AS, Takeda N et al. HIF isoforms in the skin differentially regulate systemic arterial pressure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(43):17570-5.

Saito T, Takeda N et al. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. FEBS Lett. 2013;587(14):2179-85.

Amiya E, Takeda N et al. Angiotensin II impairs endothelial nitric-oxide synthase bioavailability under free cholesterol-enriched conditions via intracellular free cholesterol-rich membrane microdomains. J Biol Chem. 2013;288(20):14497-509.

Tong M, Takeda N et al. Circadian expressions of cardiac ion channel genes in mouse might be associated with the central

clock in the SCN but not the peripheral
clock in the heart. Biol Rhythm Res.
2013;44(4):519-530.

H. 知的財産研の出願・登録状況

特記すべきことなし。