

令和 4 年 5 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07458

研究課題名(和文)胆管細胞老化に着目した肝線維性多嚢胞性疾患の新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic approach for fibropolycystic liver disease focusing on cellular senescence of cholangiocytes

研究代表者

佐藤 保則 (Sato, Yasunori)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：30324073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Caroli病 + 先天性肝線維症とその動物モデルであるPCKラットの肝組織を用いた検討で、胆管細胞におけるNotch-Hes1を介した細胞内シグナル伝達の亢進が進行性の肝内胆管拡張に関与していることを明らかにした。PCKラットの培養胆管細胞にNotch阻害剤(FLI-06)を投与すると胆管細胞にアポトーシスが誘導され、過剰な細胞増殖が抑制された。FLI-06は胆管細胞に細胞老化を誘導することはなかったが、Notchシグナル伝達系はCaroli病 + 先天性肝線維症の新たな治療標的となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Caroli病は肝内胆管の進行性の拡張を来す先天性疾患で、多くの症例は先天性肝線維症を合併する。Caroli病 + 先天性肝線維症の患者予後を規定する臨床因子として、胆管拡張に起因する胆管炎と先天性肝線維症による門脈圧亢進症が重要であるが、現在の治療は対症療法が主体で重症例には肝移植が行われている。本研究は胆管細胞におけるNotchシグナル伝達系を阻害することで、Caroli病の胆管拡張を抑制しうることを示した。一連の研究成果は新たな治療法の開発に繋がる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that activation of the Notch-Hes1 signaling pathway was critically involved in biliary cystogenesis of Caroli disease with congenital hepatic fibrosis (CHF) as well as the polycystic kidney (PCK) rat, an animal model of Caroli disease with CHF. In vitro experiments using PCK cholangiocytes showed that administration of Notch inhibitor (FLI-06) significantly inhibited cell proliferative activity. The inhibition was accompanied by the induction of apoptosis, but not cellular senescence. These results indicate that inhibition of the Notch signaling represents a potential target of therapy for Caroli disease with congenital hepatic fibrosis.

研究分野：病理学

キーワード：人体病理学 肝臓 胆管細胞 肝線維嚢胞性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Caroli 病は肝内胆管の多発性、嚢状の拡張を来す先天性疾患で、多くの症例は進行性の肝線維化を示す先天性肝線維症 (congenital hepatic fibrosis, CHF) を合併する。Caroli 病/CHF の患者予後を規定する臨床因子として、肝内胆管拡張に起因する胆管炎と CHF による門脈圧亢進症が重要で、胆管炎に関連して約 10% の症例に合併する肝内胆管癌も重要な予後規定因子である。現状として Caroli 病/CHF の治療は対症療法が中心で、難治性胆管炎や高度の門脈圧亢進症を有する症例には肝移植が行われる。

(2) これまでに Caroli 病/CHF の胆管拡張、肝線維化の病態形成に関連したいくつかの機序が実験的に示されている。多くの研究は胆管細胞の過剰な増殖と分泌を抑制することで、胆管拡張を抑制することに主眼を置いている。胆管拡張とともに肝線維化を同時に抑制することを目的とした理論的かつ詳細な検討を行った研究はほとんどなく、実際の臨床応用に至った研究成果もない。

(3) 細胞老化は senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) の陽性化や p16 の発現亢進などにより特徴付けられ、p16 はサイクリン依存キナーゼ阻害により細胞周期を停止させる。一方で老化細胞は細胞外マトリックス分解酵素 (matrix metalloproteinase, MMP) などの液性因子を分泌する。これら液性因子は細胞老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) により、周囲の微小環境における線維化や炎症反応を制御する。SASP 因子である MMP には細胞外マトリックスを分解することで組織のリモデリングを促し、臓器の過剰な線維化を防止する働きがある。

(4) 細胞老化に関連するシグナル伝達系の一つとして Notch シグナルが知られている。一般に Notch シグナルが亢進した状態では細胞増殖と線維化は促進し、逆に Notch シグナルが阻害されると細胞老化の誘導と細胞増殖の抑制、SASP を介した線維化の抑制を生じる (文献)。現在まで、Caroli 病/CHF の胆管細胞増殖や肝線維化の病態形成における、Notch シグナル伝達系を介した細胞老化の観点からの検討は行われていない。

