

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03130

研究課題名(和文)体性幹細胞を起点とした難治性線維化に関する「上皮-間葉」転換の病理学的基盤研究

研究課題名(英文)Basic study on epithelial-mesenchymal transition leading to intractable fibrosis based on the somatic stem cells

研究代表者

山手 丈至(Yamate, Jyoji)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科・客員研究員

研究者番号：50150115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗体A3は上皮性と間葉性の双方に分化するラットの体性幹細胞を認識した。A3に加え多様な抗体を用い、ラットに線維化病変を作出し、体性幹細胞を起点とし筋線維芽細胞の特性を追究した。筋線維芽細胞は、未分化間葉系細胞や血管周皮細胞に加え、肝では肝星細胞が、膵では膵星細胞が、皮膚では毛根結合鞘細胞が部位特異的な筋線維芽細胞の起源であった。腎では傷害尿管の「上皮-間葉転換」が筋線維芽細胞の形成に係っていた。筋線維芽細胞の前駆細胞の一部は幹細胞系列に存在すると考えられた。筋線維芽細胞の形成に係るマクロファージは「DAMPs-オートファジー」との関連で誘導された。この研究は幹細胞病理学の構築に資する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維化は組織傷害後の修復機転である。線維化には膠原線維を産生する筋線維芽細胞に係る。筋線維芽細胞の特性と起源について体性幹細胞を起点に臓器横断的に追究した。特に、腎線維化では、傷害尿管の遡及現象としての異常分化である上皮-間葉転換を介し筋線維芽細胞が形成される。また、ラットの体性幹細胞を認識する新たな抗体を作製し、その認識細胞の特性・分布を解析することで筋線維芽細胞の起源に新たな知見を加えた。また筋線維芽細胞の形成に係るマクロファージの誘導因子を障害関連分子パターン(DAMPs)とオートファジーとの係わりで検討した。この研究は「幹細胞病理学」の新たな構築と難治性線維化の治療法の探索に資する。

研究成果の概要(英文)：A novel antibody A3 recognized somatic stem cells capable of differentiating into both epithelial and mesenchymal cells. Using various antibodies in addition to A3, fibrotic lesions were induced in various organs of rats, and the characteristics of myofibroblasts were investigated based on the somatic stem cells. Along with undifferentiated mesenchymal cells and pericytes, myofibroblasts were generated from hepatic stellate cells, pancreatic stellate cells, and hair follicle connective tissue sheath cells as the organ-specific original cells. Epithelial-mesenchymal transition in injured renal tubules was involved in myofibroblast formation. These myofibroblast progenitors may be partly in the stem cell lineage. Macrophages involved in myofibroblast formation were induced in relationship to DAMPs and autophagy. This study contributes to the development of "stem cell pathology".

研究分野：獣医病理学

キーワード：線維化 筋線維芽細胞 臓器横断的 上皮 間葉転換 体性幹細胞 幹細胞認識抗体 ラット

1. 研究開始当初の背景

線維化とは、組織傷害後に生じる合目的な修復機転であるが、進行性に繰り返し生じると肝硬変や萎縮腎など難治性の病態となる。線維化は「組織傷害⇒マクロファージの反応及び線維原性因子の放出⇒筋線維芽細胞の誘導と細胞外基質の蓄積⇒線維化病変の形成」の一連の過程がある。この過程において筋線維芽細胞の役割は重要である。筋線維芽細胞は、既存の線維芽細胞に加え、生体の体性幹細胞から誘導されると考えている。また、特に、腎線維化においては、再生尿細管上皮が筋線維芽細胞に転換（上皮-間葉転換：EMT）し、線維化の増悪に係るとされる。この EMT には、上皮系と間葉系の双方に分化し得る体性幹細胞が関与する可能性がある。骨髄には多分化能のある体性幹細胞が、また各組織には組織固有の体性幹細胞が存在する。さらに、体性幹細胞は血中を介し傷害部位に移動し、組織の修復に係ると考えられている。体性幹細胞と筋線維芽細胞との係わり、そしてそれら細胞の特性と役割については解明すべき点が多い。線維化に出現する筋線維芽細胞の特性と起源の追究は、体性幹細胞を起点とした線維化のメカニズムの解明につながり、新たな幹細胞病理学の構築と、その治療法の探索に資すると考える。

