

「成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構の発見とその解明」

研究分担者氏名 : 仁科 博史

所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構が存在すると考えられるが、その実体は不明な点が多い。我々は免疫系とは独立した異常細胞の排除機構が存在することを発見したので、この機構の解析を目的とした。

【方法】肝臓のサイズと肝がん抑制を制御する Hippo シグナル伝達経路とその標的分子 YAP に注目した。ROSA マウスや免疫不全 NOG マウス等の尾静脈から hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法でプラスミド DNA を導入し、活性型 YAP を発現誘導しモザイク状に異常肝細胞を誘導した。肝臓サイズの測定と共に誘導された異常肝細胞の運命を追跡した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

【成績】活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、遺伝子導入後 3-7 日で排除されることを見出した。免疫不全 NOG マウスでも同様の排除現象が観察されたことから、本現象は免疫非依存的な現象であることが判明した。cDNA アレイ解析の結果、細胞移動や細胞増殖に関与する遺伝子発現の誘導が観察された。

【考案】これまで老化した肝細胞が免疫系によって排除されることが報告されていたが、免疫非依存的な異常肝細胞の排除現象の報告はない。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がること期待される。自己骨髄細胞を用いた療法による効果と関連しているかの検討が重要と考える。

A. 研究目的

自己骨髄細胞を用いた療法はその有効性が示されつつあるが、その作用点は複数あると考えられる。肝臓自身が持つ恒常性維持機構を高める作用もその一つであると考えられる。それ故、肝臓内に障害・老化・形質転換した不適切な細胞が生じた場合、これら不適切な細胞を除去し肝臓の恒常性を保つ機構を明らかにすることは重要である。また、恒常性維持機構の増強ができれば、予防医学に貢献できる。それ故、本研究では、我々が新たに見出した免疫系とは独立した異常細胞の排除機構の解析を目的とした。

B. 研究方法

各種のヒトがんに器官サイズを制御する Hippo シグナル伝達経路および標的分子 YAP が関与することが国内外の研究者から報告されている。そこで活性化型 YAP をモザイク状に正常肝臓に導入することで、異

常肝細胞を正常肝細胞集団の中に誘導した。モザイク発現を可能にする hydrodynamic tail vein injection (HTVi)法を用いて、マウスの尾静脈からプラスミド DNA を導入した。野生型 B6 マウスや免疫不全マウス NOG マウス、細胞運命を追跡可能な ROSA マウスを用いて、異常肝細胞の運命を解析した。さらに本細胞応答に関与する遺伝子発現を cDNA アレイによって解析した。

C. 研究結果

活性型 YAP を発現する異常肝細胞が、免疫系の有無に関わらず、遺伝子導入後 7 日以内に排除されることを見出した。細胞死による排除ではなく、管腔側への突き出しが原因であった。興味深いことに、抜けた空間を埋めるように代償性増殖も観察された。これら誘導された細胞応答は cDNA アレイの結果からも支持された。

#### D. 考察

本研究で、免疫依存性の異常細胞排除機構に加えて、免疫非依存性の異常細胞排除機構が存在することが明らかになった。本現象は、肝臓が本来持つ恒常性維持機構だと推察される。本機構を高める方法は、新たな肝疾患に対する療法に繋がることが期待される。自己骨髄細胞を用いた療法の有効性の一端はこの機構の能力向上であるかを検討することは今後の重要な課題であると考えられる。肝疾患に対する療法のみならず、予防医学への貢献も期待できる。

#### E. 結論

成体肝臓が内包する免疫非依存性異常細胞排除機構を発見した。正常肝細胞集団の中に異常な肝細胞が生じると作動する恒常性維持機構と考えられる。本機構に関与する分子機構の解明が期待される。また、自己骨髄細胞を用いた療法による効果との関連が興味深い。

#### 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Sean Porazinski, Huijia Wang, Yoichi Asaoka, Martin Behrndt, Tatsuo Miyamoto, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina\*, Carl-Philipp Heisenberg\* and Makoto Furutani-Seiki\* (\*Corresponding authors). YAP is essential for tissue tension to ensure

vertebrate 3D body shape. *Nature*, 2015; in press

2. Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima. Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 457: 493-499.

3. Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina. The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE* 2014; 9: e97365.

4. Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina. The PDZ-binding motif of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated CTGF transcription and oncogenic cell transforming activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014; 443: 917-923.

5. Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators

identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol. Cell. Biol.* 2014; 34: 1607-1621.

6. Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki. Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardiac bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. *J. Biochem.* 2014; 155: 235-241.

7. Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto, Yuko Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida. Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2014; 20: 1-5.

## 2. 学会発表

1. 仁科博史；器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[神戸大学医学部セミナー；2014年1月10日／神戸]

2. 仁科博史；Mouse Embryonic Stem Cell-Based Drug Screen for Novel Modulators of Cell Differentiation in Early Mammalian Embryogenesis[熊本大学 HIGO Program；2014年2月12日／熊本]

3. 内田好海、仁科博史；マウス胚性幹細胞を用いた薬剤スクリーニングによる三胚葉分化制御シグナルの同定とスタチン催奇性発症機構の解明 [第20回日本肝臓医生物学研究会；2014年2月15日／東京]

4. 有馬誉恵、仁科博史；マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析 [第134回日本薬学会；2014年3月27-30日／熊本]

5. Ruoxing Yu and Hirohi Nishina；Assessment of teratogenic mechanisms of FDA pregnancy category D and X drugs using murine ES cell-derived 3D culture system [第134回日本薬学会；2014年3月27-30日／熊本]

6. 仁科博史；器官サイズ制御シグナル Hippo 系による組織形成機構とその破綻病態[東京女子医科大学セミナー；2014年5月29日／東京]

7. 内田好海、仁科博史；スタチンの初期胚発生に対する作用機構の解明 [第13回生命科学研究会；2014年6月20-21日／札幌]

8. 浅岡洋一、仁科博史；器官サイズ制御因子 Yap の網膜視細胞分化における機能解析 [第13回生命科学研究会；2014年6月20-21日／札幌]

