

平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))
分担研究報告書

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」

研究分担者氏名 : 宮島 篤

所属機関 : 東京大学分子細胞生物学研究所 職名 : 教授

研究要旨 :

【目的】 肝線維化あるいはその改善に関わる骨髄中の細胞種および因子の解析
【方法】 骨髄中で存在比率の高い単球、好中球に着目し、それらの細胞群を単離して、遺伝子発現解析を行う。また、遊走した単球や好中球が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染刺激を行い、その因子を認識する細胞種を特定する。さらに、各種免疫細胞をその因子で刺激し、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。
【成績】 遺伝子発現解析の結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことが明らかとなった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。また、単球や好中球を DAMPs の一つである HMGB1 で刺激すると、単球は炎症性サイトカインやケモカインを産生し、好中球は MMP13 を高発現することが明らかになった。
【考案】 本実験により、骨髄投与療法による治療効果には単球によるサイトカイン産生、及び好中球の MMP によるコラーゲンの溶解が寄与している可能性が示された。また、遊走した肝臓内で単球や好中球が反応する物質として DAMPs の一つである HMGB1 が候補の一つであることが示された。

共同研究者
榎本豊、田中稔、伊藤暢

A. 研究目的

ABMi 法による肝硬変の治療効果を示す細胞種の候補としては、骨髄球系細胞が示唆されている。しかし、骨髄球系細胞は非常にヘテロな細胞集団であり、どの細胞種が肝硬変治療効果を示すかは特定されていない。今後 ABMi 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で、細胞種の特定は不可欠である。

そこでまず、フローサイトメーターにより、マウスの骨髄中に多く存在する細胞種を特定する。そして、各細胞種で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現量の比較検討を行う。次に、肝臓内に遊走した各細胞種が反応する因子を推測して、その因子と各種免疫細胞の表面マーカーとの共染色を行い、その因子を認識する細胞

種を特定する。さらに、各種免疫細胞をその因子で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析する。

B. 研究方法

骨髄中に多く存在する細胞種を特定するため、フローサイトメーターを用いてマウスの骨髄中の細胞種の比率を解析した。次に各細胞種の mRNA から cDNA を作製し、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量、及び、炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量を定量的 PCR により解析した。

四塩化炭素投与では、肝細胞がネクローシスを起こすことが知られている。ネクローシスを起こした細胞からは DAMPs の一つである HMGB1 が放出され、広く免疫細胞を活性化することが知られている。そこ

で、四塩化炭素投与により傷害を与えたマウスの血清から、HMGB1 の存在量を ELISA 法により定量した。また、その肝臓内で HMGB1 と各種免疫細胞のマーカーを抗体により共染色して、HMGB1 を認識する細胞種を特定した。次に、単球や好中球を HMGB1 で刺激を行い、線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子の発現変化を解析した。

C. 研究結果

骨髄中の細胞種の特定

マウス骨髄中の細胞種を特定するため、フローサイトメトリー解析を行った結果、CD11b+/Ly-6G+の好中球が約 40%と最も多く存在し、続いて CD11b+/Ly-6C+の単球が約 15%存在することが明らかになった。骨髄中に多く存在するこれらの細胞が、線維化の改善に対して、何らかの機能を持つことが示唆された。

線維化改善関連遺伝子の発現比較

好中球と単球間で線維化の改善に寄与すると考えられる遺伝子発現を比較解析した。その結果、線維を溶解すると考えられる MMP-8, 9, 13 の発現量は、単球より好中球の方が高いことがわかった。一方で炎症抑制性サイトカインである IL-10 の発現量は好中球より単球で高いことがわかった。このことから、好中球は繊維を溶解し、単球は炎症を抑制することで線維化の改善に寄与することが示唆された。

血清中の HMGB1 の定量解析、及び肝臓内における HMGB1 の蓄積

四塩化炭素投与により傷害を与えたマウスの血清から、HMGB1 の存在量を ELISA 法により定量した。その結果、四塩化炭素投与後 24 時間から 72 時間の間、つまり肝細胞の傷害が見られる時間帯に、血清中の HMGB1 レベルが高くなることが明らかになった。さらに、肝臓の免疫染色の結果、その時期には肝臓内でも HMGB1 が傷害部位に広く蓄積していることがわかった。そして、その蓄積した HMGB1 には単球や好中球、好酸球などの免疫細胞が隣接しており、HMGB1 を認識して活性化している可能性が示唆された。