2. 研究の目的

生体における組織傷害後の合目的な修復機転である線維化には筋線維芽細胞に分化し得る体性幹細胞が関与していると考えている。本研究の目的は、肝、腎、皮膚、腓、心筋、肺、そして結腸などの多様な臓器にラットを用いて線維化病変を実験的に作出し、臓器間で生じる線維化病変への体性幹細胞の関与と、それを誘導するマクロファージとの関連を追究することにある。また、新たに開発したラット体性幹細胞を認識する抗体 A3 が標識する抗原の特性や、生体における A3 認識細胞の分布を、線維化との関連で明らかにする。さらに、傷害された上皮系細胞が間葉系細胞、特に膠原線維を産生する筋線維芽細胞に EMT を介して形成され、線維化の増悪に係るとされることから、EMT と体性幹細胞との関連も追及する。体性幹細胞を起点とした線維化の病態解明は、ユニークな生命現象を追究することに繋がることから、学術的には「幹細胞病理学」の構築と、肝硬変や萎縮腎などの難治性線維化の治療法の探索に寄与する基盤研究になると考える。

3. 研究の方法

3-1. ラットの体性幹細胞を認識する新たな抗体 A3 の特性解明；ラットの胎児から成体までの組織（特に骨髄、皮膚や毛包に注目）を用いて A3 標識細胞の分布を解析する。また、実験的に作製した線維化病変に A3 抗体を適応することで、線維化における体性幹細胞の動態を観察する。特に、体性幹細胞には、骨髄幹細胞や血管周皮細胞が含まれることから、これら細胞の動態に注目し、A3 抗体に加え、幹細胞マーカーである CD90 (Thy-1)、ネスチン、CD34、CD105 に対する抗体も適応することで、線維化における体性幹細胞の出現と役割を追究する。

3-2. 線維化の臓器横断的病態解析；

3-2-1. 線維化に関与する筋線維芽細胞の特性解析；ラットの線維化モデルとして、チオアセトアミド (TAA) 誘発肝線維化と肝硬変、シスプラチン誘発腎線維化、ジブチルスズ誘発腓線維化、デキストラン硫酸ナトリウム誘発結腸潰瘍と線維化、そしてブレオマイシン誘発皮膚硬化症と肺線維化、加えて皮膚ではパンチ損傷による創傷治癒過程での皮膚線維化を研究対象とする。これら線維化病変に出現する筋線維芽細胞をビメンチン、デスミン、 α -平滑筋アクチン (α -SMA) などの基本的な細胞骨格に対する抗体を用い臓器横断的に比較解析する。また、肝線維化と腓線維化では、グリア線維性酸性タンパク (GFAP) を発現するそれぞれ肝星細胞と腓星細胞との関連をも追究する。

3-2-2. 腎線維化における尿細管上皮の EMT を介した筋線維芽細胞の形成機序の解析；不完全再生の尿細管から EMT を介し筋線維芽細胞が形成されると考えている。尿細管上皮に発現する上皮性マーカーであるカドヘリンの発現や、Wnt/ β カテニンシグナルの状態を免疫組織化学的に解析する。尿細管の不完全再生は細胞周期の異常と関連することから細胞周期関連遺伝子や細胞増殖活性、そしてアポトーシスの状態についても検討する。

3-3. 線維化に関与するマクロファージの出現メカニズムの解明；マクロファージから産生される線維原性因子、特に TGF- β 1 が筋線維芽細胞の誘導に係るとされる。それ故に、マクロファージが誘導されるメカニズムは、線維化の病態解明において重要となる。マクロファージの誘導には、傷害細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (DAMPs) が影響を与えるとされ、その DAMPs の放出は細胞内のオートファジーの機能により調節されている。そこで、肝と腎線維化モデルを用いて、線維化に係るマクロファージの誘導機序をこれら因子との関連で追究する。

3-4. 線維化の軽減実験；線維化は「組織傷害⇒マクロファージの反応及び線維原性因子の放出⇒筋線維芽細胞の誘導と細胞外基質の蓄積⇒線維化病変の進展」の一連の過程により生じることから、肝と腎線維化モデルを用いて、これら一連の流れ、特にマクロファージや筋線維芽細胞の機能に影響を与える薬剤を投与することで、線維化の軽減法を探索する。