2. 研究の目的

(1) Notch シグナル伝達系に着目し、Caroli 病/CHF の胆管細胞に人為的に細胞老化と SASP を誘導することで、胆管拡張と肝線維化を同時に抑制し、Caroli 病/CHF に対する合理的かつ独創的な新規治療戦略を提示することを本研究の目的とした。

(2) これまでに報告された Caroli 病/CHF の胆管細胞の過剰増殖を抑制する薬剤の多くはアポトーシスを誘導するが、副作用の観点において細胞老化の誘導はアポトーシスによる直接的な細胞除去より望ましく、理想的な創薬に繋がることが期待される。

(3) Caroli 病/CHF の病態制御の目的で複数の薬剤を併用する試みも行われつつあるが、副作用の観点からは単剤の投与が望ましい。本研究では Notch シグナル伝達系を単剤で阻害することで、Caroli 病/CHF の病態を効率的に制御することを目指した。

3. 研究の方法

研究試料として、Caroli 病/CHF 患者のパラフィン包埋肝組織切片、および Caroli 病/CHF の病態を忠実に再現する動物モデルとして確立された polycystic kidney (PCK) ラットを使用した。

(1) ヒト肝組織切片を用いた検討：

Caroli 病/CHF、CHF (Caroli 病合併なし)、正常肝の肝組織切片を材料とした。Notch レセプター (Notch1-4)、Notch リガンド (Jagged1,2 および Delta-like (DLL) 1,3,4)、Notch エフェクター分子 (Hes1)、cyclin D1 に対する免疫染色を行い、結果を定量的または半定量的に評価した。ヒト材料を用いた研究は金沢大学倫理審査委員会の承認を得た。

(2) 動物モデル PCK ラットを用いた検討：

肝組織切片を用いた検討：

PCK ラットおよび正常 (SD) ラットの肝臓からパラフィン包埋組織切片を作成し、ヒト材料での検討と同様に Notch シグナル関連分子の胆管細胞における発現を免疫染色で比較検討した。

培養胆管細胞を用いた検討：

PCK ラットと正常ラットの肝内胆管から樹立した培養胆管細胞株を使用した。肝組織切片を用いた検討で PCK ラットと正常ラットで発現に差を認めた Notch シグナル関連分子について、

培養胆管細胞における発現を蛍光免疫染色により確認した。Notch シグナルの阻害剤として FLI-06 を使用した。FLI-06 投与が培養胆管細胞の細胞増殖活性、細胞老化、アポトーシス、p16 の発現に及ぼす影響をそれぞれ WST1 assay, SA-β-gal 染色, TUNEL 法, ELISA 法により検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト肝組織切片を用いた検討:

Caroli 病/CHF の拡張胆管において Notch1 は胆管細胞の核内に強く発現しており, CHF と正常肝の胆管細胞核における Notch1 発現はなにかかわらずであった(図1)。Jagged1,2 と DLL3,4 の発現は対象群間で発現差はなかったが, DLL1 は Caroli 病/CHF において胆管細胞の細胞質での発現亢進を認めた(図1)。Notch リガンド・レセプターの発現状態と一致して, Hes1 は Caroli 病/CHF の胆管細胞核で強く発現し(図1), 胆管細胞核の cyclin D1 標識率は Caroli 病/CHF で有意に高値を示した。

(2) 動物モデル PCK ラットを用いた検討:

肝組織切片を用いた検討:

Notch1,4 は正常ラットと比較して PCK ラット胆管細胞核で発現亢進を認めた(図2)。これに対応して胆管細胞の核における Hes1 の発現も PCK ラットで亢進し, Notch リガンドの中では DLL1 の発現が PCK ラット胆管細胞で亢進していた(図2)。Caroli 病/CHF の肝組織切片を用いた検討では, 胆管細胞核における Notch4 の発現亢進は明らかでなかったが, それ以外の成績はヒトにおける免疫染色の結果と一致していた。

