

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19590792
 研究課題名（和文）肝線維化過程における骨髄由来細胞のコラーゲン合成ならびに分解能の包括的解析
 研究課題名（英文）Comprehensive Analysis of Production and Degradation of Collagen by Bone Marrow-Derived Cells During Hepatic Fibrogenesis
 研究代表者
 稲垣 豊（INAGAKI YUTAKA）
 東海大学・医学部・教授
 研究者番号： 80193548

研究成果の概要：肝炎ウイルス感染やアルコールの過剰摂取・肥満など、様々な原因で肝臓の線維化が引き起こされる際には、肝組織中にコラーゲンが過剰に蓄積する。組織におけるコラーゲンの含有量は合成系と分解系の適切なバランスの上に維持されているが、両者の調節機構は不明であった。そこで本研究では、コラーゲンとその分解酵素の両遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウスを作製して、肝線維化の進展過程における両遺伝子の発現動態を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：肝臓病学

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：肝線維症、コラーゲン、Matrix metalloproteinase

1. 研究開始当初の背景

コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの発現は、創傷治癒や組織の修復に必須であるが、その調節機構が破綻をきたすと組織にコラーゲンが過剰沈着し、肝をはじめとする諸臓器の線維症を引き起こす。とりわけ、わが国ではC型肝炎ウイルスの持続感染による肝硬変から肝臓への進展が大きな社会問題ともなっており、その予防と治療法を確立することは基礎的また臨床的に重要な研究課題であるのみならず、社会的にも急務と言える。

肝星細胞は、コラーゲンとその分解酵素 Matrix metalloproteinase (MMP)-13 双方の産生細胞と考えられているが、同細胞におけるコラーゲンと MMP-13 の産生調節機構は十分に解明されていない。また近年、骨髄から線維肝組織へ流入した細胞がコラーゲンを産生して線維化進展に関わるという報告がなされた一方で、骨髄由来細胞が MMP-13, MMP-9 を順次発現することで肝線維化の改善に寄与するという本研究自身の見解もあり、未だ一致した見解は得られていない。

2. 研究の目的

本研究は、コラーゲンプロモーターと緑色蛍光、MMP-13 プロモーターと赤色蛍光を連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス (Dual reporter mouse) を作製し、これを用いてコラーゲンと MMP-13 の産生を単一細胞レベルで高感度かつ特異的に検出して合成系と分解系を包括的に解析することで、骨髄細胞を線維肝組織へ動員し MMP-13 産生細胞へと効率よく分化誘導して、肝線維症の制御を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) Dual reporter mouse の作製

線維組織において増加するマトリックスの主要成分である I 型コラーゲンの $\alpha 2$ 鎖をコードする COL1A2 遺伝子プロモーターと Enhanced green fluorescence (EGFP, 緑色蛍光)、ならびに MMP-13 プロモーターと DsRed2 (赤色蛍光) を連結した融合遺伝子をマウス受精卵に顕微注入し、Dual reporter mouse を樹立した (図 1)。

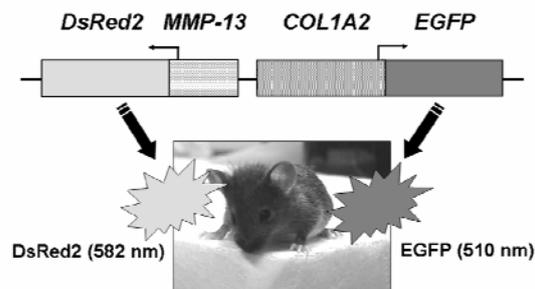


図 1. COL1A2/MMP-13 Dual reporter mouse

(2) 四塩化炭素肝障害・線維症の作製と共焦点レーザー顕微鏡観察

上記マウスに四塩化炭素を単回もしくは反復投与し、この際に見られる COL1A2 ならびに MMP-13 プロモーターの活性化を、それぞれ EGFP および DsRed2 蛍光の共焦点レーザー顕微鏡観察により検討した。