4. 研究成果

4-1. ラット体性幹細胞認識抗体 A3 の特性解明とその有用性；A3 は、ラットの多分化能を有する間葉系幹細胞に由来する悪性線維性組織球腫から樹立したクローン細胞株を抗原として作製された新規モノクローナル抗体である。

4-1-1. A3 抗原の分子生物学的特性；A3 が認識するエピトープは細胞膜上に位置しており、SDS-PAGE で 75-100 kDa のバンドとして検出され、そのバンドは糖を染める PAS 染色に対し陽性を示した。さらに、N 型糖鎖を特異的に消化する glycopeptidase F の処理でバンドが消失し、N 型糖鎖修飾阻害物質である tunicamycin を添加した培養 MT-9 細胞株で A3 抗原の発現が減弱した。A3 のエピトープには N 型糖鎖が含まれていることが示された。

4-1-2. A3 標識細胞の生体分布；A3 は、ラット胎児発生過程の内臓器の未分化間葉系細胞を標識し、成体では、骨髄において未分化間葉系細胞マーカーである CD90 や CD105 を発現する細胞と A3 標識細胞がほぼ一致していた。加えて、A3 は多分化能があるとされる各組織の血管周皮細胞を標識した。

4-1-3. 毛包における A3 標識細胞の動態；A3 は、発生過程の毛包において、毛芽周囲の未分化間葉系細胞に加え、基底細胞の一部 (supra-basal cells) を標識した。成体の毛包では、上皮性毛包ではバルジ領域から漏斗部の細胞を標識しており、その標識細胞は CK15、Lgr6 や CK19 で認識される未分化な上皮性細胞と関連して存在していた。一方、毛包周囲では、CD90、CD34 やネスチンで標識される毛包結合織鞘の未分化間葉系幹細胞と局在がほぼ一致することが分かった。毛周期における A3 標識細胞は、休止期ではバルジに接する峽部と漏斗部の一部の上皮性細胞に限られていたが、続く成長期ではその標識された上皮性細胞の範囲が拡大し、その後退行期では減退した。間葉性毛包においては、休止期では、A3 のシグナルは観察されなかったが、成長期では毛根周囲の結合織鞘と毛乳頭に至る広範囲の未分化な間葉系細胞を標識しており、退行期ではその標識細胞の範囲が減退した。すなわち、A3 は、毛包の組織発生に関与する上皮性と間葉性の双方の未分化な細胞を標識しており、その出現は毛周期に依存して変化することが分かった。

4-1-4. 皮膚再生における A3 標識細胞の動態；創傷後の皮膚再生において、A3 は、創床周囲の成長期の毛包のバルジ領域を中心とした外根鞘とその上方の漏斗部の未分化な上皮性細胞を標識した。さらに、標識された上皮性細胞は、創床部の被覆上皮へと連続していた。すなわち、A3 が標識する成長期の未分化な毛包上皮が表皮再生に係る可能性が示された。また、その創床周囲の成長期の毛包では結合織鞘の未分化な間葉系細胞が A3 により標識され、その標識細胞は増殖相の肉芽組織の形成に伴い拡大した。この毛包結合織鞘の未分化な間葉系細胞は後述する筋線維芽細胞に分化する前駆細胞の一つと考えられた。

4-1-5. 結腸の発生と潰瘍病変における A3 標識細胞の分布；発生過程の結腸では、A3 は粘膜下組織の RECA-1 を発現する未熟な血管内皮細胞を標識していた。成体の結腸では、A3 標識細胞は、陰窩周囲に特異的に局在し、その細胞は CD90 を共発現し、一部は上皮性マーカーである CK19 を発現することが分かった。一方で、陰窩周囲の A3 標識細胞は、 α -SMA を発現する既存の筋線維芽細胞とは一致せず、異なる細胞であった。A3 は、陰窩周囲において幹細胞ニッチを構成する新たな未分化な細胞を標識する可能性が示された。

結腸潰瘍病変において、陰窩周囲に局在していた A3 標識細胞は、傷害により消失したが、その後再生しつつある陰窩周囲に再局在した。また、粘膜再生に伴い A3 標識細胞が被蓋部に集簇し、その A3 標識細胞は CD90 と CK19 を共発現していた。粘膜再生に係る A3 標識細胞は、未熟な間葉性と上皮性の双方の性質を有し、上皮化 (再生) の足場として機能するレスキュー細胞と考えられた。

