

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09375

研究課題名(和文)オートタキシンとリゾリン脂質を基軸とする類洞微小環境を介した肝再生制御機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms of liver regeneration mediated by sinusoidal microcirculation in the regulation of autotaxin and lysophospholipid

研究代表者

北村 庸雄 (Kitamura, Tsuneo)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：20231285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は高度の再生能を有するが、それには肝実質細胞と非実質細胞の協調が不可欠であり、特に肝再生後期の肝類洞再構築は、肝再生が正常に終了出来るかどうかを規定する重要なステップである。autotaxin (ATX) は多彩な機能を有する脂質メディエーターとして、lysophosphatidic acid (LPA) の産生に関わっているが、その制御機構には不明な点が多く、肝再生治療の新しい標的分子となる可能性が考えられる。ラット肝再生モデルを用いた本研究では、肝再生と ATX/LPA の直接的な関連は明らかではなかったが、今後肝類洞内皮細胞をターゲットとすることで新たな展開が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の再生医学の進歩は、種々の疾患領域で再生医療の実現を可能にしつつある。肝臓は古くより再生することで知られ、再生医療に適した臓器と考えられるが、肝再生医療の実現には依然大きな課題が残されている。その理由の一つには、肝臓が単一の細胞から成り立っているのではなく、実質細胞と種々の非実質細胞から構成されている為に、個々の細胞の増殖だけではなく、それらの協調により初めて肝再生が完成するという点が挙げられる。肝類洞内皮細胞には autotaxin (ATX) のスカベンジャー・リセプタが高発現しているという報告もあり、肝再生における新しいコーディネータの役割を果たしている可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：The liver is unique in its ability to regenerate in response to injury, and liver regeneration requires the mutual interaction in parenchymal hepatocyte and non-parenchymal liver cells. Among non-parenchymal cells in the liver, liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) play a crucial role in sinusoidal remodeling at the late stage of liver regeneration. Autotaxin (ATX) and its product, lysophosphatidic acid (LPA), are generally involved in a variety of biological functions including cellular proliferation, migration, and apoptosis. Thus, it is interesting to postulate how ATX and LPA play a role in sinusoidal remodeling at the termination of liver regeneration. In the present study, the direct relation between liver regeneration and ATX/LPA axis has not been revealed. However, since it has been reported that LSECs have the scavenger receptor for ATX, more specific analysis targeting these cells could have the potential to figure out the role of ATX/LPA axis in liver regeneration.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝再生 肝類洞再構築 肝類洞内皮細胞 オートタキシン リゾリン脂質 リゾホスファチジン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- 肝再生の研究は従来肝実質細胞の増殖を中心に進められてきたが、vascular biology の進歩にともない、肝類洞内皮細胞の担う役割が新たに注目されつつある。すなわち、肝細胞の増殖には肝類洞内皮細胞の増殖・分化による血管新生・類洞の再構築が必要であり、その機能制御を明らかにすることで肝再生不全の治療に新たな展開が期待出来るものと思われる。
- ATX は悪性黒色腫細胞の培養上清から、オートクラインによる細胞運動促進因子として単離され、その後 lysophospholipase D (lysoPLD) 活性を有することが明らかとなった。ATX/lysoPLD は lysophosphatidyl choline (LPC) より LPA を産生し、G タンパク質共役受容体 (GPCR) である LPA リセプターを介し血管新生に関わる多様な生理活性を呈することが知られている。
- ATX ノックアウトマウスは血管形成に異常を来し胎生致死となり、又、ATX トランスジェニックマウスでも同様に血管形成の異常がみられる為、ATX の生体内での制御は精妙に制御されていることが推測される。ATX は血液のみならず、尿・脳脊髄液・卵胞液などに存在することより、種々の細胞が恒常的に ATX を分泌していると思われるが、その制御機構には不明な点が多い。
- 近年、ATX の血液中活性はラット肝硬変モデル・慢性肝疾患症例で血中 LPA と強く相関して亢進することが池田らにより明らかにされた。一方、マウス肝類洞内皮細胞では scavenger receptor を介し ATX の取り込みがみられることが報告され、さらに最近ではマウスに静脈内投与された LPA は肝の非実質細胞に多く集積するという知見が得られている。