培養胆管細胞を用いた検討:

肝臓組織切片を用いた検討と同様に PCK ラットの培養胆管細胞で Notch1,4 と Hes1 の核発現の亢進があること, および DLL1 の発現亢進があることを蛍光免疫染色で確認した。Notch 阻害剤である FLI-06 (2 uM) を培養胆管細胞に投与すると, PCK ラット培養胆管細胞の核における Hes1 の発現が低下し, これとともに細胞増殖活性が有意に抑制された(図3)。この細胞増殖活性の抑制は, 胆管細胞のアポトーシス誘導を伴うことが TUNEL 法による検討で示された(図4)。しかし, 当初の予測に反して, FLI-06 による Notch シグナルの阻害は, PCK ラット培養胆管細胞における細胞老化を誘導しないことが SA-β-gal 染色で示された(図5)。加えて, p16 の発現を ELISA 法で検討した結果, PCK ラット培養胆管細胞における p16 の発現は FLI-06 投与により影響を受けなかった(図6)。

< 引用文献 >

Hoare M, et al. Cell Cycle 2017;16:239-40.

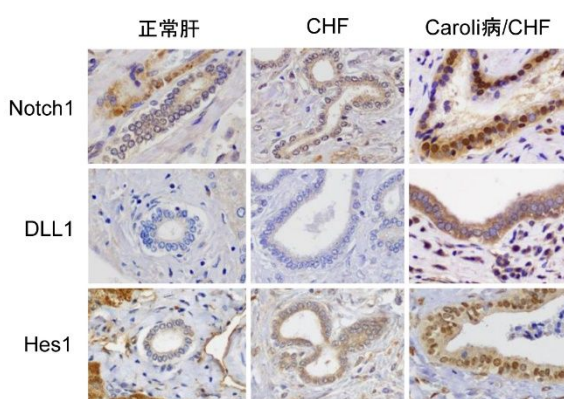


図1 ヒト肝組織の胆管細胞におけるNotchシグナル関連分子の発現 (免疫染色)

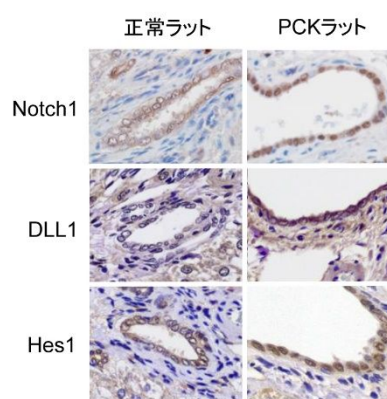


図2 ラット肝組織の胆管細胞におけるNotchシグナル関連分子の発現 (免疫染色)

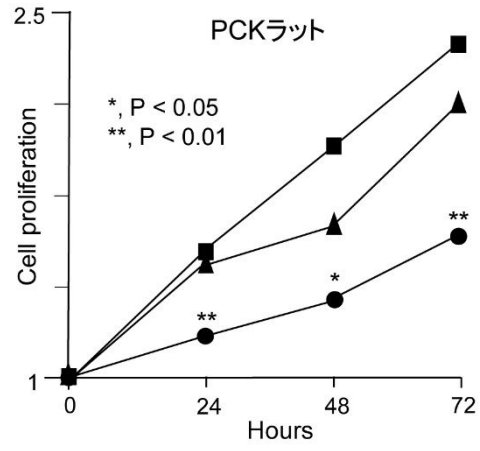
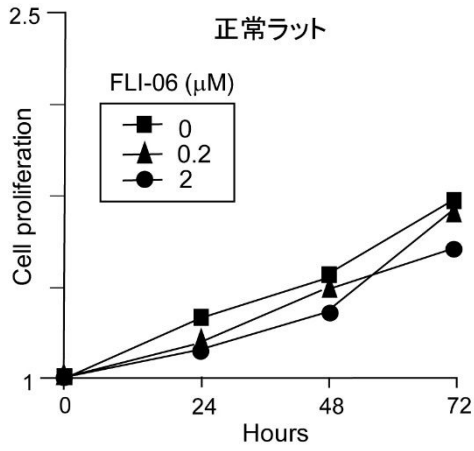