4-1-6. A3 抗体標識細胞の特性 (まとめ)；A3 抗体は、基本的には、骨髄の未分化な間葉系細胞に加え、血管周皮・血管内皮細胞、そして毛包周囲の結合織鞘細胞などの未分化な状態の間葉系体性幹細胞を標識することが分かった。また、A3 認識抗原は、結腸の陰窩再生や粘膜上皮化でのレスキュー細胞にみられるように、幹細胞ニッチを構成する上皮性と間葉性の双方の特徴を有する細胞に発現していた。A3 は、ラットの間葉性と上皮性の双方に分化し得る体性幹細胞を標識する新たな抗体であることが示された。

4-2. 筋線維芽細胞の起源と臓器横断的な特性解析；

4-2-1. 肝線維化に出現する筋線維芽細胞の特性；TAA 誘発肝線維化病変に出現する筋線維芽細胞は、従来から報告されているようにビメンチン、デスミン、 α -SMA などの細胞骨格を種々の割合で発現した。また、肝星細胞が有する細胞骨格である GFAP を共発現する筋線維芽細胞が存在することが分かった。加えて、GFAP 発現の筋線維芽細胞には、ネスチンや A3 抗原を共発現する細胞が混在していた。また、ガラクトサミンによる肝線維化病変について解析を加えた。ガラクトサミン誘発肝病変は、単細胞壊死・凝固壊死から成る肝小葉内の多巣性病変として現れ、同時に修復性線維化が生じていた。この病変は、小葉中心性の肝線維化が特徴である TAA 病変とは異なっているが、TAA 肝線維化と同様に、ガラクトサミン誘発肝線維化においても出現する筋線維芽細胞は、ビメンチン、デスミン、 α -SMA を発現し、これら細胞の一部には GFAP 発現が見られ、加えてネスチン、A3 や CD90 を発現する細胞が混在していた。次に、TAA を反復投与することで、上記の修復性肝線維化とは異なる、慢性的に進行する線維化病変である肝硬変モデルを作製した。肝硬変においては、偽小葉を形成する線維性架橋に、ビメンチン、デスミンや α -SMA、そして GFAP、加えて

CD90 を発現する筋線維芽細胞が観察された。以上より、修復性線維化や肝硬変などの肝線維化病変において出現する筋線維芽細胞は、GFAP と体性幹細胞マーカーであるネスチン、A3 あるいは CD90 を共発現する未分化な肝星細胞に由来する可能性が示された。なお、線維化に関連し TGF- β 1、PDGF- β 、Mmp2、Timp2 などの線維化関連因子が上昇することが確認された。また、筋線維芽細胞は、線維化の進行に伴い増殖活性を示す一方で、アポトーシスで消退することで癒痕を形成することも分かった。

肝硬変では、肝細胞と胆管上皮の双方に分化し得る肝前駆細胞 (oval 細胞) の異常な増殖がみられるが、この肝前駆細胞は、主に線維性架橋に出現し、GFAP と CK19 (胆管上皮マーカー) を共発現することが分かった。肝前駆細胞から生じる異常な胆管 (偽胆管) は上皮-間葉転換 (EMT) を介して筋線維芽細胞を誘導するとされるが、偽胆管上皮には α -SMA の発現はみられなかった。しかし、肝星細胞と肝前駆細胞は GFAP を発現する共通点があることから、偽胆管において EMT 現象が生じている可能性は否定できない。これは今後の検討課題である。なお、この肝前駆細胞には、肝癌細胞マーカーである AFP や β カテニンの発現がみられ、さらに、架橋部位においては肝発癌に関わる Wnt2、Wnt4 やグリピカン-3 の mRNA 発現の増加があった。肝硬変で生じる未分化な GFAP 発現肝前駆細胞は、肝硬変の終末病態として生じる肝発癌にも関わる可能性が示された。

4-2-2. 腎線維化における筋線維芽細胞の起源；腎線維化では、M2 マクロファージが産生する線維原性因子である TGF- β 1 の増加に伴い、ビメンチン、デスミンや α -SMA などの細胞骨格を種々の割合で発現する筋線維芽細胞が出現し、線維化が進行した。