(3) 星細胞の分離・培養と FACS 解析

Dual reporter mouse の肝臓から星細胞を分離して、同細胞における COL1A2 ならびに MMP-13 プロモーターの活性化を、EGFP あるいは DsRed2 蛍光の FACS により解析した。また、分離した星細胞を初代培養に供し、COL1A2 あるいは MMP-13 プロモーターの活性化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に観察した。

(4) 骨髄細胞の線維肝組織への生着

致死照射を行った同系マウスに Dual reporter mouse から得た骨髄細胞を注入し、

全骨髄を EGFP/DeRed2 細胞で置換した。このレシピエントマウスに四塩化炭素を反復投与して肝線維症を作製し、この際に肝内に流入・生着した骨髄由来細胞の EGFP もしくは DsRed2 発現を、共焦点レーザー顕微鏡観察により解析した。

4. 研究成果

(1) 四塩化炭素投与による COL1A2 もしくは MMP-13 プロモーターの活性化

Dual reporter mouse に四塩化炭素を単回投与して 72 時間後に肝組織を観察すると、中心静脈周囲の壊死部に COL1A2 プロモーターが活性化した EGFP 発現細胞を多数認めた (図 2) が、MMP-13 プロモーターが活性化した DsRed2 陽性細胞は認められず、コラーゲンの代謝バランスが合成優位に傾いていることが示された。

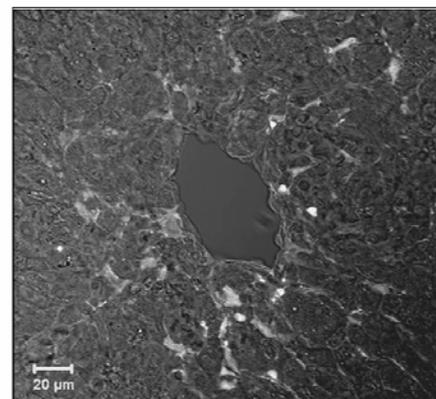


図 2. 四塩化炭素単回投与後の COL1A2 プロモーターの活性化

また、四塩化炭素を投与したマウスから星細胞分画を採取して FACS 解析を行うと、全星細胞の約 30% が EGFP 陽性を示したが、DsRed2 発現細胞は認められず、上記の共焦点顕微鏡観察結果と合致した所見が得られた (図 3)。

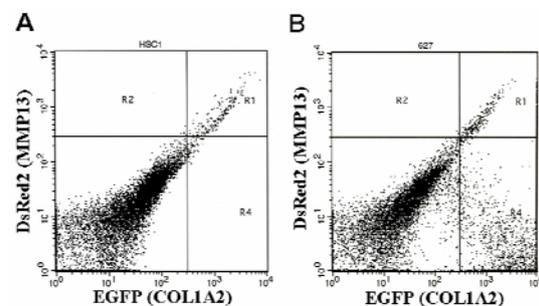


図 3. 野生型 (A) ならびに Dual reporter mouse (B) 由来星細胞における四塩化炭素単回投与後の COL1A2 (EGFP) ならびに MMP-13 (DsRed2) の活性化

(2) 星細胞の培養過程におけるCOL1A2もしくはMMP-13プロモーターの活性化

Dual reporter mouseの正常肝から分離した星細胞を培養すると、培養2日目の静止期にはDsRed2の発現が見られ、MMP-13プロモーターの活性化が示された(図4A)。一方、培養後1週間を経過した活性化星細胞ではDsRed2蛍光は消失し、替わってEGFPの発現が増強した(図4B)。このことから、星細胞の培養に伴う活性化過程において、MMP-13プロモーターからCOL1A2プロモーターへのシグナル転換が示された。

