

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09367

研究課題名(和文) 肝細胞プロファイリングに基づくヒト慢性肝不全の病態解明と新規治療法の確立

研究課題名(英文) New therapeutic approach for human chronic liver failure based on hepatocyte profiling.

研究代表者

西川 太一郎 (Nishikawa, Taichiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90433250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝不全の病態解明を目標とし、様々な分子生物学的手法を用いて正常および肝硬変肝細胞の性質の比較検討を行った。細胞培養の解析では、肝細胞が本来もつアルブミン合成、尿素合成といった細胞機能が肝硬変で低下していた。さらに遺伝子の発現パターンや代謝機能の解析をすすめた結果、肝不全の病態が進行すると肝細胞がより未成熟な形質になり、細胞内の代謝経路の変化とエネルギー産生能の低下が病態基盤の一因となっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝硬変の進行により慢性的な肝不全におちいった患者に対して、現状では肝臓器移植に代わる根治治療法は未だ十分に確立できていない。本研究は、ヒト慢性肝不全の病態において、肝臓を構成している肝細胞のレベルで細胞機能の低下が生じていること、また細胞機能の低下に繋がっている遺伝子レベルでの原因の探索とそれによって生じた細胞内の代謝経路の変化を明らかにした。今後、それらを標的とした新規治療の開発に資する点で、大きな意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：Aiming at the pathological elucidation of chronic liver failure, we compared the properties of normal and cirrhotic hepatocytes using various molecular biological techniques. In cell culture analysis, hepatocyte functions such as albumin synthesis and urea synthesis were decreased according to the progression from normal to cirrhosis. Furthermore, as a result of gene array analysis and metabolomics, hepatocytes become more immature traits on pathological condition of chronic liver failure, and its change in intracellular metabolic pathways resulted in decreased energy production capacity. This study revealed a cause of human chronic liver failure.

研究分野：肝臓

キーワード：肝不全 肝細胞 肝硬変 エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性肝疾患の進行により肝不全におちいった患者に対して、現状では肝臓器移植に代わる根治治療は未だ十分に確立できていない。我々はこれまでに、動物モデルを用いた慢性肝不全病態の解析から、肝細胞における細胞機能の低下が病態形成に関与しており、肝細胞特異的転写因子ネットワークの破綻が重要なメカニズムであること、また特定のマスター因子を標的とすることにより病態の改善を図りうることを明らかにした。しかしヒト症例における検討は、これまでに十分なされていない。

2. 研究の目的

我々は、ヒト慢性肝不全における肝細胞の形質変化と病態への関与について明らかにするため、採取した新鮮肝細胞の細胞培養系での機能解析および網羅的な遺伝子発現プロファイリングを行うこととした。また肝臓の働きの中でも特に重要な代謝機能にも焦点をあて、細胞サンプルを用いたメタボローム解析との統合により、病態のさらなる究明と治療標的の探索についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞の分離採取と培養系での肝細胞機能の解析

慢性肝不全肝細胞については肝移植症例のレシピエント肝を対象とし、得られた肝検体からコラゲナーゼ還流法、遠心分離法により肝細胞を採取、また正常肝細胞については Lonza 社より購入し、以下の検討を行った。

分離肝細胞の質の評価

新鮮肝細胞採取時に、トリパンブルー染色にて細胞生存率の評価、またI型コラーゲンコートディッシュに播種後、10%ウシ胎仔血清、ヒトインスリン(1.0ug/ml)、デキサメタゾン(1x10⁻⁷M)を添加したヒト肝細胞維持培地(HMM、Lonza)で培養し、翌日の細胞接着率の測定により分離肝細胞の機能的維持につき検討を行った。

肝細胞のアルブミン産生能、尿素合成能の評価

細胞培養開始後は完全培地交換を毎日行い、1週間維持培養を行った。保存した上澄みサンプルを用いてヒトアルブミン ELISA アッセイ (Bethyl Laboratories, Inc.) Urea アッセイ (BioAssay Systems) により、化学比色定量法にて肝細胞単位でのアルブミン産生能、尿素合成能を測定した。

(2) mRNAアレイ、miRNAアレイを用いたヒト肝細胞の網羅的プロファイリング解析

肝細胞サンプルからトリゾール法にてtotal RNAを抽出し、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し (Agilent社・SurePrint G3 Human GE 8x60K Ver. 3.0、Agilent社・SurePrint G3 Human miRNA 8x60K Rel.21.0)、以下の検討を行った。

各種ソフトウェアを用いて、データの標準化と統計解析を行った後に、層別化解析(クラスタリング解析)を行い、正常から非代償期肝硬変への肝不全進展過程において大きく変動する因子を抽出し、肝不全病態に特異的な候補因子のスクリーニング抽出を行った。

