

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19209028

研究課題名(和文)：HGFによる肝発生・分化制御機序解明に基づく肝再生医療基盤
技術創出研究課題名(英文)：A role of hepatocyte growth factor in regulation of hepatic development
and differentiation

研究代表者

坪内 博仁 (TSUBOUCHI HIROHITO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60145480

研究成果の概要(和文)：誘導型多能性幹(iPS)細胞における肝細胞への分化誘導には内胚葉細胞、肝内胚葉細胞および肝前駆細胞の誘導、さらに肝細胞の成熟化という多段階の過程が必要である。本研究では、iPS細胞のembryoid bodyにActivin A、bFGF、その後、BMP-2+FGF-4を添加して誘導した肝内胚葉細胞にHGF(100 ng/mL)を添加するとアルブミンと α フェトプロテイン(AFP)を高発現する細胞が誘導されることを見出しHGFが肝内胚葉細胞からの肝細胞分化に必須の因子であることを明らかにした。一方、肝内胚葉細胞ではDlk1が発現されているが、EpCAM発現が見られないことから、肝内胚葉細胞には肝芽細胞が存在する可能性が考えられた。この肝芽細胞を単離してHGFの肝細胞分化メカニズムの解明を進めているが、本研究の成果はHGFを用いた高効率な肝細胞分化誘導による難治性肝疾患に対する細胞移植医療への分子基盤となることが期待される。一方、HGFは肝細胞のみならず多くの組織の重要な再生・修復因子であり、消化管粘膜傷害直後に誘導されるepithelial restitutionに必須の因子とされている。そこで、ヒト胃粘膜上皮細胞にHGFを添加したところ、occludinのチロシンリン酸化を介してZO-1がoccludinから解離し、細胞遊走能が促進された。また、肺高血圧ラットにHGFを投与すると肺動脈の内皮細胞傷害が抑制され、炎症性細胞浸潤、中膜の肥厚が改善し、肺動脈圧の低下および生存率の改善が認められた。以上の結果からHGFは難治性疾患の新規治療薬となる可能性も考えられた。

研究成果の概要(英文)：Induction of hepatic differentiation of iPS cells requires multiple steps including induction of endodermal, hepatic endodermal, and hepatic progenitor cells, and maturation of hepatocytes. In this study, we found that, HGF increased albumin and alpha-fetoprotein expression in hepatic endodermal cells, which were induced in embryoid bodies of iPS cells treated with Activin A, bFGF, followed by BMP-2 and FGF-4 exposure. These results indicate that HGF plays an essential role in hepatic differentiation of hepatic endodermal cells. Conversely, hepatic endodermal cells expressed Dlk1, but not EpCAM, meaning the possibility that hepatoblast-like cells exist in the hepatic endodermal cells. The findings in this study contribute to establishment of novel cell transplantation therapies for intractable liver diseases using HGF-induced high efficient hepatic differentiation. Conversely, HGF is also essential for repair and regeneration of various injured tissues. Actually, HGF stimulated migration of gastric epithelial cells through modification of tight junction proteins, resulting in increased epithelial restitution in an *in vitro* ulcer model. Additionally, administration of HGF decreased pulmonary arterial pressure in a rat model of pulmonary arterial hypertension, resulting in prolonged animal survival. These results also indicate that HGF itself is a potent therapeutic agent for various intractable diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	19,700,000	5,910,000	25,610,000
2008年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009年度	10,100,000	3,030,000	13,130,000
総計	38,400,000	11,520,000	49,920,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓病学