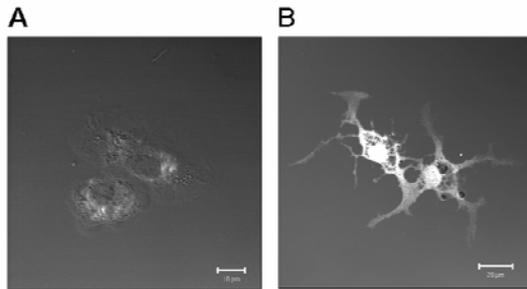


図4. 初代培養に伴う静止型星細胞(A)におけるMMP-13/DsRed2発現から活性型星細胞(B)におけるCOL1A2/EGFP発現へのシグナル転換

(3) 骨髄由来細胞のコラーゲン産生能

Dual reporter mouseに四塩化炭素を反復投与して肝線維症を作製すると、門脈域や線維束に沿って多数のEGFP陽性細胞が認められた。また、これらとは一致しない少数の細胞に、DsRed2の発現が確認された。一方、EGFP/DeRed2細胞で全骨髄を置換したレシピエントマウスに四塩化炭素を反復投与して肝線維症を作製しても、肝組織中にEGFP陽性細胞は認められず、骨髄由来細胞によるコラーゲン産生は否定的と考えられた。

(4) 本研究成果の意義と今後の展望

コラーゲン分解の調節機構の研究は、コラーゲンの発現調節研究に比して著しく立ち遅れている。しかも、合成系と分解系を同時に解析した研究はほとんど見られない。本研究により、in vivoの肝線維化過程ならびにin vitroの星細胞の活性化過程のいずれにおいても、I型コラーゲンプロモーターとMMP-13プロモーターの活性化細胞は一致せず、両者の発現には相反的な調節機構がはたしていることが示唆された。また、今回の実験条件下では骨髄由来細胞によるコラーゲン産生は否定的であったが、骨髄は多分化能を備えた多彩な細胞集団からなり、コラーゲン産生細胞とMMP産生細胞とが共存していてもなら不思議はない。本Dual reporter mouse

を用いて、骨髄細胞をMMP-13産生細胞へと効率よく分化誘導するサイトカイン・増殖因子の同定や低分子化合物等の開発がなされれば、難治性の臓器線維症に対する新規治療法の開発に繋がるのが期待される。

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9件)

- 1) Inagaki Y, Higashi K, Higashiyama R, 他10名(1番目): Hepatocyte growth factor suppresses profibrogenic signal transduction via nuclear export of Smad3 with galectin-7. *Gastroenterology* 134: 1180-1190, 2008 査読あり
- 2) Moro T, Higashiyama R, Inagaki Y, 他7名(最後): Glycyrrhizin and its metabolite inhibit Smad3-mediated type I collagen gene transcription and suppress experimental murine liver fibrosis. *Life Sciences* 83: 531-539, 2008 査読あり
- 3) 稲垣 豊, 東山礼一: 肝線維化機序の解明で今何が問題になっているのか. *肝胆臓* 57: 187-192, 2008 査読なし
- 4) Inagaki Y, Okazaki I: Emerging insights into transforming growth factor- β Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56: 284-292, 2007 査読あり
- 5) Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, 他8名(2番目): Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45: 213-222, 2007 査読あり
- 6) Inagaki Y, Higashiyama R, Watanabe T, 他1名(1番目): Bone marrow cells in the liver: diverse cells, diverse effects. *Hepatology* 46: 604-606, 2007 査読あり
- 7) Inagaki Y, Higashiyama R, Okazaki I(1番目): Treatment Strategy for liver fibrosis through recruitment and differentiation of bone marrow stem/progenitor cells. *Hepatol Res* 37: 991-993, 2007
- 8) Kinoshita K, Iimuro Y, Inagaki Y, 他8名(4番目): Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre-LoxP system to antagonise hepatic fibrosis. *Gut* 56: 396-404, 2007 査読