2. 研究の目的

- 本研究の目的は、肝の再生機構を ATX-LPA を基軸とした血管新生（肝類洞再構築）という新たな視点から解析し、肝再生不全機構を明らかにすることで治療への応用に資することにある。具体的にはラット部分肝切除モデルを用い、*in vivo* 及び *in vitro* で血管微小環境（vascular niche）と肝再生の関係を細胞の増殖・遊走・分化・細胞骨格の変化などとの関連で検討する。ATX-LPA axis の基礎的研究は緒についたばかりで、その調節機構には未知の部分も多いが、肝再生における肝類洞再構築の意義を考える上で重要な課題と思われる。具体的な本研究の特色は以下の点にみられる。

1. 肝再生促進因子の多くは肝実質細胞の増殖を直接的に誘導するものであり、非実質細胞による肝類洞再構築をターゲットとしたものは少ない。70% 部分肝切除後ラットにおいて肝実質細胞の増殖が肝再生早期にピークとなるのに対し、非実質細胞の増殖は肝再生後期に最大に達することから、我々は、*in vitro* で肝細胞増殖作用をもたない sphingosine 1-phosphate (S1P) を部分肝切除後ラットの肝再生後期（肝類洞再構築期）に投与することで、肝細胞増殖を有意に促進することを明らかにした。70% 部分肝切除後早期の肝細胞増殖期における投与は肝細胞増殖を惹起しなかったことから、S1P が肝類洞再構築を誘導した結果として肝再生が促進された可能性が強く示唆され、本研究はこれまでに無い新たな視点に立脚したものである。
2. 我々は既にラット肝類洞内皮細胞の初代培養系を確立し、増殖・分化・アポトーシスなどの機能が継代培養系と比べ異なっていることを観察している。安定した初代培養