9. 宮村憲央、仁科博史；成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達

- 系破綻は細胞排除を誘導する[第 21 回肝細胞研究会;2014年6月27-28日/東京]
10. 内田好海、仁科博史;スタチン催奇性の分子機構の解明[第 21 回肝細胞研究会; 2014年6月27-28日/東京]
  11. 仁科博史;器官サイズを制御する転写共役因子 YAP の役割 [第 23 回日本 Cell Death 学会; 2014年7月18-19日/東京]
  12. 浅岡洋一、仁科博史;器官サイズを制御する Hippo-Yap シグナル伝達系の網膜分化における機能解析[第 23 回日本 Cell Death 学会; 2014年7月18-19日/東京]
  13. 浅岡洋一他; Hippo signaling regulates a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. [日本比較生理生化学会第 36 回大会; 2014年7月28日~8月1日/札幌]
  14. 濱部凜他;ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *Per2* と *Cry1a* の解析 [第 13 回次世代を担う若手フェーマ・バイオフォーラム;2014年9月20-21日/富山]
  15. 浅岡洋一、仁科博史; Hippo-Yap signaling acts as a molecular switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation. [第 20 回小型魚類研究会; 2014年9月20-21日/東京]
  16. 平山順他; Study on a light signaling pathway for circadian entrainment in zebrafish. [第 20 回小型魚類研究会;2014年9月20-21日/東京]
  17. 濱部凜他;ノックアウトゼブラフィッシュを用いた時計遺伝子 *zPer2* および *zCry1a* の解析 [第 3 回修飾シグナル病若手ワークショップ;2014年9月30-10月2日/湯河原]
  18. 宮村憲央、仁科博史; Hippo シグナル系破綻によって誘導されるマウス肝細胞の動態の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会; 2014年10月4-5日/静岡]
  19. 仁科博史;スタチン催奇性誘導機構の解析[第 21 回日本肝臓医生物学研究会; 2014年10月4-5日/静岡]
  20. 仁科博史;成体マウス肝臓においてモザイク状の Hippo シグナル伝達系破綻は細胞排除を誘導する[第 87 回日本生化学会大会; 2014年10月15-18日/京都]
  21. 平山順他;ゼブラフィッシュ概日リズムの光同調を担うシグナル経路の解析 [第 21 回日本時間生物学会学術大会;2014年11月8-9日/福岡]
  22. 浅岡洋一、仁科博史; Hippo-Yap シグナル伝達系による網膜視細胞の分化制御機構 [第 7 回 RRM; 2014年11月22日/東京]
  23. 仁科博史;がん原遺伝子産物 YAP 依存的肝細胞消失を誘導する新規マウスモデルの確立[第 37 回日本分子生物学会; 2014年11月25-27日/横浜]
  24. 浅岡洋一、仁科博史;網膜光受容細胞の分化における Hippo-Yap シグナル伝達系の役割[第 37 回日本分子生物学会; 2014年11月25-27日/横浜]
  25. 仁科博史;細胞内シグナル伝達系[秋田大学医学部セミナー; 2014年12月12日/秋田]

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得

ナシ

2. 実用新案登録

ナシ

3. その他

ナシ

「NASH の病態形成におけるマクロファージの病態生理的意義」

研究分担者氏名 : 小川 佳宏

所属機関 : 東京医科歯科大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】肥満の脂肪組織では細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲んで貪食する組織像として crown-like structure (CLS) が良く知られており、CLS を構成するマクロファージは monocyte attractant protein-1 (MCP-1)/C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2)系を介して浸潤するものと考えられている。我々は、独自に開発した NASH モデルであるメラノコルチン 4 型受容体欠損マウス (MC4R-KO) を用いて、NASH に特徴的な病理組織マーカーである hepatic crown-like structure (hCLS) が炎症・線維化の起点となることを報告した。本研究では NASH 発症過程におけるマクロファージの動態・hCLS 形成における MCP-1/CCR2 系の機能的意義を検討した。

【方法】MC4R-KO マウスに野生型あるいは CCR2-KO マウスの骨髄を移植し、4 週間の回復期間の後に 20 週間の高脂肪食負荷により NASH を誘導した。

【成績】CCR2-KO マウスの骨髄を移植した MC4R-KO マウスでは脂肪組織におけるマクロファージ浸潤と CLS 形成が減少した。肝非実質細胞分画を用いた FACS 解析により CD11b<sup>hi</sup> 浸潤性マクロファージの消失が確認されたが、肝組織学的解析では対照群と同程度に hCLS が観察され、炎症性マーカーの発現にも変化は認められなかった。肝線維化面積・ $\alpha$ SMA 陽性面積および線維化マーカーの発現にも変化はなかった。

【考案】脂肪組織 CLS とは異なり、hCLS は MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されると考えられた。脂肪を蓄積して細胞死に陥った肝細胞と常在性マクロファージの相互作用によりマクロファージの機能的変化が誘導され、炎症・線維化機転が促進されることが示唆された。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられており、栄養性に肝硬変や肝癌を発症する病態として注目されている。肥満の程度が比較的軽度の本邦においても成人の約 30%に脂肪肝が認められ、NASH の有病率は約 1%にのぼると想定されている。今後、NASH を原因とする肝硬変・肝癌の増加が予測されるため、病態の理解と予防あるいは早期の治療が喫緊の課題である。

従来、肥満に合併する糖脂質代謝障害を背景とし、NASH を経て肝細胞癌を発症する動物モデルが存在しないことが、NASH 研究の障壁となってきた。我々は、摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体欠損

マウス (MC4R-KO マウス) が、高脂肪食負荷により脂肪肝から NASH・肝細胞癌を発症することを報告し (Am. J. Pathol. 179: 2454-2463, 2011)、本モデルを用いて NASH の病態解明に取り組んできた。

近年、全身の軽度の慢性炎症がメタボリックシンドロームの基盤病態を形成することが明らかになってきた。肥満の脂肪組織では細胞死に陥った脂肪細胞をマクロファージが取り囲む crown-like structure (CLS) がよく知られており (J. Lipid Res. 46: 2347-2355, 2005)、CLS を構成するマクロファージは CD11c 陽性であることが報告されている (J. Clin. Invest. 117: 175-184, 2007)。昨年度までに我々は NASH を発症した MC4R-KO マウスの肝臓では細胞死に陥った肝実質細胞をマクロフ

フェージが取り囲む組織像 (hCLS: hepatic crown-like structure) が多数認められること、hCLS 数は肝線維化面積と正の相関を示すこと、hCLS 近傍にコラーゲンの沈着および $\alpha$ SMA 陽性筋線維芽細胞が認められることを見出した (PLoS ONE 8: e82163, 2013)。さらに、hCLS はヒト NAFLD/NASH においても認められることを確認している。本年度は、hCLS を構成するマクロフェージの動態を解析した。