あり

- 9) Kinoshita K, Iimuro Y, Inagaki Y, 他 6 名 (5 番目): Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. Gut 56: 706-714, 2007 査読あり

[学会発表] (計 16 件)

- 1) 東山礼一、他: 骨髄細胞由来Matrix metalloproteinases (MMPs) による肝線維化改善機序の解明. 第 22 回肝類洞壁細胞研究会、ワークショップ 2 「肝再生と肝類洞壁細胞」、2008 年 11 月 29 日、久留米
- 2) Inagaki Y, et al: Little contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008. 11. 3, San Francisco, CA
- 3) Higashiyama R, et al: Matrix metalloproteinases enhance migration of bone marrow-derived cells and contribute to the regression of experimental liver fibrosis. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2008. 11. 3, San Francisco, CA
- 4) 稲垣 豊: 線維化治療と再生医学との接点. 第 32 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「NASHへの挑戦—創薬の可能性を探る—」、2008 年 10 月 7 日、東京
- 5) 稲垣 豊: 臓器線維症の病態と治療戦略. 第 49 回日本組織細胞化学会総会学術集会、シンポジウム (2) 「線維化機構の分子形態的解析」2008 年 10 月 5 日、長崎
- 6) 根本 朋幸、他: マウス非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルにおける分枝鎖アミノ酸 (BCAA) の有用性の検討. 第 50 回日本消化器病学会大会、2008 年 10 月 2 日、東京
- 7) 稲垣 豊、他: 骨髄由来細胞は肝線維化の進展に関与するか. 第 44 回日本肝臓学会総会、2008 年 6 月 6 日、松山
- 8) 東山礼一、他: 骨髄由来細胞の動員と Matrix metalloproteinases (MMPs) 発現による肝線維化改善機序の解明. 第 44 回日本肝臓学会総会、ワークショップ (8) 「肝障害と修復に関する研究の展開」、2008 年 6 月 6 日、松山
- 9) 東山礼一、他: 皮膚創傷治癒ならびに線維化過程における骨髄由来細胞のコラーゲン合成への関与. 第 40 回日本結合組織学会

学術大会・第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008 年 5 月 30 日、東京

- 10) 茂呂 忠、他: マウス部分胆管結紮モデルの確立と抗線維化薬の薬効評価への応用. 第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2008 年 5 月 29 日、東京
- 11) 稲垣 豊、他: 骨髄由来細胞は肝線維化の進展に関与するか. 第 21 回肝類洞壁細胞研究会、2007 年 12 月 22 日、松山
- 12) Inagaki Y, et al: Hepatocyte growth factor suppresses collagen gene transcription via nuclear export of Smad3 with galectin-7. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2007. 11. 5, Boston, MA
- 13) 稲垣 豊、他: Transgenic dual reporter mouseを用いたコラーゲン合成と分解の包括的解析. 第 43 回日本肝臓学会総会、ワークショップ (11) 「肝線維化研究の進歩」、2007 年 6 月 1 日、東京
- 14) 茂呂 忠、他: Transgenic dual reporter マウスを用いたコラーゲン合成系および分解系の包括的解析. 第 39 回日本結合組織学会学術大会・第 54 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2007 年 5 月 11 日、東京
- 15) 東山礼一、他: ブレオマイシン誘導皮膚硬化症における骨髄由来細胞の関与. 第 39 回日本結合組織学会学術大会・第 54 回マトリックス研究会大会合同学術集会、2007 年 5 月 11 日、東京
- 16) 稲垣 豊、他: 臓器線維症の進展ならびに改善における骨髄と末梢の臓器相関. 第 39 回日本結合組織学会学術大会・第 54 回マトリックス研究会大会合同学術集会、シンポジウム (2) 「結合組織疾患における最近のトピックス」、2007 年 5 月 10 日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI YUTAKA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 80193548

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

東山 礼一 (HIGASHIYAMA REIICHI)

東海大学・医学部・奨励研究員

研究者番号: 80459495