Gene Ontology、Pathway解析、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 等のバイオインフォマティクス解析により、抽出された候補因子の機能的な意義を検証する。またmRNAアレイとmiRNAアレイの結果の統合解析により、肝不全病態で生じた肝細胞機能低下に関わるシグナルカスケードの考察と候補パスウェイの絞り込みを行った。

(3) ヒト肝細胞の代謝プロファイリングとエネルギー代謝関連機能の解析

保存した分離肝細胞サンプルおよび培養系での上澄みサンプルを用いて、以下の検討により代謝関連のプロファイリング解析を行った。

ガスクロマトグラフィー質量分析法を用いたメタボローム解析により、正常および肝不全肝細胞における代謝プロファイリングの比較検討を行った。

肝不全病態の進行に伴う肝細胞でのエネルギー代謝経路の変異の有無をみるため、化学定量法による培養肝細胞でのグルコース消費能、乳酸分泌能の評価、さらには肝細胞内の総ATP量、NAD/NADH比、NADP/NADPH比の評価、PCR法によるミトコンドリア定量を行った。

メタボロームと(2)のアレイデータを用いたKEGG解析による各代謝経路の関連遺伝子の発現変動と(3)のメタボローム解析の結果を統合的に検討することにより、肝不全肝細胞でのエネルギー代謝の変化を引き起こしているキーファクターの探索を行った。

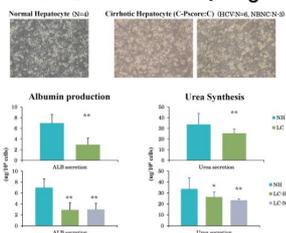
4. 研究成果

(1) ヒト肝細胞の採取と培養系での肝細胞機能の解析

ヒト非代償期肝硬変症例 (Child-Pugh score>10, C) より分離肝細胞採取し、細胞生存率、培養ディッシュへの接着率が80%以上の質の良いものを選択した結果、C型肝炎症例が6例、非B非C症例が3例、さらに同様の質の正常肝症例を4例くわえて、これらを解析対象とした。

培養肝細胞の24時間あたりのアルブミン合成能、尿素合成能はいずれも正常肝細胞と比較して肝不全肝細胞で有意に低下しており (P<0.001)、肝不全病態の進行に伴って、細胞レベルでの肝機能低下が認められた (Fig 1)。

Fig 1



(2) 分離肝細胞における遺伝子発現プロファイリングの比較解析

(1)で採取した4例の正常肝細胞と9例の非代償期肝硬変肝硬変細胞のmRNAアレイのデータを比較した結果、8894遺伝子に有意に発現変動が認められた (FC>2, P<0.05)。これらの遺伝子をIngenuity Pathway analysisソフトウェアを用いて解析したところ、肝不全病態で影響の大きなパスウェイとして肝線維化/肝星細胞の活性化に関わるシグナルが上位に位置付けられ、それを制御する上流の因子としてTNFalpha, TGFbeta1などがピックアップされた (Fig 2)。また肝細胞特異的な遺伝子群の発現状況を見ると、肝硬変肝細胞では前駆細胞マーカーの発現が増加する一方、成熟肝細胞への誘導ならびに肝細胞機能に関わる遺伝子群の発現は低下しており (Fig 3)、肝細胞の未熟化が細胞機能低下さらには臓器機能の低下に繋がっている可能性が示唆された。これらの機序については、mRNAアレイとmiRNAアレイの結果を統合解析した結果から、肝細胞の機能的成熟化に重要とされる肝細胞特異的転写因子群を中心としたシグナルカスケードを作成し、肝不全で想定される重要な候補パスウェイのひとつとして位置付けた (Fig 4)。

Fig 2

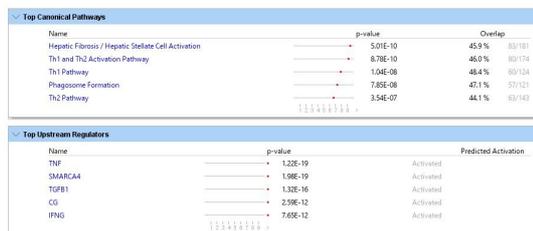


Fig 3

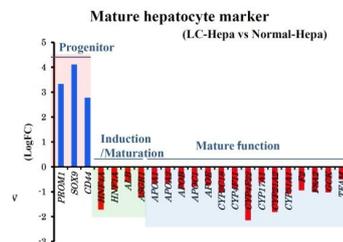
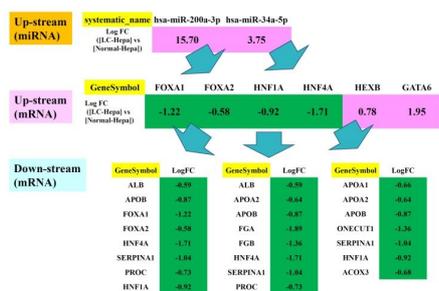