## B. 研究方法

### 1. マウス骨髄移植

骨髄ドナーとして GFP および CCR2-KO マウスの大腿骨、脛骨を採取し、周辺の筋肉を除去後に両端を切断した。3%FBS/PBS にて骨髄細胞をフラッシュし、ACK バッファーを用いて溶血処理を行った。骨髄細胞を PBS にて洗浄し、 $1 \times 10^7$  個/ml になるように調整した。レシピエントである野生型および MC4R-KO マウスに 7.5Gy の  $\gamma$  線照射を行い、骨髄液を 0.3ml ずつ尾静脈より投与した。4 週間の回復期間を置き、骨髄が 90% 以上置換されていることを確認し、高脂肪食負荷を行った。

### 2. 肝非実質細胞分画の FACS 解析

麻酔下にマウスの腹部を切開し、門脈から PBS15ml を灌流した。1 個体につき 5ml の Hanks' Balanced Salt Solution (Ca, Mg (+)) / type IV collagenase 1mg/ml / DNaseI 50 $\mu$ g/ml) を使用し、GentleMACS (Miltenyi 社) を用いて細胞を分散した。30% Percoll に懸濁して 1800rpm, 4 $^{\circ}$ C, 15min 遠心し、沈殿した細胞を肝非実質細胞分画として使用した。 $1 \times 10^6$  個の細胞を 50 $\mu$ l の FACS バッファーに懸濁し、Fc block 後に

CD45, CD11b, F4/80 抗体を各 0.5 $\mu$ l ずつ加え、氷上で 10min 反応させた。細胞をバッファーで洗浄し、死細胞除去のため 7-AAD を加えて FACS 解析に供した。

## 3. 組織学的解析

脂肪組織および肝臓を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成した。Sirius red 染色および F4/80  $\cdot$   $\alpha$ SMA 免疫染色を行い、画像解析ソフト Winroof (Mitani Co.) を用いて Sirius red  $\cdot$  F4/80  $\cdot$   $\alpha$ SMA 陽性面積を測定した。脂肪組織における F4/80 陽性細胞数、CLS 数、および肝臓における hCLS 数は目視にてカウントし、単位 mm<sup>2</sup> 当たりに換算した。

## C. 研究結果

### 1. 脂肪組織の解析

精巢上体周囲脂肪組織の F4/80 染色を行ったところ、野生型マウスと比較して MC4R-KO マウスでは F4/80 陽性マクロフェージが増加しており、CLS 数も著明に増加していた (図 1)。骨髄の CCR2 を欠損すると浸潤マクロフェージ数、CLS 数は有意に減少した (図 1)。

### 2. 肝臓におけるマクロフェージ分画の変化

肝臓の非実質細胞分画の FACS 解析において、CD45 陽性細胞を F4/80、CD11b にて展開すると、F4/80 を高発現するマクロフェージ (F4/80<sup>hi</sup>) と、CD11b を高発現するマクロフェージ (CD11b<sup>hi</sup>) が存在することが知られている。NASH の発症により F4/80<sup>hi</sup> マクロフェージの割合に変化は認められなかったが、CD11b<sup>hi</sup> マクロフェー

ジ分画が著明に増加し、骨髄の CCR2 を欠損することによりこの変化が消失することが明らかになった (図 2)。

### 3. 肝臓における炎症・線維化変化

F4/80 染色では骨髄の CCR2 を欠損しても対照群の MC4R-KO マウスと同程度に F4/80 陽性細胞が認められ、hCLS の数にも変化はなかった (図 3)。また、炎症性マーカーである TNF $\alpha$  や CD11c の発現にも変化は認められなかった (図 3)。HE 染色では NASH に特徴的とされる肝細胞風船様変性や炎症細胞浸潤も同等に認められ、線維化・ $\alpha$ SMA 陽性面積、線維化マーカー (COL1A1, TIMP1) の発現にも変化はなかった (図 4)。

### D. 考察

MC4R-KO マウスにおいて骨髄の CCR2 を欠損させると脂肪組織へのマクロファージ浸潤、CLS 形成が抑制されたことから、既報と同様に脂肪組織 CLS は MCP-1/CCR2 系を介して浸潤したマクロファージが寄与していると考えられた。一方、肝臓では FACS 解析において認められる CD11b<sup>hi</sup> マクロファージは MCP-1/CCR2 系依存的と考えられ、hCLS は F4/80<sup>hi</sup> マクロファージが中心となり、MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されることが示唆された。

これまでの検討において hCLS が炎症・線維化の起点となって NASH の病態形成に寄与することが示唆されている。hCLS の形成機序や機能的変化には不明な点も多いが、hCLS の詳細を明らかにすることで、これまで原因が不明であった NASH の発症機序を解明する重要な手がかりとなり、新規バイオマーカーの探索や新しい治療法

の開発に繋がると期待される。

### E. 結論

脂肪組織 CLS とは異なり、hCLS は MCP-1/CCR2 系非依存的に形成されることが示唆された。脂肪を蓄積して細胞死に陥った肝実質細胞と常在性マクロファージの相互作用によりマクロファージの機能的変化が誘導され、炎症・線維化機転が促進されることが示唆された。

### 研究発表

#### 1. 論文発表

1. K. Konuma\*, M. Itoh\*, T. Suganami, S. Kanai, N. Nakagawa, T. Sakai, H. Kawano, M. Hara, S. Kojima, Y. Izumi, Y. Ogawa. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin 4 receptor-deficient mice. *PLoS ONE* 10: e0121528, 2015. \*Equally contributed.
2. M. Tanaka, K. Ikeda, T. Suganami, C. Komiyama, K. Ochi, I. Shirakawa, M. Hamaguchi, S. Nishimura, I. Manabe, T. Matsuda, K. Kimura, H. Inoue, Y. Inagaki, S. Aoe, S. Yamasaki, Y. Ogawa. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun* 5: e4982, 2014.