系は限られた施設でしか得られておらず、形質転換していない初代培養系を用いることで生理的な解析が可能なことは本研究の大きな特色といえる。

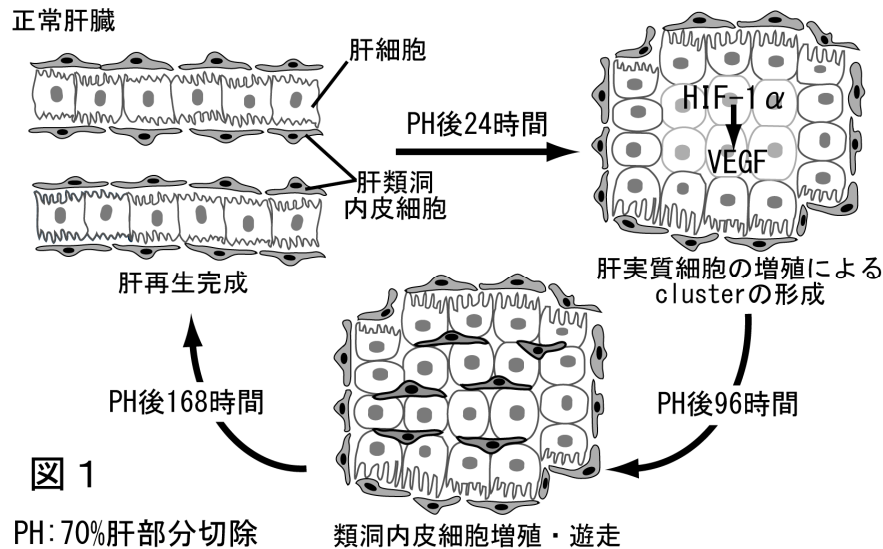


図 1

3. 研究の方法

- ラット部分肝切除モデルを用い実験では、残存肝の autotaxin (ATX)、LPA (lysophosphatidic acid) の発現を解析し、肝切除後の時間的变化を観察する。又、ATX の阻害剤および LPA の分解酵素である LPP3 (Lipid Phosphate Phopatase) を用い肝再生への影響を検討する。さらに、正常および部分肝切除ラットからそれぞれ初代培養の肝実質細胞・肝類洞内皮細胞・星細胞を分離培養し ATX、LPA receptor の発現を解析すると同時に、それぞれの細胞に及ぼす ATX、LPA の作用を細胞内シグナル伝達、細胞骨格の変化などを中心に検討する。具体的には、以下のようである。

1. 基礎実験として、正常ラット肝組織における ATX、LPA の発現を解析し、血液・胆汁中や他臓器（肺、腎、消化管、心臓など）における発現と比較する。
2. ラット 70% 部分肝切除モデルを用い、肝切除後の時間経過における血中および残存肝組織中の ATX、LPA の発現を解析する。又、残存肝組織を用い肝実質細胞、肝類洞内皮細胞の DNA 合成能を BrdU labeling index により算定し、残存肝重量と比較解析する。
3. 同様の実験を ATX 阻害剤の前投与後に行ない、部分肝切除後肝再生における ATX の作用を検討する。
4. 同様の実験を LPA degrading enzyme である LPP3 の前投与後に行ない、部分肝切除後肝再生における LPA の作用を検討する。
5. 70% 部分肝切除後ラットにおいて LPA を肝再生早期（肝細胞増殖期）と後期（肝類洞再構築期）に投与した場合、それぞれで肝小葉内の肝類洞内皮細胞の分布・細胞密度にどのような変化がみられるかを細胞増殖・アポトーシスとの関連において解析する。さらにそのときの細胞間接着機装置（gap junction、tight junction）の変化についても免疫染色を用いて検討を加える。
6. さらに、肝星細胞を免疫組織学的に多重染色することにより、肝類洞再構築過程での星細胞の分布・肝類洞内皮細胞との接着につき解析し、肝再生における肝実質細胞と非実質細胞の相互関係を構造的・機能的に検討する。
7. 正常ラットおよび 70% 部分肝切除後ラットよりそれぞれ初代培養の肝実質細胞、

非実質細胞(肝類洞内皮細胞、星細胞など)を分離培養し、PCR を用い LPA receptor の解析を行うと同時に ATX 活性の測定を行ない、各々の発現動態を比較検討する。

8. 正常および部分肝切除ラットからそれぞれ肝実質細胞・肝類洞内皮細胞を分離培養し、それぞれの細胞に及ぼす LPA の作用を live cell imaging として観察し、細胞内カルシウム・シグナリングの解析を行う。
9. 同時に、細胞の形態変化および遊走能をマルチ高速イメージングシステム(現有)による time-lapse movie でリアルタイムに観察し、この過程での細胞外基質 (collagen, fibronectin, laminin) による影響および細胞骨格蛋白 (actin・myosin) の細胞内分布変化を免疫染色により合わせて検討する。又、connexin 26, 32 などの細胞間結合蛋白の発現動態との関連についても検討を加える。
10. 同様の実験を ATX 阻害剤の前投与後に行ない、ATX の阻害が細胞運動能や細胞骨格の変化に及ぼす影響につき検討を加える。
11. 細胞増殖能の変化を経時的に観察するため、モノクローナル抗 BrdU 抗体を用いた間接免疫蛍光抗体法により BrdU labeling index を算定し、細胞内カルシウム・イメージングとの対比において解析する。
12. 現有する最新の超高分解能蛍光顕微鏡 (STED: Stimulated Emission Depletion) を用いて肝類洞内皮細胞の観察を行い、従来電子顕微鏡でしか解析し得なかった肝類洞内皮細胞の fenestrae の収縮を、細胞内カルシウム・シグナリングとの関連で比較検討する。
13. 肝類洞内皮細胞の機能発現には NO (nitric oxide) による調節が重要であり、eNOS (endothelial NO synthase) 分子は内皮細胞膜に豊富に存在する膜陥入構造である caveolae に局在することから、caveolae 局所での Ca^{2+} 動態は NO 産生に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、STED を用い、部分肝切除後ラットより作製した肝類洞内皮細胞における caveolae の形態学的特徴を観察し、正常ラットより作製した肝類洞内皮細胞と比較検討する。さらに、NO 蛍光指示薬を用いることで NO 産生についても解析し、細胞内カルシウム・シグナリングとの比較についても検討を加える。