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子(HGF)は劇症肝炎患者血漿から研究代表者らによって世界に先駆けて単離された肝再生を強力に促進する増殖因子である。また、HGFは肝細胞のみならず種々の上皮系細胞、血管内皮細胞等に対して、増殖促進、抗アポトーシス、細胞遊走能促進、抗線維化などの多彩な作用を誘導し、多くの組織の重要な再生・修復因子と考えられている。一方、HGFとその特異的受容体c-Metのノックアウトマウスは肝発育が見られず、胎生死することから、HGFは肝発生に極めて重要な役割を果たしていることが推測される。実際、最近、HGFが肝発生過程および胚性幹細胞(ES細胞)、肝芽細胞および骨髄由来肝幹細胞の肝細胞分化に必須の因子であることが明らかとなっており、我々は、HGFが成熟肝細胞のみならず、肝細胞または胆管上皮細胞への分化能を持った肝幹(前駆)細胞の増殖をも促進し、さらにそれらの細胞の肝細胞分化を誘導することを明らかとした。このようにHGFは肝発生および肝細胞分化に必須の因子であるが、胎生期の肝発生や肝芽細胞、さらに活発な増殖能、自己複製能および多分化能を持った種々の幹細胞の肝細胞分化におけるHGFの役割とその分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。このような状況から、HGFを必要とする種々の幹細胞の肝細胞分化誘導系における遺伝子及び蛋白発現を網羅的に解析することによりHGFの標的分子を同定し、さらにc-Metのコンディショナルノックアウトマウスを作製し、肝発生および種々の幹細胞、肝芽細胞の肝細胞分化におけるHGFやその標的分子の役割を明らかにすることを着想した。現在、劇症肝炎など難治性の肝疾患に対する組織換えヒトHGFの臨床応用が進められており、本研究の遂行によってHGFの肝発生および

種々の幹細胞の肝細胞分化におけるHGFの役割とその分子メカニズムが明らかとなれば、HGFを用いた肝再生医療の分子基盤となるのみならず、肝再生を目的とした幹細胞による細胞療法や新たな分子標的治療薬の基盤技術の創出につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝発生および肝細胞分化におけるHGFの役割を明らかとし、HGFの標的分子を同定することである。具体的には、まずHGFの作用をブロックする一本鎖(不活化)HGFを作製し、種々の幹細胞の肝細胞分化過程におけるHGFの影響を明らかにする。次に、遺伝子発現と蛋白発現の網羅的解析から、肝細胞分化過程におけるHGFの標的分子候補を絞り込む。一方、HGFの特異的受容体c-Metのコンディショナルノックアウトマウスを作製し、HGFの肝発生における役割を明らかにする。また、このノックアウトマウスから単離した肝芽細胞、骨髄由来幹細胞を用いて、先に同定したHGFの標的分子候補の肝細胞分化過程における役割を解析し、最終的にはHGFによる肝発生・分化制御機構の分子メカニズムの全貌を明らかとする。

3. 研究の方法

1. c-met コンディショナルノックアウトマウスの作製
マウス c-met 遺伝子をクローニングし、開始コドンの上流に loxP を挿入、c-met 遺伝子のターゲティングベクターを作製する。
2. 誘導型多能性幹 (iPS) 細胞の肝細胞分化誘導における HGF の役割の解明
(1) マウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) に activin A、bFGF、BMP-2、FGF-4、DMSO、

HGF、Dexamethasone、Oncostatin Mを用いて肝細胞分化を誘導、その至適条件を検討した。

- (2) 肝細胞分化に及ぼす上皮間葉転換 (EMT) 阻害薬 SB431542 の影響を検討した。
3. 傷害胃粘膜の epithelial restitution における HGF の役割の解析
ヒト胃粘膜上皮細胞 MKN74 に HGF を添加し下記の検討を行った。
 - (1) 細胞増殖能に及ぼす影響を MTT アッセイにて検討した。
 - (2) BD cell culture insert を用いて細胞遊走能に及ぼす影響を検討した。
 - (3) TJP である claudin (CLDN)-1, -3, -4, -7、occludin (OCLDN) および ZO-1 の発現を RT-PCR、western 法を用いて検討した。
 - (4) 免疫蛍光染色による TJP の細胞内局在を免疫蛍光染色を用いて検討した。
 - (5) 細胞膜および細胞質画分における TJP 量を western 法を用いて検討した。
 - (6) ZO-1/occludin (OCLDN) の interaction を共免疫沈降法を用いて検討した。また、OCLDN のチロシンリン酸化を western 法を用いて検討した。
4. 肺高血圧モデルに及ぼす HGF の薬理作用 monocrotaline を用いて肺高血圧を誘導したラットに組換えヒト HGF を持続静脈内投与し、下記の検討を行った。
 - (1) HGF 治療群および非治療群の生存率を比較検討した。
 - (2) 肺動脈圧および収縮期血圧を測定し、比較検討した。
 - (3) 病理組織学的に解析するとともに、肺動脈内腔を定量化し検討した。
 - (4) Platelet-driven growth factor の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

