

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590763

研究課題名（和文） 肝障害とその修復過程におけるオステオアクチビンの役割の解析

研究課題名（英文） Involvement of osteoactivin in hepatic injury and repair

研究代表者

井戸 章雄（ID0 AK10）

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

研究成果の概要：オステオアクチビンは肝硬変から肝癌が発生するラットモデルの肝臓から単離された遺伝子で、肝障害時にクッパー細胞で発現増強することが知られている。本研究の目的は、オステオアクチビンの障害肝の再生・修復と線維化に及ぼす影響を解析することである。マクロファージ系細胞を用いた実験から、オステオアクチビンはマクロファージへの分化誘導時に発現誘導され、そのほとんどがゴルジ体に、一部が細胞膜に存在することが明らかとなった。しかし、オステオアクチビン発現抑制系および強発現系を用いてマクロファージ機能に及ぼす影響に関する解析を進めている。一方、オステオアクチビン遺伝子を欠損したマウス（オステオアクチビン KO マウス）を作出し、全身またはマクロファージ特異的にオステオアクチビン遺伝子を欠損したマウスを作製した。本 KO マウスの作出によって、今後種々の疾患動物モデルを用いた *in vivo* 実験系における詳細な解析が可能となった。また、慢性 C 型肝炎の病態進展に及ぼすオステオアクチビンの影響を明らかにするために、C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陽性者におけるオステオアクチビン遺伝子 5' 上流領域に存在する二つの SNP (rs858239、rs3757450) を解析した。その結果、rs858239 TT および rs3757450 AG/GG は慢性 C 型肝炎の持続または病態進展に関与している可能性が示唆された。本研究期間内にオステオアクチビンの役割の全容を解明することはできなかったが、本研究の遂行によって肝障害に引き続く肝臓の再生・修復および肝線維化過程におけるオステオアクチビンの作用が明らかになれば、肝硬変、ひいては肝発癌を抑制する分子標的治療薬の開発や、抗肝炎や障害肝の再生・修復を目的とした探索的創薬につながることを期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肝障害、肝不全、肝再生、自然免疫、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

ウイルス肝炎の多くは慢性肝炎から肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。発癌には肝炎ウイルスのみならず、肝障害と持続する炎症、繰り返す再生・修復といった微小環境において複数の遺伝子異常が蓄積することが関与している。コリン欠乏アミノ酸置換 (CDAA) 食によるラット肝癌モデルは、肝硬変から前癌病変を経て12ヶ月で100%のラットに肝細胞癌の発生がみられ、肝硬変を背景に発生するヒト肝細胞癌に類似したモデルである。我々は肝癌発生の引き金となる原因遺伝子を明らかにする目的で、CDAA 食開始2ヶ月目の肝臓で発現亢進している遺伝子群からオステオアクチビン (osteostatin) 遺伝子を単離し、オステオアクチビンが硬変肝および肝癌において強発現し、肝癌細胞の転移・浸潤を増強すること (Onaga et al. *J Hepatol* 2003;39:779-85)、またオステオアクチビン発現増強が肝線維化を抑制することを見出した (Abe et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 610-5)。また、最近、オステオアクチビンが障害肝のクッパー細胞で発現増強していること、さらに樹状細胞でも発現していることが報告された (Haralanova-Ilieva et al. *J Hepatol* 2005;42:565-72, Shikano et al. *J Biol Chem* 2001;276:8125-34)。我々も既に白血病細胞のマクロファージへの分化誘導時にオステオアクチビン発現が増強することを見出しており、組織障害で活性化されるマクロファージおよび樹状細胞におけるオステオアクチビンの役割を明らかとし、肝障害時に肝クッパー細胞で発現増強するオステオアクチビンが肝障害とその再生・修復および線維化の過程にどのように関わっているかを明らかにすることを着想した。

本研究では、マクロファージに分化する細胞培養系や肝クッパー細胞、さらに骨髄または肝臓由来の樹状細胞を用いた *in vitro* 実験系において、オステオアクチビンの発現と抗原提示細胞としての機能に及ぼす影響を解析する。さらに、オステオアクチビン KO マウスを用いて、肝障害からそれに引き続いて起こる障害肝の再生・修復、さらには線維化過程におけるオステオアクチビンの役割を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージおよび樹状細胞を用いた *in vitro* 実験系においてオステオアクチビンの機能解析を行い、さらにオステオアクチビンのノックアウト (KO) マウス