#### 2. 学会発表

1. 伊藤美智子、加藤秀昭、菅波孝祥、小沼邦葉、酒井建、小川佳宏 : NASH 発症過程におけるマクロファージの動態解析



—hepatic crown-like structure に注目

して：第 35 回日本肥満学会、宮崎、

2014/10/24

2. 加藤秀昭、伊藤美智子、菅波孝祥、小沼邦葉、小川佳宏：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）における hepatic crown-like structure の意義：第 57 回日本糖尿病学会、大阪、2014/5/24

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

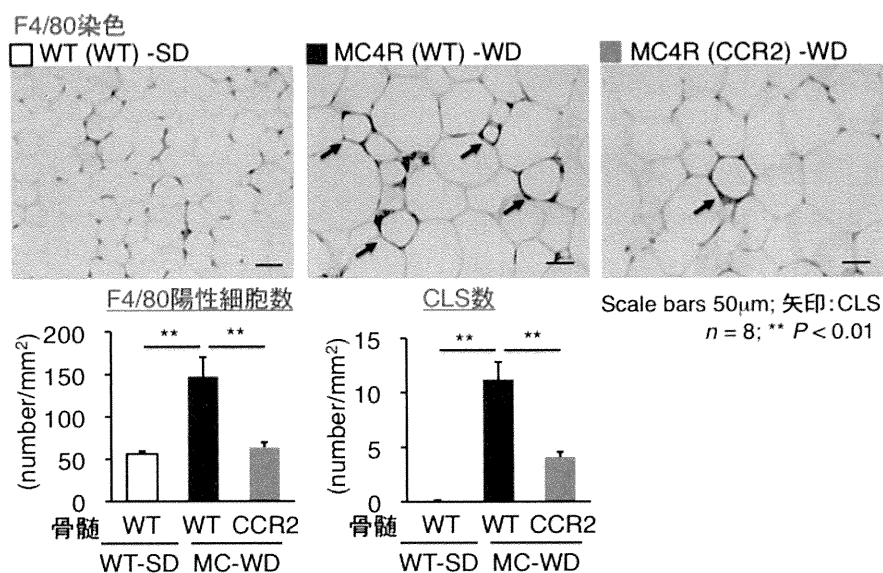


図1. 脂肪組織を用いた組織学的解析

WT: 野生型, MC4R: MC4R-KO, CCR2: CCR2-KO, 括弧内は骨髄  
SD: 通常食, WD: 高脂肪食

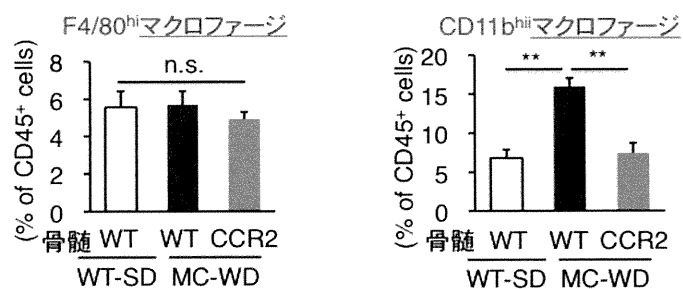
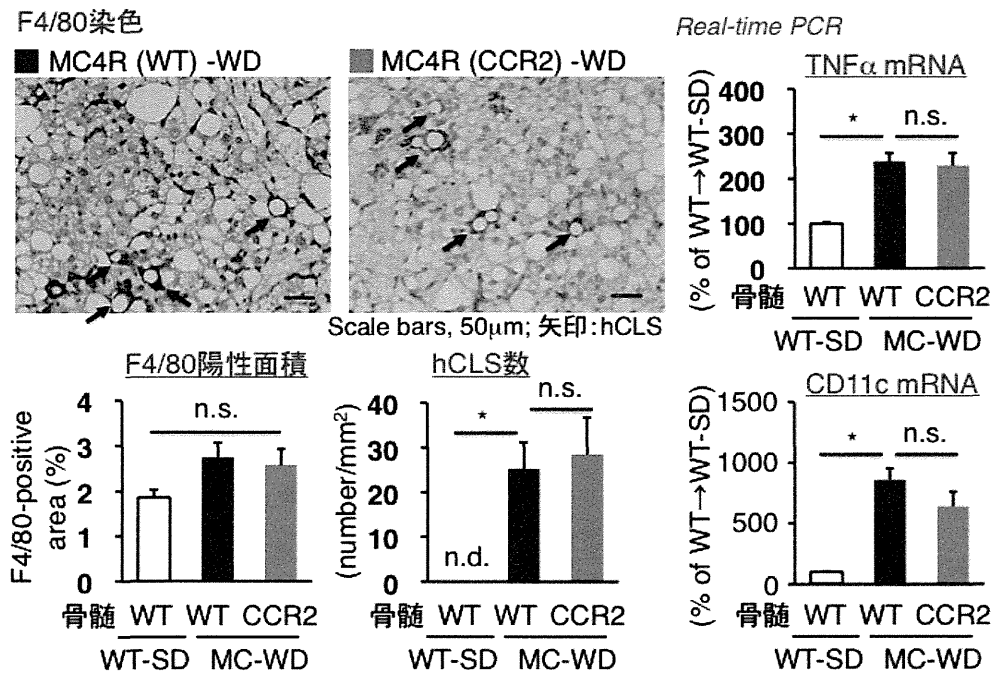
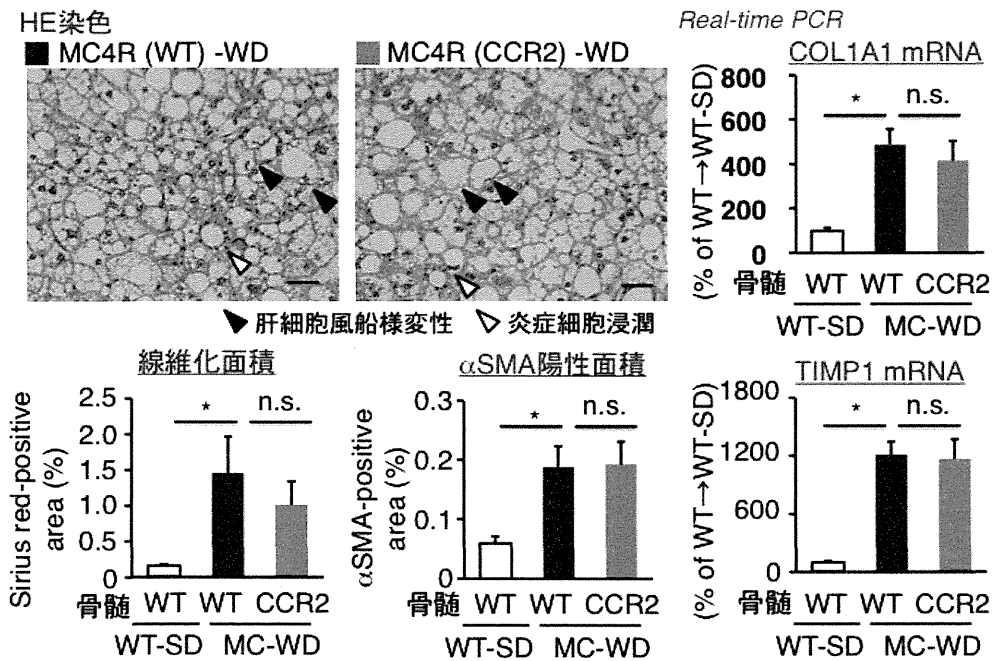