(1) CD90 発現の腎髄質間質細胞と血管周皮細胞由来の筋線維芽細胞；腎線維化において、ビメンチンやデスミン発現の筋線維芽細胞の多くは CD90 を発現していたが、一方、 α -SMA 発現の筋線維芽細胞には CD90 の発現は軽度であった。CD90 を発現する血管周皮細胞の特徴がある未分化間葉系細胞株 MT-9 (A3 抗原も発現する細胞) に TGF- β 1 を添加したところ、CD90 の発現が低下し、逆に α -SMA の発現が増加した。ラットの腎間質細胞株 NRK-49F に TGF- β 1 を添加したところ α -SMA の発現が増加した。成体のラットでは、CD90 は、髄質間質細胞と血管周皮細胞 (A3 抗原も発現する細胞) に発現している。腎発生過程の後腎芽体細胞は CD90 や A3 を発現しており、よって、この髄質間質細胞は、血管周皮細胞と同様に未分化な体性幹細胞の特徴があると考えている。要するに、腎線維化に出現する筋線維芽細胞は、体性幹細胞の特徴がある髄質間質細胞や血管周皮細胞に由来すると考えられた。なお、腎線維化では TGF- β 1 以外に、オステオポンチンや骨形成タンパク質 (BMP) である BMP-6 も、体性幹細胞から筋線維芽細胞を誘導する線維原性因子となることを明らかにした。

(2) 不完全な再生尿細管の上皮-間葉転換 (EMT) を介した腎線維化；ラットの尿細管上皮細胞株 (NRK-52E) に TGF- β 1 を添加すると、上皮細胞の特性である E-カドヘリンの発現が減じ、代わって α -SMA を発現する筋線維芽細胞へと形質転換することが報告されている。実際、シスプラチン誘発腎線維化病変において、傷害後に再生しつつある尿細管に α -SMA の発現が認められた。傷害された尿細管の上皮は、壊死やアポトーシスに陥り脱落し、その後再生が始まる。順調な再生過程にある尿細管上皮には増殖活性があり、加えて上皮細胞の増殖・分化を規定する Wnt シグナルを介した細胞内伝達に関与する β -カテニンの発現が観察された。一方、増殖活性に乏しく β -カテニンが発現していない尿細管では E-カドヘリンの発現が低下し、代わって α -SMA の発現がみられた。尿細管の再生能は、基底膜の破壊の程度に依存するとされる。EMT は基底膜が破壊された G0/G1 アレストの状態にある不完全な再生状態にある尿細管に生じていると考えられた。後腎芽体細胞は、CD90 や A3 を発現する体性幹細胞の特徴に加え、ビメンチンや α -SMA を発現する筋線維芽細胞の特性も兼ね備えている。一方、この後腎芽体細胞は腎発生において間葉-上皮転換 (MET) を経て尿細管へと分化・成熟する。転じて考えると、腎線維化における不完全再生の尿細管の EMT は、後腎芽体細胞への遡及現象と捉えることができる。なお、シスプラチン誘発腎線維化では、シクロオキシゲナーゼ (特に COX-1) の発現増加により誘導される PGE₂ が EP4 レセプターを介して傷害された尿細管上皮のアポトーシスや EMT を抑制することで、尿細管に良好な再生を促すことを明らかにしている。

4-2-3. 皮膚線維化/皮膚硬化症における筋線維芽細胞の特性；皮膚線維化において、筋線維芽細胞は、真皮に存在する線維芽細胞に加え、CD90 や A3 抗原を発現する血管周皮細胞や毛根結合織鞘細胞などの間葉系体性幹細胞からも生ずると考えられた。より進行した皮膚硬化症では、血管周皮細胞と毛根結合織鞘細胞に CD90 や A3 抗原の強い発現があった。それら細胞の一部には α -SMA の共発現がみられ、筋線維芽細胞への形質転換が窺えた。皮膚硬化症では、体性幹細胞から筋線維芽細胞がより強力に誘導され、難治性となることが示唆された。なお、肉芽組織における新生血管の内皮細胞が A3 に陽性となり、同時に PDGFR- β 陽性の血管周皮細胞に A3 や CD90 が共発現していたことから、血管内皮には未分化な幹細胞の特性があり、その細胞が血管周皮細胞へと転じ、その後筋線維芽細胞に形質転換する可能性が示された。これは新生血管における血管内皮-間葉転換 (EnMT) 現象と考えられた。