4. 研究成果

肝臓は高度の再生能を有するが、それには肝実質細胞と周囲の非実質細胞の協調した増殖・分裂が不可欠であり、特に肝再生後期に起こる肝類洞再構築は、肝再生が正常に終了出来るかどうかを規定する重要なステップである。

オートタキシン (ATX; autotaxin) は血管新生・創傷治癒など多彩な機能を有する脂質メディアエーターとして、リゾリン脂質の一つであるリゾホスファチジン酸(LPA; lysophosphatidic acid) の産生に関わっているが、その制御機構には不明な点が多く、肝再生治療の新しい標的分子となる可能性が考えられる。

一方、ATX は肝線維化調節因子としての役割も注目されており、血清 ATX の測定は慢性肝疾患に対するバイオマーカーとして既に実用化されている。肝再生と肝線維化の間には密接な関係があることから、ATX と肝線維化-肝再生の関連を明らかにすることには大きな意義があると考えられる。

本研究では、ラット胆管結紮による肝障害モデルを用い、肝再生と ATX-LPA axis につき検討

した。これまでに行なった血中 ATX 活性、血漿 LPA 濃度の測定については、肝再生過程で有意な変化が認められなかった為、肝組織中の ATX 量をオートタキシン抗体を用いて Western blotting で解析したところ、ATX 自体の検出は可能であったが、肝再生過程において有意な変化はみられなかった。

一方、ラット 2/3 肝切除における肝再生モデルにおいて、血清 ATX 活性・量、および血漿 LPA 量を経時的に解析したところ、肝再生に特徴的な変化は認められなかった。先行研究によると、ラットに投与した ATX はスカベンジャー・リセプタを介して肝類洞内皮細胞に取り込まれると報告されて居り、今後は肝再生過程における肝類洞内皮細胞の ATX 活性と LPA につき検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Moriaga CS, Iwamoto S, Kitamura T, Fujishiro M, Takahashi N, Katsunari K, Ogawa H, Tominaga M, Takamori K.	4. 巻 99
2. 論文標題 Plasma Dynorphin A Concentration Reflects the Degree of Pruritus in Chronic Liver Disease: A Preliminary Report.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Derm Venereol.	6. 最初と最後の頁 442-443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/00015555-3139.	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 Nakayama H, Nagafuku M, Suzuki A, Iwabuchi K, Inokuchi JI.	4. 巻 1804
2. 論文標題 Role of Glycosphingolipids and Glycosphingolipid-Enriched Lipid Rafts in Immunological Functions.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 83-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwabuchi K	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Gangliosides in the immune system -Role of glycosphingolipids and glycosphingolipid-enriched lipid rafts in immunological functions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gangliosides: Methods and Protocols	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okubo H, Kitamura T, Ando H, Fukada H, Igusa Y, Kokubu S, Miyazaki A, Fujimura A, Shiina S, Watanabe S	4. 巻 57
2. 論文標題 Gadoxetic Acid-Enhanced MR Imaging Predicts Simeprevir-Induced Hyperbilirubinemia During Hepatitis C Virus Treatment: A Pilot Study	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Clin Pharmacol	6. 最初と最後の頁 369-375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcph.811	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 北村庸雄、高森建二	4. 巻 72
2. 論文標題 胆汁酸研究の進歩と展望. 痒みの発生機序	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 肝・胆・膵	6. 最初と最後の頁 877-891
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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, Kinoshita T, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Yokoyama N, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K	4. 巻 11
2. 論文標題 Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Signal	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaf1585	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sueyoshi K, Sumi Y, Inoue Y, Kuroda Y, Ishii K, Nakayama H, Iwabuchi K, Kurishita Y, Shigemitsu H, Hamachi I, Tanaka H	4. 巻 6
2. 論文標題 Fluorescence imaging of ATP in neutrophils from patients with sepsis using organelle-localizable fluorescent chemosensors	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Ann Intensive Care	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13613-016-0175-z	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 該当する