図2. 肝非実質細胞分画を用いたFACS解析



**図3. 肝臓における炎症性変化**



**図4. 肝臓における線維化変化**

「新規の線維肝再生促進因子 OGFRL1 の組織特異的分布と機能解析」

研究分担者氏名 : 稲垣 豊

所属機関 : 東海大学 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】わが国では慢性ウイルス性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎の進行に伴う肝硬変や肝細胞癌の発生が高頻度に見られ、その対策が急務となっている。肝硬変症例に対する次世代型自家骨髄細胞移植療法の確立を目的として、本研究者らが独自に同定した骨髄細胞に由来する新規の線維肝再生促進因子 Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1) について、その組織発現分布と機能解析を行った。

【方法】C57BL/6 の雄性および雌性マウスから各臓器を摘出し、RNA を抽出した上で、内因性 OGFRL1 の発現を Real time RT-PCR 法により定量解析した。また、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて OGFRL1 遺伝子の欠損 (KO) マウスを作製し、その表現型について肝再生の面から検討した。

【成績】内因性 OGFRL1 の発現は、脳神経系組織において最も高く、次いで肺、脾臓、骨髄、肝臓の順に認められた。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、数塩基対から最長で数百塩基対の欠損を示す、複数系統の OGFRL1 KO マウスを得た。その表現型の検討では、同マウスは正常に誕生・発育し、未処理状態の肝組織には明らかな組織学的異常は認められなかった。しかしながら、野生型マウスと比較して、70%部分肝切除後の肝細胞の DNA 合成の低下と細胞分裂の遅延が認められ、OGFRL1 が肝再生に密接に関連する因子であることが証明された。

【考案】OGFRL1 発現レンチウイルスを骨髄間葉系幹細胞に感染させた上で経脾臓的に投与した先行実験では、部分肝切除後の線維肝の再生促進とともに、cyclin B1/B2/A2 をはじめとする細胞回転・細胞分裂に関わる遺伝子群発現がいずれも 10 倍程度増加していた。今回の OGFRL1 KO マウスを用いた実験結果はこれを裏付けるもので、OGFRL1 を用いた線維肝再生治療法の開発を目指す上で重要な所見が得られた。

A. 研究目的

我が国では、B型ならびにC型肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎から肝硬変・肝癌への進展が、大きな社会問題ともなっている。加えて近年では、メタボリック症候群の肝病変として、線維化の進展とともに肝硬変から肝癌を合併する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の対策が重要となっている。進行した肝硬変症例に対しては肝移植が唯一の治療法だが、ドナー数の圧倒的不足により実施例は今なお限定的である。したがって、肝線維化のメカニズムを解明し、肝移植に代わる新たな治療法を確立することは、臨床的また社会的にも重要かつ喫緊の研究テーマである。

近年、肝硬変症例に対する自家骨髄細胞移植が積極的に試みられている。しかしながら、細胞治療に際してどのような細胞分画を用いるのが最も効果的であるかという点は、十分に解明されていない。加えて、自家骨髄細胞に対して、線維肝の再生を促進するような *ex vivo* 処理を行い、高機能化した上で患者体内に投与するような次世代型の細胞治療戦略も確立されていない。

そこで本事業の最終年度となる 2014 年度は、骨髄間葉系幹細胞の体外修飾に基づく次世代型の細胞治療法を臨床応用に結びつけるため、本研究者らが自ら同定した骨髄細胞に由来する新規の線維肝再生促進因子 Opioid growth factor receptor-like 1

(OGFRL1) について、その組織発現分布を明らかにするとともに、CRISPR/Cas9 系を用いて OGFRL1 ノックアウトマウス (KO) を作製し、その機能の解明に着手した。

## B. 研究方法

### 1) 組織 RNA の抽出と Real time RT-PCR:

C57BL/6 の雄性および雌性マウスから主要臓器を摘出し、total RNA を抽出した。次いで、OGFRL1 に対する特異的プライマーを設計し、Real time RT-PCR 法を用いて内因性 OGFRL1 遺伝子の発現を定量解析し、臓器間で比較を行った。

### 2) OGFRL1 遺伝子のターゲティング:

OGFRL1 の Exon 1 配列に対応する guide RNA を設計し、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて同部分を含む OGFRL1 遺伝子の欠失を試みた。得られたマウスから tail DNA を抽出し、PCR 産物の電気泳動ないし直接シーケンシング法により OGFRL1 遺伝子の欠失範囲の同定を行った。

### 3) OGFRL1 KO マウスの表現型解析:

得られた OGFRL1 KO マウスについて、胎児期の発生や生後の生育状況を野生型マウスと比較した。また、成熟マウスを用いて未処理状態の肝組織像を検討した。さらに、70%の部分肝切除を行った際の肝再生について、BrdU の取り込みや有糸分裂細胞数を指標に評価を行った。

## C. 研究結果

### 1) 内因性 OGFRL1 の組織発現分布:

OGFRL1 の発現は、脳神経系組織において最も高く、次いで肺、脾臓、骨髄、肝臓の順に認められた。その他の臓器において

は、OGFRL1 の発現はわずかであった。また、雄性マウスと雌性マウスとで、発現パターンに差異は認められなかった。

### 2) OGFRL1 KO マウスの作出:

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、数塩基対から最長で数百塩基対の欠損を示す、計 7 系統の OGFRL1 KO マウスを得た。うち、3 系統では、アガロースゲル電気泳動法で容易に検出可能な数百塩基対に及ぶ遺伝子の欠損が確認された (下図)。

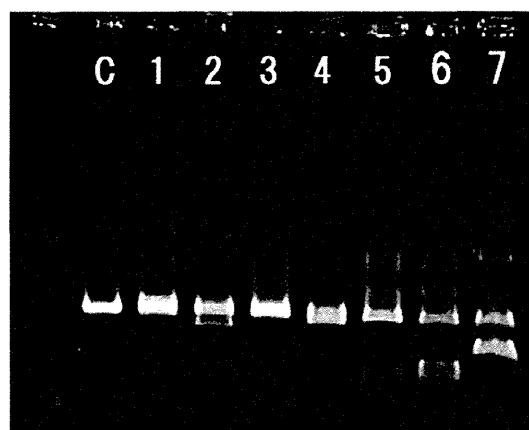


図. OGFRL1 KO マウス (F1) の電気泳動像

7 系統中 3 系統では、数百塩基対に及ぶ広範囲の欠失が確認された (Nos. 5, 6, および 7)