1. c-met コンディショナルノックアウトマウスの作製

マウス c-met 遺伝子クローニングを試み、複数のクローンを得たが、塩基配列解析から、ターゲティングベクターに必要な 5' 上流領域及び Exon 1~Exon 2 を含むクローンが得られなかった。一方、c-met コンディショナルノックアウトマウスを用いた研究成果が二報発表され、その研究室よりこのマウスの供与を受けることも試みたが、本研究期間内にマウスを入手することはできなかった。

2. 誘導型多能性幹 (iPS) 細胞の肝細胞分化誘導における HGF の役割の解明

- (1) 胚葉体 (Embryoid body: EB) の作製方法 (低接着プレートの選択、懸垂法など)、EB の大きさ (細胞数)、EB の個数 (プレート当たり)、細胞外基質、Activin A の至適濃度、DMSO の添加時期、HGF 濃度等を検討

し、肝細胞分化誘導法を検討した。その結果、iPS 細胞の embryoid body に Activin A、bFGF、その後、BMP-2+FGF-4 を添加して誘導した肝内胚葉細胞に HGF (100 ng/mL) を添加すると肝細胞マーカーであるアルブミンと α フェトプロテイン (AFP) を高発現する細胞が誘導されることを見出した (図 1)。さらに、HGF で誘導されたアルブミン、AFP 発現細胞では E-cadherin などの上皮系マーカーの発現が上昇し、HGF が肝内胚葉細胞からの肝細胞分化に必須の因子であることを明らかにした。

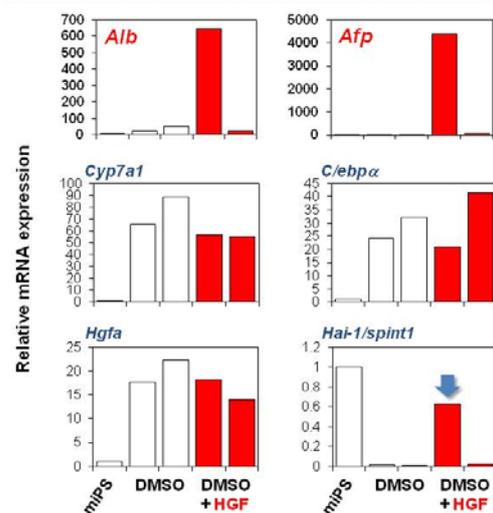


図 1 HGF の肝細胞分化に及ぼす影響
HGF を添加すると Alb、AFP が強く発現されるがバラツキもみられた

- (2) 肝内胚葉系細胞からの肝細胞分化を増強させるために、上皮間葉転換 (EMT) 阻害薬 SB431542 を添加したが、肝細胞マーカーの発現増加はみられなかった (図 2)。

iPS-20D-17

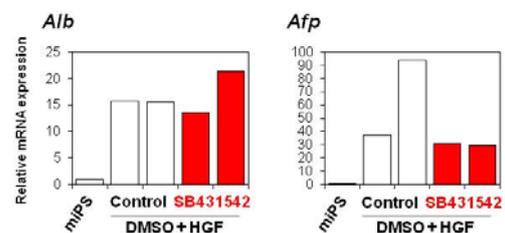


図 2 EMT 阻害薬 SB431542 の肝細胞分化に及ぼす影響
SB431542 を添加しても肝細胞マーカーの発現増強はみられなかった

一方、肝内胚葉細胞では Dlk1 が発現されているが、EpCAM 発現が見られないことから、肝内胚葉細胞には肝芽細胞が存在

する可能性が考えられた。この肝芽細胞を単離して HGF の肝細胞分化メカニズムの解明を進めているが、本研究の成果は HGF を用いた高効率な肝細胞分化誘導による難治性肝疾患に対する細胞移植医療への分子基盤となることが期待される。