1. 著者名 Tabe Y, Hatanaka Y, Nakashiro M, Sekihara K, Yamamoto S, Matsushita H, Kazuno S, Fujimura T, Ikegami T, Nakanaga K, Matsumoto H, Ueno T, Aoki J, Yokomizo T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T, Iwabuchi K, Sasai K	4. 巻 92
2. 論文標題 Integrative genomic and proteomic analyses identifies glycerol-3-phosphate acyltransferase as a target of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Radiat Biol	6. 最初と最後の頁 24-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3109/09553002.2015.1106021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 中山仁志、岩淵和久	4. 巻 80
2. 論文標題 スフィンゴ糖脂質の脂質ラフトの構造と機能：ラクトシルセラミドの脂質ラフトを介した 自然免疫応答	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 62-72
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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Iwabuchi K, Nakayama H.
2. 発表標題 Role of LacCer-enriched lipid raft in LPS-induced immune responses in human neutrophils.
3. 学会等名 2nd Japan-Korea Lipid Joint Symposium, Sapporo, Japan, Sep. 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iwabuchi K, Nakayama H
2. 発表標題 Role of Lactosylceramide-enriched lipid microdomains in innate immune response of human phagocytes
3. 学会等名 23rd International Symposium on Glycoconjugates (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yokoyama N, Toshihide K, Inokuchi J, Alessandro P, Sandro S, Iwabuchi K
2. 発表標題 Properties and functions of glycosphingolipid-binding molecules are highly dependent on the organization of glycosphingolipid-enriched domains
3. 学会等名 Glycobiology at Nervous system (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩淵和久
2. 発表標題 A paradigm shift in innate immunity has been the recent evidence of carbohydrate-carbohydrate interactions
3. 学会等名 箱守仙一郎糖鎖科学シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩淵和久
2. 発表標題 病原性抗酸菌によるヒト好中球感染防御の制御機構
3. 学会等名 第2回抗酸菌研究会,東京,(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iwabuchi K, Nakayama H.
2. 発表標題 Lactosylceramide is a key player in immunological functions of human neutrophils
3. 学会等名 Cell Synposia: 100 year of Phagocytes (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Iwabuchi K, Nakayama H, Yokoyama N and Iwabuchi K
2. 発表標題 Human neutrophils phagocytose mycobacteria through interactions between LacCer and 1,2-monomannose side
3. 学会等名 The Society For Leukocyte Biology 's 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016" (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nakayama H, Iwabuchi K, Yokoyama N and Ishii K
2. 発表標題 Organization and immunological functions of Lactosylceramide-enriched lipid rafts
3. 学会等名 The Society For Leukocyte Biology 's 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016" (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Kitamura T, Watanabe S	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer Japan	5. 総ページ数 145-155
3. 書名 Bile Acid in Gastroenterology: Basic and Clinical.	

1. 著者名 北村庸雄、高森建二	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医薬情報研究所	5. 総ページ数 76-80
3. 書名 慢性肝疾患における難治性そう痒症の治療の実際	

1. 著者名 Nakayama H. Iwabuchi K	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 12
3. 書名 Molecular mechanisms underlying the immunological activities of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in phagocytes	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