4-2-4. 膈、心筋、結腸と肺の線維化における筋線維芽細胞の特性；

(1) 膈線維化；膈線維化部に出現する筋線維芽細胞は、ビメンチン、デスミン、 α -SMA を発現しており、同時に CD90 を発現する細胞もみられた。また、その中に GFAP 発現細胞が

混在していた。腓線維化での筋線維芽細胞は、未分化な GFAP 発現の腓星細胞から形成されることが示唆された。

(2) イソプロテレノール誘発心筋線維化；心筋凝固壊死部位に出現する筋線維芽細胞はビメンチンや α -SMA を発現し、CD90 を発現する細胞も混在していた。さらに、新生血管構成細胞に A3 発現がみられた。心筋線維化での筋線維芽細胞は、CD90 を発現する未分化間葉系細胞、A3 発現の血管周皮細胞や EnMT を介して形成される可能性が考えられた。

(3) デキストラン硫酸ナトリウム誘発結腸線維化；潰瘍部位に形成された線維化病変に出現する筋線維芽細胞は、ビメンチンと α -SMA を発現し、CD90 を発現する細胞も混在していた。また新生血管構成細胞に A3 発現が観察された。結腸線維化においても CD90 を発現する未分化間葉系細胞、そして A3 発現の血管周皮細胞や EnMT を介して筋線維芽細胞が形成される可能性が示された。

(4) ブレオマイシン誘発肺線維化；肺線維化部位の血管内皮と間葉系細胞に A3 抗原が発現していた。また、CD34 発現細胞も時に観察された。肺の線維化には未分化な間葉系細胞が関与することが示唆された。なお、肺線維化部位での A3 発現の血管内皮は EnMT を示唆する所見かもしれない。

4-2-5. 線維化に係る筋線維芽細胞の臓器横断的な比較解析(まとめ)；肝、腎、皮膚、腓、心筋、肺に生じる線維化病変に出現する筋線維芽細胞はビメンチンと α -SMA を発現し、デスミン発現は肝、腎、腓の線維化でみられた。筋線維芽細胞は種々の細胞骨格を現すことが分かった。また肝と腓の線維化においては、GFAP を発現する未分化な状態の肝星細胞や腓星細胞がそれぞれ筋線維芽細胞に分化することが、加えて腎、皮膚、心筋、肺や結腸の線維化では間葉系の体性幹細胞の特性を有する新生血管の血管周皮細胞や、その内皮細胞による EnMT を介して筋線維芽細胞が形成される可能性が示された。また、皮膚線維化では、毛根結合繊維鞘の体性幹細胞から、腎線維化では、CD90 発現の髄質間質細胞や不完全な再生尿細管上皮による EMT を介して筋線維芽細胞が形成されることが示された。Muse (multilineage differentiating stress enduring cells) 細胞は体性幹細胞の特徴があるとされ、iPS 細胞と同様に多分化能を示すことで、傷害組織の再生に係るとされる。各臓器の線維化に出現する筋線維芽細胞は幹細胞系列に起源があり、Muse 細胞と同様の特性があるのかもしれない。

4-3. 線維化の進行に係る炎症細胞、特にマクロファージの誘導因子の解明；

4-3-1. 肝線維化における「DAMPs - オートファジー - マクロファージ」の関連性；低用量 LPS (肝機能に影響を与えない用量) を事前投与すると TAA 誘発肝病変が軽減されることが分かった。すなわち、低用量 LPS 投与では、LPS で刺激されたクッパー細胞が M2 マクロファージが有する抗炎症作用を現すことで、TAA 投与で肝細胞に生じた傷害因子である DAMPs (特に HMGB1) をオートファゴゾームが効果的に処理することで、TAA 誘発肝病変が軽減されたと考えられた。実際 TAA 誘発肝障害モデルに HMGB1 中和抗体を投与すると炎症反応が抑制された。肝線維化では「DAMPs - オートファジー - マクロファージ」の関連性に基づいて、筋線維芽細胞の形成と特性を解析する必要がある。