図3 ラット培養胆管細胞の細胞増殖活性に対するFLI-06の投与効果 (WST1 assay)

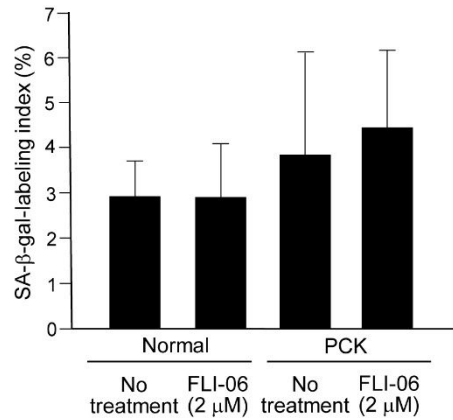
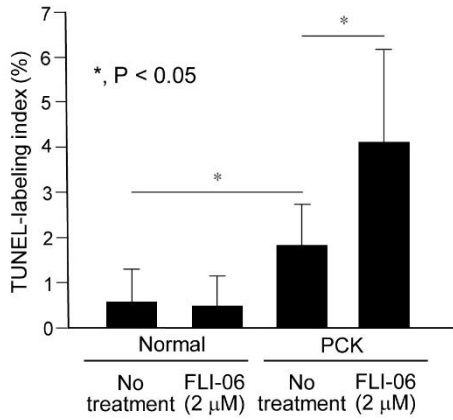
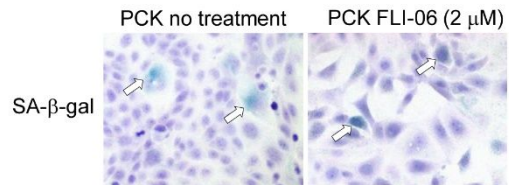
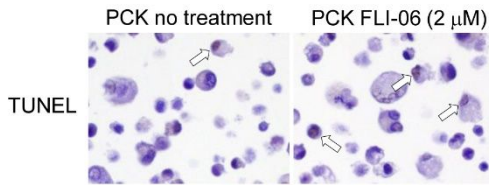


図4 ラット培養胆管細胞のアポトーシスに対するFLI-06の投与効果 (TUNEL法)

図5 ラット培養胆管細胞の細胞老化に対するFLI-06の投与効果 (SA-β-gal染色)

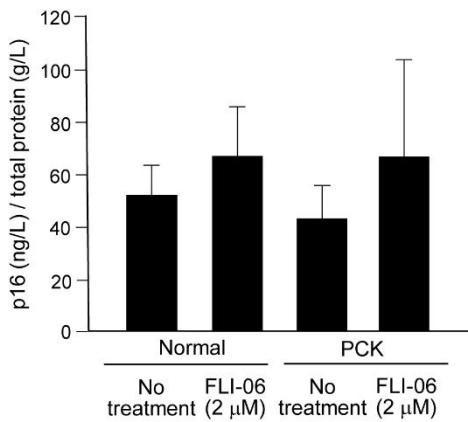


図6 ラット培養胆管細胞のp16発現に対するFLI-06の投与効果 (ELISA法)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Yoichi, Qiu Jiahe, Hirose Takuo, Miura Takahiro, Sato Yasunori, Kohzuki Masahiro, Ito Osamu	4. 巻 320
2. 論文標題 Metformin slows liver cyst formation and fibrosis in experimental model of polycystic liver disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G464 ~ G473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00120.2020	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 Takahashi Kenta, Sato Yasunori, Yamamura Minako, Nakada Satoko, Tamano Yuko, Sasaki Motoko, Harada Kenichi	4. 巻 71
2. 論文標題 Notch Hes1 signaling activation in Caroli disease and polycystic liver disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 521 ~ 529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13130	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋健太, 佐藤保則, 山村美奈子, 中田聡子, 玉野裕子, 原田憲一
2. 発表標題 Caroli病と多発性肝嚢胞におけるNotch-Hes1シグナルの活性化
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------