HMGB1 による単球、好中球への刺激

次に単球や好中球を *in vitro* で HMGB1(1000 ng/ml) 24 時間刺激したところ、単球では TNF α や IL-6 などのサイトカイン、MIP1 や MIP2、MCP-1 などのケモカインの発現量が上昇することが明らかになった。一方好中球では、サイトカインの分泌はほぼ見られなかったが、MMP-13 の発現量が上昇することが明らかになった。

D. 考察

肝硬変の治療効果を示す細胞種や遊走した細胞が反応する因子を特定することは、ABMi 法による治療効果を高めたり、その治療メカニズムを明らかにしたりする上で不可欠である。本研究結果により、骨髄中の単球や好中球が重要であることを示唆する結果が得られた。近年では単球や好中球は炎症の抑制にも働く細胞であると考えられており、治療効果が期待できる細胞種である。

また、単球はサイトカインの分泌、好中球は MMP を高発現するなど、その役割の違いを示唆する興味深い結果が得られた。今後は、投与する細胞数やそのタイミング、刺激の有無など様々な条件を検討し、よりよい治療方法を模索していく。

E. 結論

本研究により、骨髄中の単球や好中球が線維化の改善に重要であることが示唆された。しかし、その具体的なメカニズムの解明や、どのような方法がよりよい治療効果を示すかは未だ明らかでない。今後は、上記の点に留意して研究を進め、実際のヒトへの治療法の改善につなげたい。

研究発表

1. 論文発表

1. Takase H., Itoh T., Wang T., Koji T., Akira S., Takikawa Y., and Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes and Development* 27, 169-181, 2013.
2. Inagaki F., Tanaka M., Inagaki N., Yagai T., Sato Y., Sekiguchi K., Oyaizu N., Kokudo N., and Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430, 751-756, 2013.
3. Tanimizu N., Kikkawa Y., Mitaka T. and Miyajima A. α 1- and α 5-Containing laminins regulate the development of bile

ducts via β 1-integrin signals. *J. Biol. Chem.* 287, 28586-28597, 2012.

4. Senga K., Mostov K. E., Mitaka T., Miyajima A., and Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Mol Biol. Cell.* 23, 2845-2855, 2012.

5. Miyaoka Y., Ebato K., Kato H., Arakawa S., Shimizu S., and Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Current Biology* 22, 1166-1175, 2012.

6. Komori T., Tanaka M., Senba E., Miyajima A. and Morikawa Y. Lack of Oncostatin M receptor b leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J. Biol. Chem.* 288, 21861-21875, 2013.

7. Miyaoka Y. and Miyajima A. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Division* 8, 8, 2013.

8. Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol. Cell. Biol.* 34:900-913, 2014.

9. Komori T, Tanaka M, Semba M, Miyajima A, and Morikawa Y. Deficiency of OSMRb exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J. Biol.*

Chem. 289, 13821-13837, 2014.

10. Yagai T, Miyajima A and Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *American J. Pathology* Aug;184(8):2250-2259, 2014.

11. Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N and Miyajima A. Mature resting Ly6Chigh natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur. J. Immunology*. Sep;44(9):2638-47, 2014.

12. Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A and Tanaka M. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by affecting adipogenesis and osteoblastogenesis. *PLoS One* 2014 Dec 31;9(12):e116209.

2. 学会発表

1. 谷貝 知樹, 田中稔、宮島篤. 肝再生および肝線維化における Semaphorin 3E の機能, 第 85 回日本生化学会大会. 福岡, 2012 年 12 月 16 日

2. 佐藤 郁、田中稔、宮島篤. オンコスタチン M による骨髄造血環境の制御機構の解明. 第 85 回日本生化学会大会, 福岡、2012 年 12 月 14 日 ~ 16 日.

3. 田中稔、小森 忠祐、森川吉博、仙波恵美子、宮島篤. オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する. 第 85 回日本生化学会、福岡、2012 年 12 月 16 日.