Fig 4



(3) 分離肝細胞におけるエネルギー代謝に焦点をおいた機能解析

(1)(2)の検討より、肝硬変肝細胞では機能的な成熟不全により、個々の肝細胞機能が正常肝細胞と比較して低下していることが確認された。そこで肝細胞の代謝活動維持の根幹となるエネルギー代謝に関連した機能解析を行った。細胞培養の系では、肝硬変肝細胞ではグルコース取り込み能および乳酸分泌能が増加しており、解糖系のエネルギー代謝が亢進していた (Fig 5)。一方、細胞サンプルを用いた解析では分離肝細胞内における総ATP量は、肝硬変肝細胞で有意に減少しており (Fig 6)、エネルギー産生そのものは正常細胞と比較し低下していること、またその原因として細胞内ミトコンドリア量の減少が認められたことから (Fig 7)、ミトコンドリア内でのTCAサイクルおよび酸化リン酸化経路でのエネルギー産生が低下している可能性が示唆された。これについては、さらに酸化リン酸化経路の反応基質であるNAD/NADH比、ペントースリン酸化経路の反応基質であるNADP/NADPH比の測定により、肝硬変肝細胞でミトコンドリア内でのエネルギー産生の低下と解糖系優位の代謝シフトが生じていることが確認された (Fig 8,9)。

Fig 5

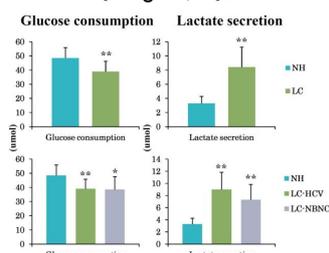


Fig 6

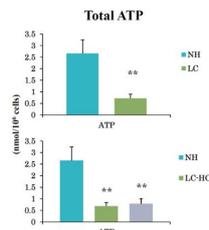


Fig 7

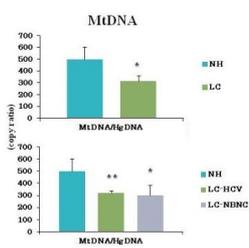


Fig 8

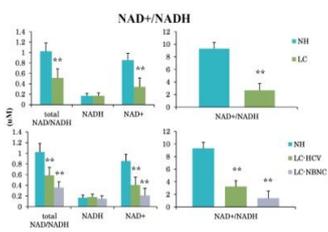
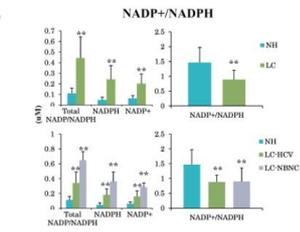


Fig 9



(4) 発現アレイとメタボローム解析の統合による肝不全病態の検討

肝硬変肝細胞における代謝シフトによるエネルギー産生低下については、さらに治療標的の探索も含め、肝細胞内の代謝産物の網羅的なメタボローム解析により機序の検討を行った。肝不全病態の肝細胞では、検出された96の代謝産物中27で有意な変動が認められ (P<0.05、Fig 10)、特に肝細胞内で合成変換される非必須アミノ酸への影響が大きかった。これらアミノ酸の多くは、ミトコンドリア内のTCAサイクル内で変換をうけることから、発現アレイのデータを KEGG (kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) パスウェイ解析したものと、メタボローム解析の結果を統合し、さらに検証した。肝硬変肝細胞では解糖系の代謝過程の酵素はHK1、ENO1等で発現の有意な増加がみられ、その代謝産物であるピルビン酸、乳酸量は増加がみられた (Fig 11)。ミトコンドリア内での代謝経路に関しては、ピルビン酸を代謝基質の起点とするTCAサイクルの代謝過程の酵素については、PC、IDH1、MDH1等で発現の減少がみられ、代謝遅延に伴うクエン酸量の増加とコハク酸や複数の非必須アミノ酸量の低下が認められた (Fig 12)。また細胞内ATP産生の大部分を担う酸化リン酸化経路についても、複合体、
、
を構成する複数の因子の発現が低下しており (Fig 13)、肝硬変肝細胞内でATP量が著明に低下していた結果に合致する結果であった。