を作製してオステオアクチビン発現の欠損が障害肝およびその再生・修復、さらに線維化に及ぼす影響を明らかにする。

また、C型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陽性者におけるオステオアクチビン遺伝子の SNP 解析を行い、オステオアクチビンの慢性C型肝炎の進展に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ系細胞におけるオステオアクチビンの機能解析

- ①白血病細胞 (HL60) に PMA によるマクロファージへの分化誘導を行い、オステオアクチビン発現の経時変化を RT-PCR 法で検討した。
- ②オステオアクチビンの N 末端に enhanced green fluorescence protein (EGFP) を融合させた発現ベクター (pEGFP-OA) を作成し、オステオアクチビンの細胞内局在を解析した。
- ③siRNA を用いたオステオアクチビンの発現抑制系を確立し、オステオアクチビンのマクロファージ系細胞に及ぼす影響を検討した。
- ④オステオアクチビン発現ベクターを用いてその過剰発現系を作製した。

(2) オステオアクチビン遺伝子ノックアウト (KO) マウスの作製

- ①オステオアクチビン遺伝子ターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に導入した。ポジティブ・ネガティブセレクションにおいてクローン化した ES 細胞から genomic DNA を抽出し、PCR またはサザン法を用いて相同組換えを検討した。
- ②確立した ES 細胞クローン株を仮母親の blastocyst に接種してキメラマウスを得た。
- ③キメラマウスから F1 マウス、さらにオステオアクチビンのコンディショナル KO マウスを得た。
- ④全身的またはマクロファージ (クッパー細胞) 特異的なオステオアクチビン KO マウスを得るために、Cre トランスジェニックマウスと交配させた。

(3) マウス肝非実質細胞の単離と初代培養系の確立

Balb/c マウス肝臓にコラゲナーゼ灌流法を用いて、肝細胞および肝非実質細胞を単離し、その初代培養系の確立を試みた。

(4) HCV 抗体陽性者におけるオステオアクチ

ビン遺伝子の SNP 解析

1994～2005年にHCV高感染地区住民検診を受診し、遺伝子解析に同意の得られたHCV抗体陽性者441人（HCV-RNA陽性：339人、陰性：102人）においてオステオアクチビン遺伝子5'上流領域のSNP（rs858239、rs3757450）を解析した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ系細胞におけるオステオアクチビンの機能解析

- ①HL60細胞のマクロファージ系細胞への分化過程におけるオステオアクチビンの発現をRT-PCR法で検討したところ、PMA添加24～48時間においてオステオアクチビン発現の誘導が認められた。一方、DMSOによる好中球への分化誘導時にはオステオアクチビン発現は認められなかった。
- ②マクロファージ系細胞への安定した遺伝子導入が困難であったため、オステオアクチビンの細胞内局在はラット肝癌細胞株dRLh84にpEGFP-OAを導入して解析した。オステオアクチビンはそのほとんどが細胞質の傍核領域に、一部が細胞膜に局在した。ゴルジ体マーカを用いて染色したところ、細胞質に認められたオステオアクチビンの局在はゴルジ体に一致した。
- ③オステオアクチビン発現を80～90%抑制するsiRNAを作製した。このオステオアクチビンsiRNAをマウスマクロファージ細胞株RAW264.7に導入したところ、サイトカイン産生能、ラテックスビーズを用いた食食能に影響を及ぼさなかった。
- ④サイトメガロウイルスプロモーターの制御化にオステオアクチビン遺伝子を挿入した発現ベクターを作製した。この発現ベクターを肝癌細胞に導入したところ、ウェスタン法でオステオアクチビンタンパクの過剰発現が認められ、この発現ベクターが正常に機能することが確認された。

[考察]

オステオアクチビンはマクロファージへの分化誘導系で発現誘導され、マクロファージ機能に何らかの影響を及ぼしていると考えられるが、発現抑制系を用いた実験ではその役割を明らかにすることは困難であった。今後、マクロファージにおけるオステオアクチビン強発現系を用いて解析を進める。

(2) オステオアクチビン KO マウスの作製

- ①コンディショナル・オステオアクチビン KO マウスを作製するために、オステオアクチビン遺伝子のエクソン1とイントロン1にloxP配列、その間に、FRT配列を両端にもつNeomycin耐性遺伝子を挿入したターゲティングベクターを作製した。こ

