

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590680

研究課題名(和文) 大酒家突然死症候群と肝障害に関与する骨髄由来細胞の検討

研究課題名(英文) Relationship between sudden death syndrome of alcohol drinker and the role of bone marrow-derived stellate cells in alcohol-induced fatty liver

研究代表者

藤宮 龍也 (FUJIMIYA TATSUYA)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50219044

研究成果の概要(和文)：

大酒家突然死症候群では、大量飲酒者が脂肪肝程度の障害しか認められないにもかかわらず、突然死する。この原因について、細胞変性・再生医学的な視点から研究を行った。その結果、主に肝臓の臓器障害では、骨髄由来の伊東細胞がアルコール投与により出現し、臓器障害に関与することが判明した。心臓にも筋線維芽細胞が出現することが明らかとなった。また、交感神経系の活性化が臓器障害と関係している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Chronic alcohol consumption activates hepatic stellate cells (HSCs) and cause fatty degeneration in the liver. However, the origin of HSCs and the mechanism of fatty changes of the liver have not been fully elucidated. Here, we examined the roles of bone marrow-derived cells (BMDCs) in a mouse model with chronic alcohol consumption. We performed bone marrow transplantation from transgenic mice expressing green fluorescence protein (GFP) to female wild-type and ROSA mice and treated them with ethanol (EtOH) for 8 or 16 wk. GFP-expressing BMDCs increased in the liver with EtOH treatment in a time-dependent manner. In response to excess alcohol consumption, ~68% of the BMDCs became activated HSCs in that they expressed α -smooth muscle actin. Meanwhile, ~67% and ~66% of these BMDCs expressed Tnf- α and transforming growth factor (Tgf)- β 1, respectively, and the activities were further supported by the excessive mRNA expression of Tnf- α and Tgf- β 1 in RT-PCR, respectively. Cell fusion occurs between BMDCs and nonparenchymal cells but scarcely occurs between BMDCs and hepatocytes, demonstrated by double staining of β -gal/GFP and further supported by the Y-chromosome staining. The EtOH withdrawal normalized most of the abnormalities produced by chronic alcohol consumption. These results indicate that excess alcohol consumption stimulates both the homing of HSCs from the bone marrow and their profibrogenic cytokine production in a mouse model of alcohol-induced fatty liver disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究代表者の専門分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：アルコール、大酒家、突然死、脂肪肝、アルコール性臓器障害、骨髄幹細胞、法医学、伊東細胞

1. 研究開始当初の背景

アルコールの慢性的な飲酒により種々の臓器に障害が起こる。法医病理学領域では大酒家突然死症候群が有名で、大量飲酒者が脂肪肝程度の障害しか認められないのに突然死する。この原因については不明な点が多い。アルコール性の肝障害や心筋症について研究が多くされてきたが、慢性的アルコール投与による心臓における交感神経系活性化や不整脈の発生リスク増加を報告した。これは大酒家突然死症候群の原因の一つと考えられるが、アルコール性肝障害との関連も検討する必要がある。近年、非アルコール性の肝障害が注目され、アルコール性の肝障害や心筋障害との比較検討がなされるようになった。

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、アルコール非摂取者で肥満や糖尿病に合併して起こる肝細胞の脂肪性変化と炎症像を特徴とし、高頻度で肝硬変に至る疾患である。生活習慣病である肥満や糖尿病の増加に伴って NASH も増加の一途を辿っており、病態の解明が急務とされている。従来の研究においては、糖尿病に合併する肝内脂肪蓄積のメカニズムとして、エネルギー摂取過多にともなう高インスリン血症ならびに肝細胞内の糖代謝異常により引き起こされる二次的な現象とされていた。しかしながら、非肥満糖尿病患者においても NASH は高率に認められ、その発生機序に関して決定的な説明はなされておらず、アルコール性臓器障害の研究に多くの示唆を与えている。

一方、骨髄細胞との細胞融合 (cell fusion) によって、肝臓、神経、筋肉細胞が形質転換を来すという事実は、Nature 2002 に最初に報告されてから、一躍世界の注目をあび、その後細胞融合をおこす骨髄細胞は必ずしも幹細胞である必要がなく、高分化型の造血細胞である可能性が報告されてきた。この細胞融合の実験的証拠が提出された事で、再生医学の方向が大きく転換してきている。これまでは、各組織に分布し特定の細胞になる事が運命づけられた specific stem cell が各種臓器の再生のプロジェニター細胞になるという概念や、ES 細胞などの pluripotential cell から特殊に分化した細胞が生じるという概念に、既に分化を遂げた細胞どうしが融合する事で、第3の新たな細胞が生じるという新しい概念が付け加えられた。しかしながら 2002 年以降の世界の研究の流れとしては、

ほとんどの研究が細胞融合のメカニズムを臓器再生に利用するというものであった。その中で、高血糖下で出現する異常な骨髄細胞が末梢神経の神経細胞と細胞融合を起こすことで、神経細胞の変性を引き起こし、糖尿病性末梢神経障害の原因になることを報告された (Terashima T, Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Proc Natl Acad Sci USA 102: 12525-12530, 2005)。これは骨髄細胞との細胞融合現象が変性疾患の原因になることを示した世界で最初の報告であり、「再生と変性とを一つの事象の裏と表」という捉え方をして、変性疾患の原因を細胞融合現象に求める新しい視点の研究であり、これにより本研究の着想を得た。

末梢神経で証明されたこの細胞融合による細胞変性という特異な現象は、他の臓器でも生じている可能性が充分にある。アルコール性臓器障害は肝臓・膵臓・神経・心臓・腎臓等多臓器に渡る。アルコールにより各臓器が個別に障害を受けるのか、アルコールによる再生不良性障害から多臓器障害が生じるのかを検討する必要があり、臓器障害解明への新しい視点である。即ち、再生医学において使われている手法を用いてアルコール性臓器障害や突然死について研究するものである。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は、