### 3) OGFRL1 KO マウスの表現型:

同マウスは正常に誕生・発育し、成熟マウスの未処理状態の肝組織に明らかな組織学的異常は認められなかった。しかしながら、70%部分肝切除を行うと、野生型マウスに比較して複数系統の OGFRL1 KO マウスで肝細胞の DNA 合成の低下と細胞分裂の遅延が認められた。

## D. 考察

OGFRL1 は、四塩化炭素の反復投与により作製した実験的肝硬変症からの回復過程において、線維肝組織へと浸潤した骨髄細胞が産生する新規の再生促進因子として、本研究者らによって独自に同定された。実際、OGFRL1 を発現する組換え型レンチウイルスを骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に感染させた上で経脾臓的に投与した先行実験では、線維化の改善とともに部分肝切除後の線維肝の再生促進が認められた。この際、OGFRL1 発現 MSC を投与した肝組織においては、cyclin B1/B2/A2 をはじめとする細胞回転・細胞分裂に関わる遺伝子群発現がいずれも 10 倍程度増加していた。今回の OGFRL1 KO マウスを用いた実験結果は、これを裏付ける所見であり、OGFRL1 が肝再生に密接に関連する因子であることが証明された。

肝硬変症例に対する自家骨髄細胞移植において、どのような細胞分画を用いるのが最も効果的であるかという点は、十分に解明されていない。MSC はその有力な細胞ソースの一つとされているが、本研究者ら昨年度までに行った検討では、培養に伴って MSC が有する matrix metalloproteinase-13 産生能は極端に低下し、移植に必要な充分数の MSC を得る際にその機能低下が問題となっていた。自家 MSC に対して、OGFRL1 発現を誘導するなど線維肝の再生を促進するような *ex vivo* 処理を行い、高機能化した上で患者体内に投与することは、次世代型の細胞治療法として有用な手段となることが期待される。

## E. 結論

本研究者らが独自に同定した、新規の線維肝再生促進因子 OGFRL1 について、その組織発現分布と KO マウスを用いた機能解明に着手した。OGFRL1 は組織特異的発現分布を示すユニークな因子であり、その機能を解明し肝再生に対する促進機序を明らかにすることは、肝硬変症に対する安全かつ効率よい再生治療法の開発を目指す上で重要な情報をもたらすものと思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kamiya A, Inagaki Y. Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration. *Hepatol Res* 2015; 45: 29-37.
2. 稲垣 豊、住吉秀明. 肝臓の線維化とその治療. *日本内科学会雑誌* 2014; 103: 2171-2175.
3. Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T, Kimura K, Inoue H, Inagaki Y, Aoe S, Yamasaki S, Ogawa Y. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat Commun* 2014; 5: 4982.
4. Abe J, Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Tomura M, Inagaki Y, Stein JV, Matsushima K. Lymph node stromal cells negatively regulate antigen-specific CD4+ T cell responses. *J Immunol* 2014; 93:1636-1644.
5. Okazaki I, Noro T, Yamanouchi E, Kuroda H, Nakano M, Yokomori H, Inagaki Y. Fibrogenesis and

- carcinogenesis in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): Involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs). *Cancers* 2014; 6: 1220-1255.
6. 稲垣 豊、茂呂 忠、住吉秀明. 肝線維化改善の分子・細胞基盤. *肝胆膵* 2014; 68: 709-715.
  7. Yamaoka H, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Minakawa K, Sumida K, Saito K, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A, and Inagaki Y. A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice. *J Dermatol Sci* 2014; 74: 204-213.
  8. Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, Hernández-Nazara Z, Rincón-Sánchez AR, Inagaki Y, Rojkind M, and Lakshman MR. Mechanisms of action of acetaldehyde in the up regulation of the human  $\alpha 2(I)$  collagen gene in hepatic stellate cells - key roles of Ski, SMAD3, SMAD4 and SMAD7. *Am J Pathol* 2014; 184: 1458-1467.
2. 学会発表
1. 稲垣 豊. 肝臓の線維化とその治療. 第 111 回内科学会総会・講演会、シンポジウム 3 「臓器の線維化とその治療」、東京、2014 年 4 月 13 日
  2. 茂呂 忠、住吉秀明、稲垣 豊. ミトコンドリア由来活性酸素惹起モデルマウスを用いた酸化ストレスによる肝線維化促進機序の解明. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月 29 日
  3. 住吉秀明、東 清史、中尾祥絵、皆川香織、紙谷聡英、茂呂 忠、斎藤幸一、稲垣 豊. 骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定. 第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会合同学術大会、名古屋、2014 年 6 月 7 日
  4. 稲垣 豊、石井恭正、茂呂 忠: ミトコンドリア酸化ストレスによる肝線維化の病態形成. 第 21 回肝細胞研究会、シンポジウム 1 「肝疾患の病態を制御するメカニズム」、東京、2014 年 6 月 27 日
  5. 山口典子、目崎喜弘、三浦光隆、稲垣 豊、吉川 究. ビタミン E 類縁化合物、トコロールの肝臓星細胞に対するアノキス誘導は MMP 合成の促進を伴う. 第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月 16 日
  6. Sumiyoshi H, Kamiya A, Inagaki A. A novel therapy for liver fibrosis using ex vivo modified mesenchymal stem cells. 第 18 回日本肝臓学会大会、International Symposium 1 “Stem cells in liver regeneration and therapy: Present and future scope”, 神戸、2014 年 10 月 23 日
  7. Moro T, Sumiyoshi H, Inagaki Y. Direct contribution of mitochondrial oxidative stress to hepatic fibrogenesis. 第 18 回日本肝臓学会大会、International Symposium 2 “Mechanisms of hepatic and pancreatic fibrosis: Clinical implications”, 神戸、2014 年 10 月 23 日
  8. Yokomori H, Okazaki I, Oda M, Ando W, Suzuki Y, Nobuhiko T, Yamanouchi E, Kuroda H, Kojima S, Hara M, Inagaki

Y. Localizations and functional roles of MMP-1 in the early and advanced stages of human non-alcoholic steatohepatitis. 45th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2014. 11. 11.