のベクターをES細胞に導入し、相同組換えにてターゲティングベクターが組み入れられたクローンを単離、確立した。

- ②確立したES細胞クローン株を用いて作製したキメラマウスを交配させ、F1マウスを得た。F1マウスをFLPトランスジェニックマウスと交配させ、Neomycin耐性遺伝子を除去したヘテロコンディショナルKOマウスを作製した。
- ③ヘテロコンディショナルKOマウスを交配させホモコンディショナルKOマウスを作製、FLP遺伝子を欠損した個体を選択した。
- ④全身またはマクロファージ特異的にオステオアクチビン遺伝子を欠損させるために、Cre recombinaseトランスジェニック(Cre-Tg)マウスと交配して、複数の産仔を得た。

[考察]

ホモコンディショナルKOマウスを得るまでにヘテロコンディショナルKOマウスの交配を複数回要したため、本研究期間内に全身およびマクロファージ特異的なオステオアクチビンKOマウスを用いた解析に到達できなかった。今後、Cre-Tgマウスとの交配によって得られたマウスにおいて、オステオアクチビン遺伝子の全身またはマクロファージ特異的な欠損を確認し、肝障害モデルにおけるオステオアクチビンの機能解析を進める予定である。

(3) マウス肝非実質細胞の単離と初代培養系の確立

マウス肝臓より肝非実質細胞を単離するために、まずはラット肝細胞をコラゲナーゼ灌流法を用いて単離し、初代培養を行った。ラット肝細胞の生細胞数(%)は90%以上と良好であった。次に、手技の難しいマウス肝細胞の単離を試みたが、生細胞数(%)は50%であった。

[考察]

今後、マウス初代肝細胞培養系とともに、非実質細胞系の単離、培養系を確立する。その後、オステオアクチビンKOマウスを用いて、肝障害およびその修復・再生過程におけるオステオアクチビンの役割をin vitro実験系にて解析する。

(4) HCV抗体陽性者におけるオステオアクチビン遺伝子のSNP解析

- ①rs858239 および rs3757450 はいずれもHCV-RNAの有無とは関連性を認めなかった。
- ②rs858239 TTではVI型コラーゲン7S(p=0.009)が有意に上昇していたが、ALT上昇とは関連性がみられなかった。
- ③rs3757450 AG/GGでは、血清フェリチン(p=0.028)、VI型コラーゲン7S(p=0.025)

が有意に上昇しており、HCV-RNA 陽性者において、rs3757450 AG および GG では ALT 上昇または動揺例が有意に多かった (p=0.029)。

[考察]

オステオアクチビン遺伝子 5' 上流領域の SNP rs858239 TT および rs3757450 AG/GG は慢性 C 型肝炎の持続または病態進展に関与している可能性が示唆された。今後、今回解析した SNP 領域のオステオアクチビン発現に及ぼす影響を検討し、病態との関連性について解析を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- (1) Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology* 2009 (in press) (査読有)
- (2) Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human neutrophil peptide 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 909-17. (査読有)
- (3) Takahama Y, Uto H, Kanmura S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Stuver S, Okayama A, Tsubouchi H. Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterology* 2008; 43: 942-50. (査読有)
- (4) Kodama M, Uto H, Numata M, Hori T, Murayama t, Sasaki F, Tsubouchi N, Ido A, Shimoda K, Tsubouchi H. Endoscopic characterization of the small bowels in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy. *J Gastroenterol* 2008; 43: 589-96. (査読有)
- (5) Uto H, Kurogi J, Takahama Y, Kusumoto K, Hayashi K, Ido A, Kohara M, Stuver SO, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Tsubouchi H. Alanine aminotransferase flare-up in hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine

aminotransferase levels in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterol* 2007; 42: 673-80. (査読有)

- (6) Abe H, Uto H, Takami Y, Takahama Y, Hasuike S, Kodama M, Nagata K, Moriuchi A, Numata M, Ido A, Tsubouchi H. Transgenic expression of osteoactivin in the liver attenuates hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 610-5. (査読有)
- (7) Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnosis potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology* 2007; 45: 948-56. (査読有)

