

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

「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呈す、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)。

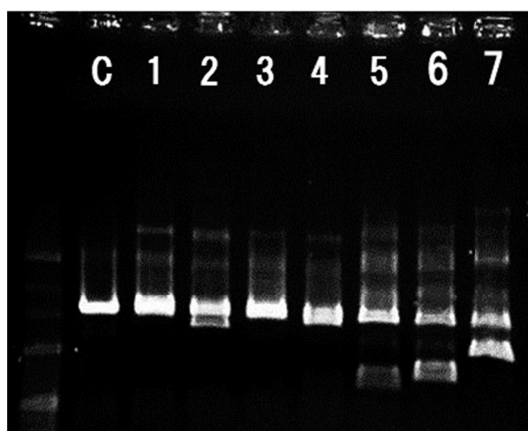


図. OGFRL1 KO マウス (F1) の電気泳動像

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 1 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. Yutaka Inagaki and Reiichi Higashiyama: Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 2012; 42(6): 543-548.
2. Isao Okazaki and Yutaka Inagaki: Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2012; 12(7): 753-763.
3. 稲垣 豊、中尾祥絵、瀧澤友里、住吉秀明：肝線維症治療の研究はどこまで進展したか？*肝胆膵* 2012; 65(2): 253-260.
4. 稲垣 豊：今なぜ肝線維化研究が注目されているのか。*医学のあゆみ* 2013; 244(6): 513.
5. 住吉秀明、稲垣 豊：コラーゲン分子種と線維症形成へのかかわり。*医学のあゆみ* 2013; 244(6): 515-520.
6. Tsukui T, Ueha S, Abe J, Hashimoto S, Shichino S, Shimaoka T, Shand FHW, Arakawa Y, Oshima K, Hattori M, Inagaki Y, Tomura M, and Matsushima K: Qualitative rather than quantitative

changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 183(3): 758-773, 2013

7. Li X, Bian Y, Takizawa Y, Hashimoto T, Ikoma T, Tanaka J, Kitamura N, Inagaki Y, Komada M, and Tanaka T: ERK-dependent downregulation of Skp2 reduces Myc activity with HGF, leading to inhibition of cell proliferation through a decrease in Id1 expression. *Mol Cancer Res* 11(11): 1437-1447, 2013

8. 住吉秀明、稲垣 豊：マウス皮膚創傷治療モデルにおける筋膜由来線維芽細胞と希少コラーゲンのはたらき．*食品加工技術* Vol.33(No.3): 124-130, 2013

9. Kamiya A, Inagaki Y. Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration. *Hepatol Res* 2015; 45(1): 29-37.

10. 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(9): 2171-2175.

11. 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(4):1636-1644.

12. Okazaki I, Noro T, Yamanouchi E, Kuroda H, Nakano M, Yokomori H, and Inagaki Y: Fibrogenesis and carcinogenesis in NASH: Role of MMPs and TIMPs. *Cancers(Basel)* 2014 Jun 27;6(3):1220-55.

13. 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(5): 709-715.

14. 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(3): 204-213.

15. 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(5): 1458-1467.

2. 学会発表

1. 住吉秀明、瀧澤友里、中尾祥絵、三上健一郎、茂呂 忠、穂積勝人、紙谷聡英、稲垣 豊：細胞系譜特異的 Notch/Jagged-1 シグナルによる肝線維化と再生の病態形成．第 12 回日本再生医療学会総会、横浜、2013 年

2. Hanako Yamaoka, Hideaki Sumiyoshi, Sachie Nakao, Kaori Minakawa, Yuri Takizawa, Norihiro Ikoma, Tomotaka Mabuchi, Akira Ozawa, Kiyoshi Higashi, Koichi Saito, and Yutaka Inagaki: A novel small compound antagonizing TGF- β /Smad signal stimulates migration and proliferation of keratinocytes and enhances wound healing. 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. Naha, 2012