9. Ando W, Yokomori H, Inagaki Y, Okazaki I, Suzuki Y, Nobuhiro T, Tamanouchi E, Tanabe H, Kuroda H, Kojima S, Hara M, Oda M, Komiyama T. The serum levels of SDF-1 $\alpha$  correlated with the fibrosis and suggested the appearance of hepatic progenitor cells in the advanced stage of NASH. 45th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2014. 11. 11.
10. 住吉秀明、大塚正人、木村 穰、福光寛、中尾祥絵、近田裕美、紙谷聡英、稲垣 豊。ゲノム編集技術を用いた線維肝再生促進因子 OGREL1 の機能解析。第28回肝臓洞壁細胞研究会学術集会、岡山、2014年12月13日
11. 住吉秀明、大塚正人、木村 穰、福光寛、中尾祥絵、近田裕美、紙谷聡英、稲垣 豊。ゲノム編集技術を用いた線維肝再生促進因子 OGFRL1 の機能解析。第14回再生医療学会、横浜、2015年3月20日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし



「皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞の肝硬変に対する効果の研究」

研究分担者氏名 : 大河内 仁志

所属機関 : 国立国際医療研究センター研究所 細胞組織再生医学研究部

職名 : 部長

研究要旨 :

【目的】

皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の投与による肝硬変モデルマウスに対する効果の検討

【方法】

マウスに高脂肪食を投与し、NASH 肝硬変モデルを作成した。このモデルに GFP マウス皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞(ASC)に MMP2 を強制的に発現させたものを作製し、 $2 \times 10^5$  個の細胞を門脈経由で投与した。1 週間後に肝臓組織を採取して、組織学的検討を行った。

【成績】

ASC に MMP2 を強制的に発現させると、*in vitro* ではコラーゲンを分解できることを確認した。NASH 肝硬変モデルに移植して組織学的に検討したところ、一部の細胞の生着は認められたが、明らかな線維化の改善は認められなかった。

【考案】

これまでの検討で、投与細胞数を多くすると塞栓像が認められたために、今回は投与細胞数を減らしたので、塞栓自体は抑制できたが、一方で生着細胞数も少なくなり、線維化の改善につながらなかった可能性が示唆された。

A. 研究目的

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変症患者の救命のために喫緊の課題である。肝硬変患者に対する自己骨髄細胞を用いた細胞移植療法の効果が報告されており、特に骨髄細胞の抗線維化作用が注目されている。骨髄には造血幹細胞以外に多能性をもつ間葉系幹細胞の存在が知られている。一方脂肪組織にも骨髄と同様に多分化能をもつ間葉系幹細胞が存在するので、肝硬変の治療に使えるのではないかと考えた。これまでに我々は脂肪由来の間葉系幹細胞はマウスの急性肝炎モデルに投与をすると効果があることを確認している。そこで今回はマウスの肝硬変モデルを作成して、脂肪由来の間葉系幹細胞を移植した場合の効果を検討することを目的とした。

B. 研究方法

脂肪組織由来の間葉系幹細胞(ASC)の分離

GFP マウス (C57BL/6 由来, ♀ 10 週齢) の鼠径部の脂肪塊を摘出して phosphate buffered saline (PBS) で洗浄して、control medium [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, low-glucose; GIBCO) + 10% fetal calf serum (FCS; GIBCO) + 1% penicillin-streptomycin (SIGMA)] の入った dish に移した後、メスで 2-3 mm まで細かく刻み、CO<sub>2</sub> incubator 内で 1 時間培養した。脂肪塊を遠心 (1,300 rpm, 6 min, room temperature) し、液体を吸引し、0.12 % type1 collagenase (Wako) を加え、37 °C で振盪 (30 min) し、細胞を解離した。解離した細胞に control medium を加え、遠心 (1300 rpm, 6 min, room temperature) し、上清及び沈まなかった細胞を吸引したものを SVF(stromal vascular fraction)とした。

## 細胞培養

SVF を control medium または FGF2(塩基性線維芽細胞増殖因子:10ng/ml)を添加したもの

で resuspend し、40 µm filter を通した後、 $1 \times 10^6$  / 10 cm dish に播種した。培地交換は 2 日に 1 回行い、1 週間後にトリプシン処理して再播種した。細胞を Passage 5 まで培養を続けた後、control medium + 10 % dimethyl sulphoxide (DMSO) (SIGMA) 内に移し液体窒素中で凍結保存するか、または実験に使用した。

## ASC に MMP2 遺伝子を強制発現

レトロウイルス (pMY) に MMP2 遺伝子と Puro 耐性遺伝子を導入したものを作製し、P3 の ASC に transfection し、Puromycin で ASC を選択培養した。

細胞抽出液と培養上清を採取し、その MMP2 の活性はゼラチンザイモグラフィアッセイキットを使用して in vitro で評価した。

## 肝硬変モデルマウスの作製と移植実験

C57/BL6 マウスに離乳直後よりココアバターを多く含む高脂肪食(オリエンタル酵母に特注)を3ヶ月間にわたって投与し、NASH 肝硬変モデルを作製した。このマウスに同系 GFP マウスの MMP2 を強制発現させた ASC  $2 \times 10^5$  個を回盲部の腸間膜静脈から門脈に注入した (n=4)。1 週間後に肝臓組織を採取して、組織学的検討を行い、細胞移植をしなかった群と比較した。線維化の程度はシリウスレッド染色を行い、KEYENCE 社の BZ-II 解析アプリケーションを用いて、肝臓の各葉(内側右葉、外側左

葉、外側右葉、尾状葉)の総面積に対して赤く陽性に染まる面積の割合を求めた。

GFP 陽性細胞は抗 GFP 抗体を用いて、ALP 活性をもつ二次抗体で赤く発色させた。

## C. 研究結果

### ASC に MMP2 遺伝子を強制発現

レトロウイルスで MMP2 遺伝子を ASC に導入後、puromycin で生き残った細胞から細胞抽出液と培養上清を採取し、ゼラチンザイモグラフィアッセイを行った。