Fig 10

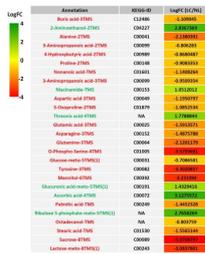


Fig 11

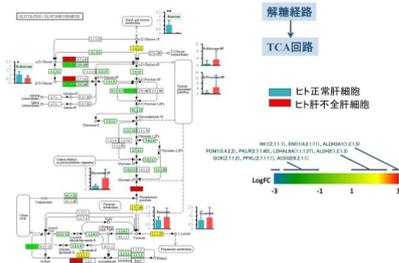


Fig 12

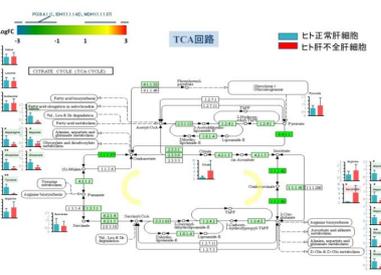
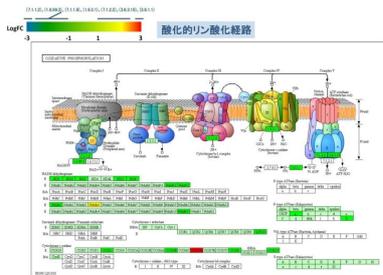


Fig 13



以上の結果より、慢性肝不全の病態においては肝細胞レベルにおいて、既報の成熟細胞から体性幹細胞への代謝プログラミングの変化に酷似した、ミトコンドリア関連のエネルギー産生能 (TCAサイクル、酸化リン酸化経路) の低下と嫌氣的糖代謝へのシフトがみられ、総合的なATP産生能は低下し、細胞生存や多岐にわたる同化的代謝の低下につながっている可能性が示唆された。本研究は、ヒト肝細胞に焦点を置いた細胞プロファイリング解析により、病態に関わる細胞形質の変化と複数の標的pathwayを同定し、将来の治療応用に資する結果を示した点で意義があったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 西川 太一朗	4. 巻 126
2. 論文標題 肝疾患における再生医療	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 京都府立医大雑誌	6. 最初と最後の頁 473 - 481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taketani H, Nishikawa T, Nakajima H, Kodo K, Sugimoto S, Aoi W, Horike SI, Meguro-Horike M, Ishiba H, Seko Y, Umemura A, Yamaguchi K, Moriguchi M, Yasui K, Itoh Y	4. 巻 12
2. 論文標題 Aging-associated impairment in metabolic compensation by subcutaneous adipose tissue promotes diet-induced fatty liver disease in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes Metab Syndr Obes	6. 最初と最後の頁 1473-1492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/DMSO.S214093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Seko Y, Nishikawa T, Umemura A, Yamaguchi K, Moriguchi M, Yasui K, Kimura M, Iijima H, Hashimoto T, Sumida Y, Okanoue T, Itoh Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Efficacy and safety of canagliflozin in type 2 diabetes mellitus patients with biopsy-proven nonalcoholic steatohepatitis classified as stage 1-3 fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes Metab Syndr Obes	6. 最初と最後の頁 835-843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/DMSO.S184767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川 太一朗、竹谷 祐栄、伊藤 義人
2. 発表標題 慢性肝不全モデルを用いた疾患リプログラミングによる肝再生治療の開発
3. 学会等名 第58回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 竹谷祐栄、西川太一朗、原祐、瀬古裕也、石破博、岡嶋亮、榎村敦司、山口寛二、森口理久、角田圭雄、安居幸一郎、伊藤義人
2. 発表標題 食事誘導性マウスモデルにおけるNAFLDの病態進展と脂肪組織加齢との関連性
3. 学会等名 第58回日本消化器病学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西川 太一朗、竹谷 祐栄、伊藤 義人
2. 発表標題 肝細胞プロファイリングに基づく慢性肝不全の病態解明と臓器機能の再生アプローチ
3. 学会等名 第15回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 竹谷 祐栄、西川 太一朗、榎村 敦司、山口 寛二、森口 理久、角田 圭雄、光吉 博則、安居 幸一郎、伊藤 義人
2. 発表標題 加齢に伴う脂肪組織のエネルギー代謝代償機転の破綻はNAFLDの病態を増悪させる
3. 学会等名 第102回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 西川 太一朗、竹谷 祐栄、伊藤 義人
2. 発表標題 食餌誘導性マウスNAFLDモデルにおける脂肪組織の加齢性変化と肥満および肝病態進展との関連
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川 太一朗、竹谷 祐栄、瀬古 裕也、榎村 敦詩、山口 寛二、森口 理久、伊藤 義人
2. 発表標題 食事誘導性マウスモデルにおける脂肪組織の加齢性変化と肥満病態に基づくNAFLDの進展
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川 太一朗、竹谷 祐栄、伊藤 義人
2. 発表標題 肥満マウスモデルにおけるエネルギー代謝からみた脂肪組織の加齢性変化とNAFLDの進展およびその治療への応用
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川 太一朗、竹谷 祐栄、伊藤 義人
2. 発表標題 肝細胞プロファイリングに基づく慢性肝不全モデルの病態解明と治療標的の探索
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究概要、施設ホームページ内</p> <p>慢性肝不全の病態解明と細胞移植療法による肝疾患治療の開発 http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/reseaches/kiso-kenkyu.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----