4. 西條栄子、内木隆寛、宮島篤. 肝臓の発生および代謝機能獲得における Tribbles 遺伝子の

役割. 第35回分子生物学会、福岡、2012年12月12日

5. 稲垣冬樹、田中稔、稲垣奈都子、國土典宏、宮島篤. 肝炎におけるネフロネクチンの病態生理的意義. 第19回肝細胞研究会、札幌、2012年6月29日

6. 金子 洸太、伊藤 暢、宮島 篤
A novel 3D imaging technique reveals dynamic behavior of the biliary tree in regenerating livers. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡, 2012 年 12 月 12 日

7. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima, "Critical role of FGF7 in regulating mouse adult liver stem/progenitor cells and regeneration in damaged livers" International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 10th Annual Meeting. Pacifico Yokohama, June 14th, 2012

8. Tohru Itoh, Hinako Takase, Atsushi Miyajima. "FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration" Keystone Symposia "Stem Cell Regulation in Homeostasis and Disease" Banff, February 28, 2013.

9. 松田道隆、田中稔、中内啓光、宮島篤、オンコスタチン M によるマウス肝線維化促進機構の解析、第 86 回日本生化学会、横浜、2013.

10. 西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤, 肝線維化における肝臓 M2 様マクロファージの役割, 第 20 回肝細胞研究会。大阪、2013.

11. Yagai T, Tanaka M and Miyajima A, Function of Semaphorin 3E in liver

- fibrosis and regeneration. 第 20 回肝細胞研究会。大阪、2013.
12. Miyajima A., Liver stem cells in development and regeneration, Asia Pacific Association of Study of Liver Disease, Singapore, June 8, 2013
13. Omi A, Kaniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Two subsets of mature mouse NK cells based on the expression of Ly6C, 第 78 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会/ 第 21 回 マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同学術集会, 東京、2013.
14. Omi A, Kaniwa T, Enomoto Y and Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature mouse NK cells, 15th International Congress of Immunology, Milano, 2013.
15. Omi A, Kaniwa T, Enomoto Y, Miyajima A. Expression of Ly6C defines two subsets of mature NK cells、第 42 回 日本免疫学会学術集会, 幕張、2013.
16. 佐藤郁、田中稔、宮島篤, Role of Oncostatin M in the bone marrow microenvironment for hematopoiesis、日本血液学会, 札幌、2013.
17. 松田道隆 田中稔 宮島篤 Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M, 第 20 回 肝細胞研究会, 大阪、2013.
18. 田中稔、谷貝知樹、宮島篤、肝細胞死から見た肝障害後の再生および線維化の制御機構、第 86 回日本生化学会、横浜、2013.
19. Tanaka M., Komori T, Matsuda M, Morikawa Y and Miyajima A., Oncostatin M regulates the cross talk between insulin resistance and liver fibrosis by switching the M1/M2 activation of macrophages. International Symposium on Transcription and Metabolism. 淡路島、2013.
20. 谷貝 知樹、田中 稔、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析, 第 86 回日本生化学会大会, 横浜、2013.
21. 松田道隆、田中稔、宮島篤、Mechanism of liver fibrosis induced by Oncostatin M. FASEB Summer Research Conferences. Keystone Resort (U.S.A.)2014/7/6-11
22. 松田道隆、田中稔、宮島篤.オコスタチン M によるマウス肝繊維化促進機構の解析. 第 28 回肝類洞壁細胞研究会学術集会. 岡山、2014.12.13.
23. 谷貝 知樹、松井 理司、原田 憲一、中沼 安二、稲垣 冬樹、西條 栄子、宮島 篤、田中 稔. 胆管傷害および胆管癌における sterile alpha motif domain containing 5 の発現解析.第 21 回 肝細胞研究会。東京、2014.6.27.
24. 木庭乾、榎本豊、尾見歩惟、宮島篤. Overexpression of IL-4 augments NK cell activities in vivo. 第 43 回日本免疫学会学術集会. 京都市。2014.12.10.
25. Tohru Itoh, Seitaro Ino, and Atsushi Miyajima. Notch signaling promotes proliferation of adult liver progenitor cells and progenitor-dependent liver regeneration. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8
26. Kota Kaneko, Tohru Itoh, Atsushi

Miyajima. Novel visualization method reveals connection of adult liver progenitor cells to biliary trees in various liver injuries. FASEB Summer Research Conferences. Keystone. 2014.7.8.

27. 神元健児、金子洸太、伊藤暢、宮島篤. マウス肝臓の再生過程における胆管系前駆細胞の性状解析. 第47回発生生物学会. 名古屋市. 2014.5.27

28. 宮島篤. 肝臓の炎症・再生 - 基礎から応用へ. 第35回日本炎症・再生医学会 教育講演 2014.7.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1.特許取得：該当なし
- 2.実用新案登録：該当なし
- 3.その他：なし