図1のごとく、細胞抽出液と培養上清ともに MMP2 の酵素活性があることを確認した。

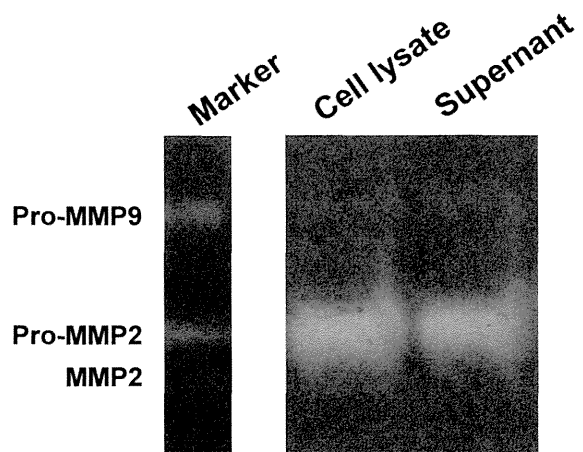


図1 ゼラチンザイモグラフィアッセイ ASC の細胞抽出液と培養上清を電気泳動してコラーゲンの分解を検討した。Pro-MMP2 の位置で最もコラーゲンが分解された。

### NASH モデルへの移植実験

培養した ASC 20 万個を門脈から移植した。

図2に移植後1週間の組織像を示す。GFP 陽性細胞が赤く染まっており、移植細胞の生着が認められた。

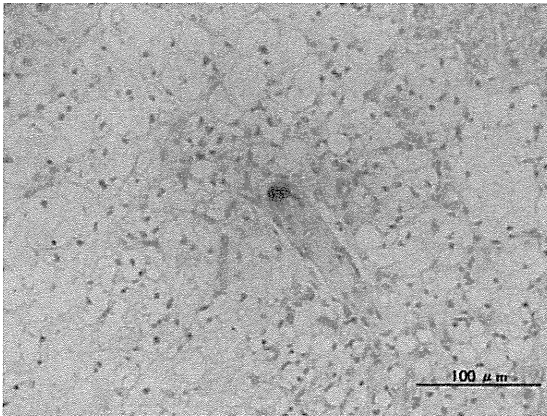


図2 細胞移植後1週間のNASHモデル肝臓組織

抗GFP抗体を用いた免疫染色を行い、GFP陽性細胞が赤く染色されている。

シリウスレッド染色を行い、細胞移植群と非移植群において線維化の程度を比較したが、両者に有意な差は認められなかった。

#### D. 考察

これまでの検討から細胞を静注すると多くの細胞が肺に集積し、肝臓へ到達する細胞が十分でないことが判明したので、直視下に盲腸近辺の腸間膜静脈をから門脈への細胞注入を行った。投与細胞数が多くなると梗塞をおこして肝臓に大きなダメージを与えることが判明したので、培養時にFGF2を添加することで、細胞の小型化をはかり、投与時にヘパリンを添加した。

ASCにMMP2を強制発現させることで、*in vitro*においてコラーゲンを分解する酵素活性をもったASCを作製することができた。しかしNASHモデルマウスに投与しても、明らかな線維化の改善は認められなかった。その原因としては生着した細胞数が十分でなかった可能性が考えられる。これまでの経験で、投与細胞数を多くすると塞栓をおこし

てしまうため、今回は細胞数を少なめにした。今後至適細胞数のさらなる検討が必要であると思われた。

#### E. 結論

脂肪由来の間葉系幹細胞にMMP2を強制発現させて移植し、NASHモデルにおいて線維化の改善を検討したが、*in vivo*での明らかな効果は証明できなかった。

#### 研究発表

##### 1.論文発表

なし。

##### 2.学会発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

「肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞の治療効果機序の解明」

研究分担者氏名 : 酒井 佳夫

所属機関 : 金沢大学 職名 : 准教授

研究要旨 :

【目的】間葉系幹細胞は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能に加え、肝細胞への分化能も報告されている。また、強力な抗炎症効果を有する。脂肪組織には間葉系幹細胞が豊富に含まれ、脂肪組織由来間質細胞 (ADSC) を用いた肝疾患に対する再生療法への応用開発が期待されるが、その治療効果機序には不明な点が多い。本研究では Concanavalin A (ConA)誘導肝炎モデルマウスを用いて、ADSC による炎症についての治療効果機序を検討した。

【方法】C57BL/6 マウスに対し Concanavalin A を経尾静脈的に投与し、ConA 誘導肝炎モデルマウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞を C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織より分離、培養継代し獲得した。ConA 誘導肝炎モデルマウスに対して、ADSC を経尾静脈的に投与し、血液生化学所見、および肝組織における免疫染色、遺伝子発現解析による検討を行った。

【成績】ConA 誘導肝炎モデルマウスにおいて投与後 6~24 時間後の血清 ALT 活性値および LDH 活性値上昇を確認した。一方、ADSC 投与により血清 ALT 活性値および LDH 活性値は有意な改善を認め、ADSC による治療効果を確認した。ConA 誘導肝炎モデルマウス肝組織内において CD4+、CD11b+、Gr-1+、F4/80+炎症細胞の浸潤が確認されたが、肝組織内 CD11b+、Gr-1+、F4/80+細胞集簇は、ADSC 投与により著明に抑制された。また、ADSC を投与した ConA 肝炎マウスの肝組織の遺伝子発現解析により、ADSC による肝炎抑制効果は、ミエロイド系炎症細胞の抑制によることが示唆された。

【考案】ADSC 投与による ConA 肝炎の治療効果は、ミエロイド系細胞の抑制によることが示され、ADSC 投与による肝再生修復効果、機序に関する知見が得られた。

A. 研究目的

脳死肝移植の件数が伸び悩むなか、細胞移植による再生医療は大きく注目されている。特に間葉系幹細胞は多分化能および抗炎症作用の報告があり、また自己由来の細胞を用い、遺伝子操作を行わないことから再生療法への応用・開発が強く期待されている。一方で治療効果機序には不明な点が多い。本研究では Concanavalin A (ConA) 誘導肝炎モデルマウスを用い、ADSC による治療の効果と機序の詳細を検討した。

B. 研究方法

C57BL/6 マウスに対し Concanavalin A を経尾静脈的に投与し、ConA 誘導肝炎モデルマウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞を C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織よ

り分離、培養継代し獲得した。ConA 誘導肝炎モデルマウスに対して、ConA 投与 3 時間後に ADSC を経尾静脈的に投与した。ConA 投与 24 時間後に血液を採取し、血清 ALT 活性値および LDH 活性値を確認した。肝組織を採取し CD4, CD11b, Gr-1, F4/80 抗体を用いた免疫染色を行い検討した。また、肝組織より RNA を抽出し DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析による検討を行った。

C. 研究結果

ConA 誘導肝炎モデルマウスにおいて投与後 6~24 時間後の血清 ALT 活性値および LDH 活性値上昇を確認した。血清 ALT 活性値および LDH 活性値は ConA 投与 3 時間後に ADSC 投与を投与したところ、ConA