4-3-2. 腎障害における間質線維化に係るマクロファージとリンパ球の役割；シスプラチン誘発腎線維化において、細胞傷害性の CD68 発現 M1 マクロファージがまず出現し、遅れて抗炎症作用を有する CD163 発現 M2 マクロファージが反応する。加えて、MHC クラス II を発現するマクロファージが CD4 ヘルパー T リンパ球と細胞傷害性のある CD8T リンパ球を誘導することで腎線維化が増悪することが分かった。これには DAMPs の一つである細胞外基質の biglycan が係る可能性が示された。腎線維化における筋線維芽細胞の誘導にはマクロファージとリンパ球、そして DAMPs の相互の係わりが重要であることが分かった。

4-4. 線維化の軽減法の検討；筋線維芽細胞の起源の追究とともに線維化を軽減する方策を実験モデルを用いて検討した。

4-4-1. デキサメサゾンによる肝と腎の線維化の軽減効果；

(1) TAA 誘発肝線維化モデルを用いたデキサメサゾンの影響；抗炎症作用のあるデキサメサゾンを前処置し、その後 TAA を投与したところ肝線維化が軽減された。これは、細胞傷害性 M1 マクロファージの出現がデキサメサゾンにより抑制された結果と考えられた。

(2) シスプラチン誘発腎線維化モデルを用いたデキサメサゾンの影響；デキサメサゾンの処置によりマクロファージの出現と筋線維芽細胞の増加が抑制され、腎障害が軽減された。また、TGF- β 1 の存在下で筋線維芽細胞に分化する MT-9 細胞にデキサメサゾンを試験管内で添加すると、 α -SMA の発現が抑制された。デキサメサゾンは、マクロファージの出現抑制と筋線維芽細胞の形成抑制という 2 つの作用により腎線維化を軽減することが示された。

4-4-2. エナラプリル投与による腎線維化の軽減効果；アンジオテンシン変換酵素阻害剤であるエナラプリルをシスプラチン誘発腎線維化モデルに投与した。その結果、M1 マクロファージの浸潤が軽減し、初期の病態の進行が抑制されることが示された。