- (1) 骨髄細胞と肝細胞の細胞融合という特異な現象を実験的に検討する。
- (2) アルコール性肝障害で出現する骨髄由来細胞を選択的に単離する。
- (3) この細胞の遺伝子解析を行ない、正常細胞との遺伝子発現の違いを検討する。
- (4) この細胞がアルコール性肝障害や突然死にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

である。

このために、

- ① マウスへの慢性アルコール投与モデルの作成
- ② マウスへの放射線照射による宿主側の骨髄細胞の破壊
- ③ ドナー側の骨髄細胞の単離と宿主への骨髄移植
- ④ アルコール依存症動物の免疫組織化学用の固定
- ⑤ 骨髄および肝臓の免疫多重染色と共焦点

レーザー顕微鏡観察

⑥細胞融合を確定する為の Y 染色体染色 (FISH 法)

⑦単離骨髄細胞および単離肝細胞の FACS による細胞分取

⑧RT-PCR、マイクロアレイなどの遺伝子解析等を駆使して、主に病理形態学的に研究を行う。

3. 研究の方法

(1)アルコール依存症・アルコール性臓器障害マウスの作成 (劉、藤宮)

マウスにアルコールを 5% から始めて 10% にして飲水瓶に入れて投与する。様子を見ながら 8 週間と 16 週間投与する。同時にコントロール群を同様の環境におき、作成する。臓器障害等について病理組織学的に検討する。山口大学動物施設を使用し、既に医学部動物使用委員会より審査を終了している (13-010)。

(2)肝細胞と骨髄細胞の細胞融合の In vivo での検討

①Rosa (β galactosidase 過剰発現) マウス (ホスト: メス) への GFP (MipGFP) マウス (ドナー: オス) の骨髄の移植 (劉、藤宮)

GFP マウスは GFP 遺伝子を接着して過剰発現させたマウスで細胞に特異的に GFP が発現するもので、Rosa マウスは β galactosidase が過剰発現させたマウス (ホスト: メス) である。両種類とも動物取扱業者より購入する。GFP マウスの骨髄を単離し、放射線照射で骨髄細胞を破壊した Rosa マウスへ骨髄移植する。骨髄移植後 1 ヶ月経過した時点で Rosa マウスにアルコールを投与、アルコール依存症モデルを作る。

②骨髄と肝臓における GFP 陽性細胞 / β galactosidase 陽性細胞の共存に関する蛍光多重染色 (劉、藤宮)

アルコール投与後 8 週や 16 週のマウスの骨髄と肝臓を免疫組織化学用に固定。GFP, β galactosidase の多重染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。細胞融合の証明には、肝細胞の Y 染色体の証明 (FISH 法) を行ない、確かにドナー由来の細胞であるかを確認する。

③骨髄と肝臓に出現する骨髄由来細胞を分類する為のマーカ染色 (劉、藤宮)

アルコール性臓器障害で肝臓に出現する骨髄由来細胞がどの lineage に属するのかを各種表面マーカー抗体 (Mac1 α , CD11c, c-kit, CD34, Thy1, CD45) を用いて免疫組織化学的に検索する。さらにこの細胞が細胞変性の原因になる証拠として TNF α 、 α SMA を産生するかどうか免疫組織化学で調べる。

3. 肝細胞と骨髄由来細胞の In vivo での検討 (劉、藤宮)

アルコール性臓器障害で骨髄や肝臓に出現する細胞がどの lineage に属するのかを各種表面マーカー抗体 (Mac1 α , CD11c, c-kit, CD34, Thy1, CD45) を用いて免疫組織化学的に検索する。さらにこの細胞が細胞変性の原因になる証拠として TNF α 、 α SMA や trypsin を産生するかどうか免疫組織化学で調べる。

4. 研究成果

実験の結果は、

(1)アルコール性臓器障害マウスをアルコールの慢性投与により作成した。

(2)主に肝臓の臓器障害を検討し、大きな障害は認められなかったが、骨髄由来の伊東細胞がアルコール投与により出現した。

(3)この骨髄由来の伊東細胞が臓器障害に関係することが判明した。

(4)心臓にもアルコール性臓器障害が出現し、肝臓と同じように筋線維芽細胞が出現することが明らかとなった。また、交感神経系の活性化がアルコール性臓器障害と関係している可能性が示唆された。詳しくは文献参照。

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 3 件)

①劉 金耀、藤宮龍也、他、アルコール性脂肪肝における骨髄細胞の動員および分化・増殖、アルコールと医学生物学、査読有、29 巻、2010、27-32

②Shirafuji S, Liu J, Fujimiya T. QT Interval Dispersion and Cardiac Sympathovagal Balance Shift in Rats with Acute Ethanol Withdrawal. Alcohol Clin Exp Res. 査読有, 34(2), 2010, 223-230

③Fujimiya T, Liu J et al. Pathological roles of bone marrow-derived stellate cells in a mouse model of alcohol-induced fatty liver. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 査読有, 297, 2009, G451-G460

[学会発表] (計 1 件)

①劉 金耀、藤宮龍也、他、アルコール性脂肪肝における骨髄細胞の動員および分化・増殖、アルコール医学生物学研究会、2009 年 11 月 13 日、千葉、千葉大学

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~legal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤宮 龍也 (FUJIMIYA TATSUYA)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50219044

(2) 研究分担者

劉 金耀 (LIU JINYAO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60379956

(3) 連携研究者

なし