3. 傷害胃粘膜の epithelial restitution における HGF の役割の解析

- (1) HGF はヒト胃粘膜細胞 MKN74 の増殖に影響を与えなかった。
- (2) HGF は MKN74 細胞の遊走能を用量依存的に 1.7-2.0 倍促進された (図 3)。

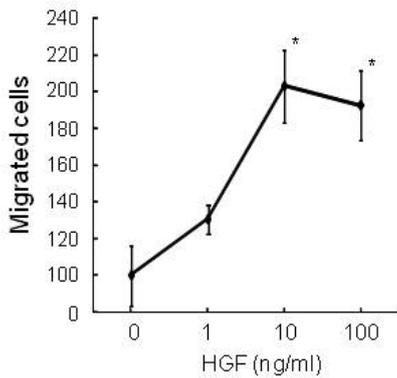


図 3 HGF は MKN74 細胞の遊走能を用量依存的に促進した

- (3) CLDN-1, 3, 4, 7, OCLDN, ZO-1 の mRNA およびタンパク発現に影響はなかった。
- (4) 細胞膜に局在する CLDN-4 および OCLDN に影響はなかったが、細胞膜に局在した ZO-1 が細胞質に移動した (図 4)。

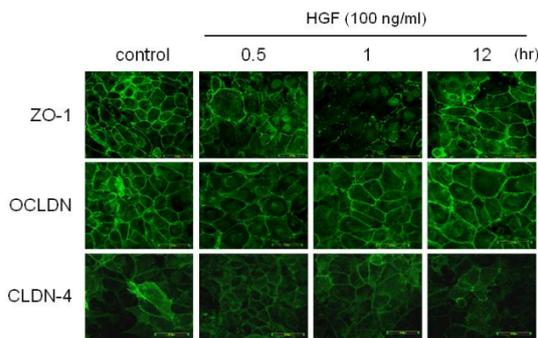


図 4 HGF によって細胞膜に局在した ZO-1 が細胞質に移動した。

- (5) ZO-1 の細胞膜画分が減少し、細胞質画分が増加した (図 5)。
- (6) ZO-1/OCLDN の interaction が減少し (図 6)、OCLDN のチロシンリン酸化が亢進した (図 7)。

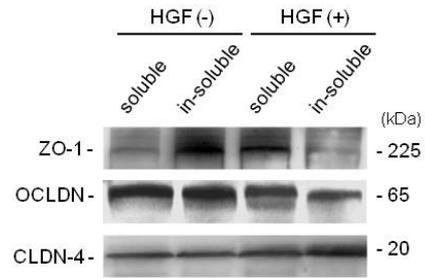


図 5 細胞膜 (insoluble) に発現する ZO-1 が現弱し、細胞質 (soluble) における蛋白量が増加した

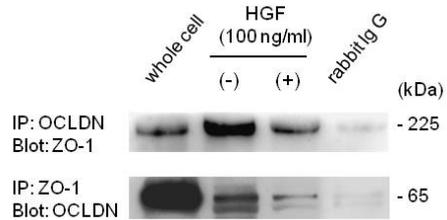


図 6 HGF によって ZO-1/OCLDN の interaction が減少した。

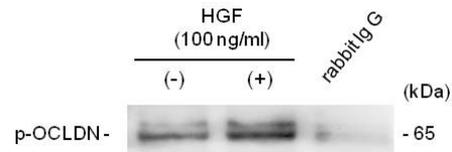


図 7 HGF 添加によって OCLDN のチロシンリン酸化が誘導された。

以上の結果から、傷害粘膜で誘導された HGF は、粘膜の透過性に影響をおよぼすことなく、OCLDN のチロシンリン酸化を誘導して ZO-1 を OCLDN から解離させ、epithelial restitution を誘導していることが示唆された。