まとめ；病理総論に記述される「再生」「修復・線維化」「上皮-間葉転換 (EMT)」などの生命現象の一端を明らかにすることができた。この成果は、学術的には「幹細胞病理学」の新たな展開と応用に資することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 7件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Takami Y, Tanaka M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 60
2. 論文標題 The effect of lipopolysaccharide on liver homeostasis and diseases based on the mutual interaction of macrophages, autophagy, and damage-associated molecular patterns in male F344/DuCrIcrlj rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Vet Pathol	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03009858231173364.	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 Yamate J, Izawa T, Kuwamura M	4. 巻 36
2. 論文標題 Macrophage pathology in hepatotoxicity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 51-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1293/tox.2022-0112.	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 Pervin M, Karim MR, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 50
2. 論文標題 Possible cytoprotection of low dose lipopolysaccharide in rat thioacetamide-induced liver lesions, focusing on the analyses of hepatic macrophages and autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 353-365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/01926233221076758.	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 山手丈至	4. 巻 68
2. 論文標題 第2回 マクロファージ病理学；創傷治癒とマクロファージ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 11-18
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 山手丈至	4. 巻 68
2. 論文標題 第3回 マクロファージ病理学；マクロファージと肝毒性（その1）	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 21-28
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 山手丈至	4. 巻 68
2. 論文標題 第3回 マクロファージ病理学；マクロファージと肝毒性（その2）	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 37-45
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 山手丈至	4. 巻 68
2. 論文標題 第4回 マクロファージ病理学；マクロファージと腎線維化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 55-63
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 山手丈至	4. 巻 30
2. 論文標題 線維化の功と罪、そのメカニズムを探る	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験病理組織技術研究会誌	6. 最初と最後の頁 1-12
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 Matsuyama S, Pervin M, Nakagawa M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 83
2. 論文標題 Properties of macrophages and lymphocytes appearing in rat renal fibrosis followed by repeated injection of cisplatin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1435-1442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0341.	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 Nakagawa M, Karim MR, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 10
2. 論文標題 Immunophenotypical characterization of M1/M2 macrophages and lymphocytes in cisplatin-induced rat progressive renal fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020257.	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 Koga M, Karim MR, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 49
2. 論文標題 Appearance of heterogeneous macrophages during development of isoproterenol-induced rat myocardial fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 1048-1061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0192623320982526.	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 Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 83
2. 論文標題 Involvement of neutrophils in rat livers by low-dose thioacetamide administration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 390-396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0581.	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 山手丈至	4. 巻 67
2. 論文標題 第1回 マクロファージ病理学；マクロファージの基礎知識	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日生研たより	6. 最初と最後の頁 51-56
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 Tsuji Y, Kuramochi M, Golbar HM, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 21
2. 論文標題 Acetaminophen-induced rat hepatotoxicity based on M1/M2-macrophage polarization, in possible relation to damage-associated molecular patterns and autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 8998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21238998.	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 Hada N, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 33
2. 論文標題 Effects of dexamethasone on hepatic macrophages in normal livers and thioacetamide-induced acute liver lesions in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 237-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2020-0016.	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 Katou-Ichikawa C, Nishina H, Tanaka M, Takenaka S, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 21
2. 論文標題 Participation of somatic stem cells, labeled by a unique antibody (A3) recognizing both N-glycan and peptide, to hair follicle cycle and cutaneous wound healing in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21113806.	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 Nishina H, Katou-Ichikawa C, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 48
2. 論文標題 Participation of somatic stem cells, recognized by a unique A3 antibody, in mucosal epithelial regeneration in dextran sulfate sodium (DSS)-induced rat colonic lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 560-569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0192623320906817.	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 Hashimoto A, Karim MR, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 48
2. 論文標題 Characterization of macrophages and myofibroblasts appearing in dibutyltin dichloride-induced rat pancreatic fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 509-523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0192623319893310.	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 Koga M, Kuramochi M, Karim MR, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 81
2. 論文標題 Immunohistochemical characterization of myofibroblasts appearing in isoproterenol-induced rat myocardial fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.18-0599.	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 Nishina H, Katou-Ichikawa C, Kuramochi M, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J	4. 巻 32
2. 論文標題 The localization and distribution of cells labeled by a somatic stem cell-recognizing antibody (A3) in rat colon development; possible presence of a new cell type forming the intestinal stem cell niche	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Toxicol Pathol	6. 最初と最後の頁 37-48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2018-0037.	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9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山手丈至
2. 発表標題 毒性病理学の継承：その学術的意義と重要知見
3. 学会等名 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 稲井 洋平、井澤 武史、瓶井 知美、田中 美有、山手 丈至、桑村 充
2. 発表標題 AI画像解析による肝毒性所見の定量化と血清ALT、ASTとの相関解析
3. 学会等名 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山手丈至
2. 発表標題 線維化の功と罪、そのメカニズムを探る
3. 学会等名 実験病理組織技術研究会 第28回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 奨、井澤 武史、相川 諒、桑村 充、山手 丈至
2. 発表標題 鉄過剰による薬物性肝障害の修飾に関わるオートファジーの解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山手丈至
2. 発表標題 幹細胞病理学の展開と応用：体性幹細胞を基軸とした万能細胞由来腫瘍の組織発生と線維化関連筋線維芽細胞の特性の解明
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会 日本獣医学会越智賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山手丈至
2. 発表標題 マクロファージと線維化
3. 学会等名 第8回日本獣医病理学専門家協会学術集会 スライドセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉持 瑞樹, 井澤 武史, Rahman N, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 チオアセトアミド誘発ラット急性肝障害モデルの好中球・マクロファージ誘導における炎症誘導因子の役割の解明
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rahman N, Pervin M, 倉持 瑞樹, Karim M, 井澤 武史, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 Participation of heterogeneous macrophages related to M1/M2 types in D-galactosamine-induced acute rat liver injury
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高見 優生, 倉持 瑞樹, 井澤 武史, 桑村 充, 山手 丈至
2. 発表標題 「DAMPs-オートファジー-肝マクロファージ」の相互作用に基づいたLPSの肝機能への影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪公立大学 獣医学研究科 獣医病理学教室 http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/path/</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
研究分担者	桑村 充 (Kuamura Mitsuru) (20244668)	大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授 (24405)	
研究分担者	井澤 武史 (Izawa Takeshi) (20580369)	大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授 (24405)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------