[学会発表] (計 11 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 (APASL 2009) (2009 年 2 月 13 - 16 日) Hong Kong
- (2) Kumagai K, Uto H, Kure T, Mawatari S, Tamai T, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver S, Tsubouchi H: Clinical features of patients aged 75 years or older with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma in Japanese areas hyperendemic for hepatitis C infection. 19th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2009) (2009 年 2 月 13 - 16 日) Hong Kong
- (3) 井戸章雄: 組換えヒト肝細胞増殖因子を投与した劇症肝炎, 遅発性肝不全の 4 例. 第 44 回日本腹部救急医学会総会 (2008 年 3 月 14-15 日) 松山
- (4) 瀬戸山仁, 井戸章雄, 沼田政嗣, 山路尚久, 森内昭博, 藤田浩, 宇都浩文, 桶谷真, 坪内博仁: 炎症性腸疾患における組換えヒト肝細胞増殖因子 (HGF) 注腸治療の検討. ポスター 第 49 回日本消化器病学会大会 (2007 年 10 月 18-21 日) 神戸
- (5) Moriuchi A, Oda K, Yamashita T, Furuzono M, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Fujisaki K, Tsubouchi H: A case of prolonged hepatitis E in Kagoshima. 6th JSH Single Topic Conference (2007 年 9

- 月 28-29 日) 安比市
- (6) Uto H, Ido A, Moriuchi A, Kumagai K, Shigenobu S, Hasegawa S, Oketani M, Nagoshi S, Mochida S, Tsubouchi H: Evaluation of a rapid semi-quantitative immunochromatographic assay for serum hepatocyte growth factor as a marker in acute hepatic failure: Results from prospective study. 6th JSH Single Topic Conference (2007 年 9 月 28-29 日) 安比市
- (7) Kodama M, Uto H, Numata M, Hori T, Murayawa T, Tsubouchi N, Sasaki F, Fujita H, Tahara Y, Ido A, Tsubouchi H: Double balloon endoscopic characterization in the small bowel of patients with portal hypertensive enteropathy. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease (AASLD) (2007 年 9 月 2-6 日) Boston
- (8) 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 (AASLD) (2007 年 9 月 2-6 日) Boston
- (9) Wang Y, Oketani M, Horiuchi M, Imamura Y, Moriuchi A, Hasegawa S, Uto H, Ido A, Tsubouchi H: Differential acetaminophen-induced hepatotoxicity between two types of dietary steatosis of the liver in mice. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease (AASLD) (2007 年 9 月 2-6 日) Boston
- (10) 安倍弘生, 蓮池悟, 黒木穰二, 楠元寿典, 児玉眞由美, 永田賢治, 高濱由香, 高見陽一郎, 井戸章雄, 宇都浩文, 坪内博仁: コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットの肝線維化に対してオステオアクチビン強発現が及ぼす影響の解析 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月 31 日) 東京
- (11) 森内昭博, 井戸章雄, 山路尚久, 瀬戸山仁, 重信秀峰, 小原一憲, 沼田政嗣, 長谷川将, 宇都浩文, 宇都浩文, 桶谷真, 坪内博仁: 網羅的遺伝子発現解析を用いた HGF の抗アポトーシス機構の解明. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月 31 日) 東京
- [図書] (計 5 件)
- (1) 坪内博仁, 井戸章雄: 肝細胞増殖因子 (HGF); 臨床検査ガイド 2009~2010. 192

- 193(2008) 和田 攻, 大久保昭行, 矢崎義雄, 大内尉義 (編集) 文光堂
- (2) 井戸章雄: 劇症肝炎. 肝疾患 レジデントマニュアル 第 2 版: 211-219(2008) 柴田実, 八橋 弘, 石川哲也 (監修) 医学書院
- (3) 井戸章雄, 坪内博仁: 劇症肝炎. 消化器疾患最新の治療: 286-290(2008) 菅野健太郎, 上西紀夫, 井廻道夫, 南江堂
- (4) 井戸章雄: 第二章 病態・病態生理 病態生理. 新しい診断と治療の ABC50/消化器 7 肝癌: 43-47(2007) 坪内博仁 (編集) 泉孝英, 上島国利, 祖父江 元, 垂井清一郎, 千葉勉, 千原和夫, 藤井潤, 正岡徹, 丸茂文昭, 宮坂信之 (監修) 最新医学社
- (5) 井戸章雄, 桶谷真, 坪内博仁: 劇症肝炎治療における血液浄化療法の有効性は?. 臨床に直結する肝・胆・膵疾患治療のエビデンス: 133-135(2007) 跡見裕, 上村直実, 白鳥敬子, 正木尚彦 (編集) 文光堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

桶谷 真 (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

森内 昭博 (MORIUCHI AKIHIRO)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
 助教
 研究者番号: 40359823

上村 修司 (KANMURA SHUJI)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
 医員
 研究者番号: 60448561

高見 陽一郎 (TAKAMI YOUICHIRO)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・
 特任研究員
 研究者番号: 10500473