3. Yutaka Inagaki, Hideaki Sumiyoshi, Hiroshi Fukumitsu, Reiichi Higashiyama, Sachie Nakao, Kaori Minakawa, Yuri Takizawa, Hanako Yamaoka, Tadashi Moro, Isao Okazaki, Koichi Saito, Kiyoshi Higashi: Identification of a novel bone marrow cell-derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2012
4. 瀧澤友里、辺 穎、小山 遼、楊 宇、駒田雅之、福光 寛、中尾祥絵、皆川香織、山岡華児、住吉秀明、稲垣 豊、喜多村直実、田中利明：Hepatocyte growth factor (HGF)による細胞増殖制御機構の解明 . 第 19 回肝細胞研究会、札幌、2012 年
5. 稲垣 豊：線維肝の再生における骨髄と肝臓の臓器相関 . 第 11 回日本再生医療学会総会、シンポジウム 5 「臓器再生の名脇役達 - 血管再生と炎症・間質組織の生理学的および病理学的役割 - 」、横浜、2012 年
6. 住吉秀明、福光 寛、東山礼一、中尾祥絵、皆川香織、茂呂 忠、山岡華児、瀧澤友里、東 清史、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と臨床応用 . 第 11 回日本再生医療学会総会、横浜、2012 年
7. 茂呂 忠、東山礼一、住吉秀明、稲垣 豊：胆汁うっ滞型肝線維症におけるコラーゲン産生細胞の起源と初期動態 . 第 48 回肝臓学会総会、ワークショップ 21 「肝線維化の病態解明と治療への展開」、金沢、2012 年
8. 三上健一郎、東山礼一、遠藤 哲、坂本十一、沢田直也、福田眞作、稲垣 豊：Notch/Jagged-1 シグナルを介した肝前駆細胞動員と線維化の制御機構 . 第 48 回肝臓学会総会、ワークショップ 21 「肝線維化の病態解明と治療への展開」、金沢、2012 年
9. 福光 寛、東山礼一、住吉秀明、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と臨床応用 . 第 48 回肝臓学会総会、ワークショップ 15 「肝再生、幹細胞研究が臨床医学にもたらす可能性」、金沢、2012 年
10. 住吉秀明、三上健一郎、茂呂 忠、紙谷聡英、稲垣 豊：細胞系譜特異的 Notch/Jagged-1 シグナルによる肝線維化と前駆細胞動員の制御機構 . 第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 6 日、東京
11. 住吉秀明、山岡華児、中尾祥絵、生駒憲広、馬淵智生、小澤 明、東 清史、斎藤幸一、稲垣 豊：新規低分子化合物 HSc025 は細胞増殖と遊走を活性化して創傷治癒を促す . 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山
12. 中尾祥絵、茂呂 忠、住吉秀明、稲垣 豊：胆汁うっ滞型肝線維症におけるコラーゲン産生細胞の起源と初期動態 . 第 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山
13. 茂呂 忠、中尾祥絵、住吉秀明、宮沢正樹、石井恭正、石井直明、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 45 回日本結合組織学会学術大会・第 60 回マトリックス研究会大会合

同学会大会、2013年6月28日、和歌山

14. Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Inagaki Y: Mitochondrial oxidative stress exacerbates inflammation and subsequent fibrogenesis in high fat diet-induced murine hepatic steatosis. 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, 2013.9.25, Osaka, Japan

15. Sumiyoshi H, Fukumitsu H, Higashiyama R, Nakao S, Minakawa K, Sueoka M, Chikada H, Kamiya A, Higashi K, Saito K, Inagaki Y: Identification of a novel bone marrow cell-derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver. The 20th Annual Meeting of the Japanese Society for the Research of Hepatic Cells, 2013.9.27, Osaka, Japan

16. Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Inagaki Y: Direct contribution of mitochondrial oxidative stress to hepatic fibrogenesis. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2013. 11. 3, Washington DC

17. 住吉秀明、山岡華児、中尾祥絵、生駒憲広、馬淵智生、小澤明、東清史、斎藤幸一、稲垣豊：Pirin誘導低分子化合物Hsc025は細胞増殖と遊走を活性化して創傷治癒を促す。第13回日本再生医療学会総会、2014年3月5日、京都

18. 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

19. 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繊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

20. 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繊維化改善・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

21. 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

22. 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イキス誘導は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

23. 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

24. 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

25. 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.

26. Ando W, Yokomori H, Inagaki Y, Okazaki I, Suzuki Y, Nobuhiro T, Tamaouchi E, Tanabe H, Kuroda H, Kojima S, Hara M, Oda M, Komiyama T. The serum levels of SDF-1 α 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.

27. 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

28. 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14回再生医療学会、横浜、2015年3月20日

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)