4. 肺高血圧モデルに及ぼす HGF の薬理作用

- (1) monocrotaline にて誘導した肺高血圧ラットに HGF を 14 日間持続静注すると生存期間が有意に延長した (図 8)。

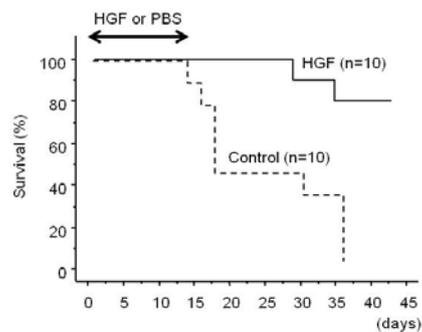


図 8 HGF 持続静注は肺高血圧ラットの生存率を改善した。

(2) HGF 単回静注は収縮期血圧を低下させた
が、肺動脈圧に変化を与えなかった。しか
し、HGF を 14 日間投与した肺高血圧ラット
では肺動脈圧が有意に低下した (図 9)。

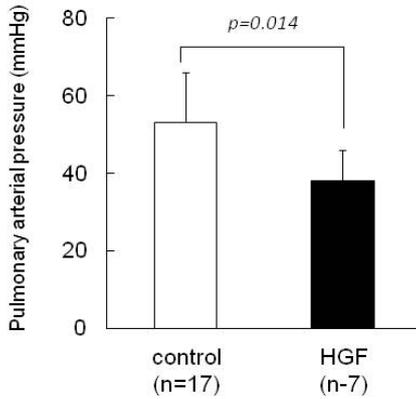


図 9 肺高血圧ラットに HGF を 14 日間持続
静注すると肺動脈圧が有意に低下した。

(3) HGF 治療群では肺動脈の中膜肥厚が有意
に軽減し、内腔の狭窄も改善された (図 10)。

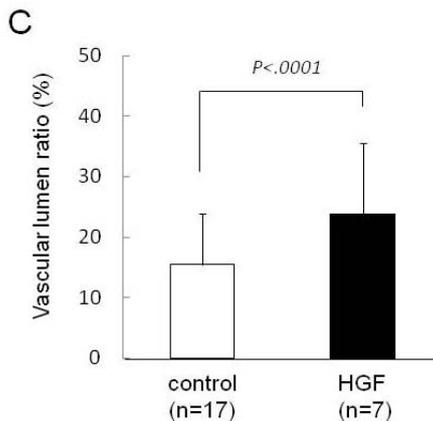
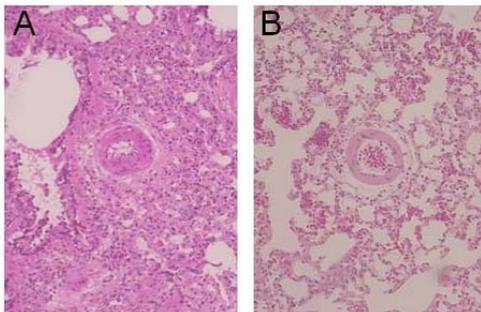


図 10 非治療群(A)に比して HGF 治療群(B)で
は肺動脈の中膜肥厚が軽減しており、内腔
の狭窄も改善された(C)。

(4) Platelet-driven growth factor の発現
を RT-PCR 法を用いて検討した (図 11)。

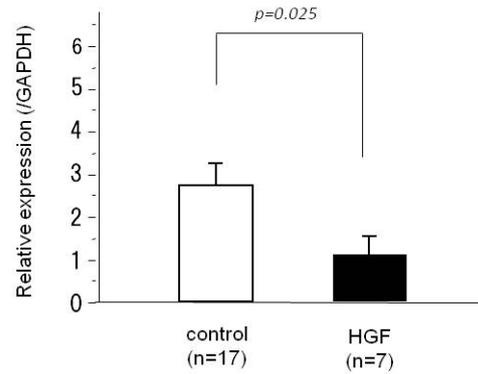


図 11 肺組織における PDGF の発現は
HGF 治療群で有意に低下していた。

以上の結果から、HGF は肺組織における
PDGF の発現抑制を介して、肺動脈壁肥厚を
改善することが考えられた。一方、HGF は
抗アポトーシス作用も有しており、肺動脈
内皮細胞傷害を抑制することで、炎症細胞
浸潤、コラーゲンの沈着、中膜肥厚を抑制
することも考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

- ① Nishida C, Uto H(2/11 番目), Oketani M(3/11 番目), Ido A(10/11 番目), Tsubouchi H(11/11 番目): Clinical significance of alanine aminotransferase levels and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol 45(3): 326-334(2010) (査読有)
- ② Takami Y, Uto H(2/11 番目), Oketani M(8/11 番目), Ido A(9/11 番目), Tsubouchi H(11/11 番目): Proanthocyanidin derived from the leaves of Vaccinium virgatum suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. Hepatol Res 40(3): 337-345(2010) (査読有)
- ③ Kodama M, Uto H(2/10 番目), Ido A(8/10 番目), Tsubouchi H(10/10 番目): Endoscopic characterization of the small bowel in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy. J Gastroenterol 43(8): 589-596(2008) (査読有)
- ④ Kanmura S, Uto H(2/10 番目), Ido A(8/10

番目), Tsubouchi H(10/10 番目): Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. Hepatology 45(4):948-956(2007) (査読有)

- ⑤ Uto H(1/12 番目), Ido A(6/12 番目), Oketani M(11/12 番目), Tsubouchi H(12/12 番目): Alanine aminotransferase flare-up in hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels in a hyperendemic area of Japan. J Gastroenterol 42(8):673-680(2007) (査読有)

[学会発表] (計 25 件)

- ① Nishida C, Uto H, Tokunaga K, Fukumoto M, Sogabe A, Nosaki T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Clinical Significance of Alanine Aminotransferase Levels and Effect of Ursodeoxycholic Acid in Hemodialysis Patients with Chronic Hepatitis c. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver(2009年2月13-16日)Hong Kong
- ② Uto H, Sato Y, Tanoue S, Ishida Y, Tamai T, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H: A fragment of high molecular weight kininogen is upregulated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. 59th Annual Meeting of American Association for the Study of Live Diseases(2008年10月31日-11月4日) San Francisco
- ③ Ido A, Moriuchi A, Marusawa H, Ikeda K, Numata M, Yamaji N, Setoyama H, Ido H, Oketani M, Chiba T, Tsubouchi H: Translational research of HGF: A phase I/II study of recombinant human HGF for the treatment of fulminant hepatic failure. 6th JSH Single Topic Conferens "Liver Failure:Recent Progress from Pathogenesis to Management"(2007年9

月28-29日)安比市

- ④ Uto H, Sato Y, Ishida Y, Takami Y, Kanmura S, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H: Proteomic analysis of serum biomarkers in patients with nonalcoholic steatohepatitis using SEDI-TOF/MS or MALDI-TOF/MS. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(2007年9月2-6日)Boston

[図書] (計 10 件)

- ① 井戸章雄, 坪内博仁: わが国の劇症肝炎の実態はどうなっているのか?. 現場の疑問に答える 肝臓病診療 Q&A: 10-13, 中外医学社(2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪内 博仁 (TSUBOUCHI HIROHITO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 60145480

(2) 研究分担者

井戸 章雄 (IDO AKIO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 30291545

桶谷 眞 (OKETANI MAKOTO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号: 50274816

宇都 浩文 (UTO HIROFUMI)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・講師
研究者番号: 20347058