

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22964

研究課題名（和文）肝再生調節機構におけるTEM8の役割解明と新規治療法開発への応用

研究課題名（英文）The role of TEM8 in the regulatory mechanism of liver regeneration and its utilization in the development of innovative therapies

研究代表者

野口 隼矢（Noguchi, Syunya）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30879698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では肝再生調節機構におけるTumor endothelial marker 8 (TEM8) の役割を解明することにより、慢性肝疾患に対する新規治療開発のための研究基盤構築を目的として研究を行った。コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料を用いたNAFLD/NASH誘導マウスを作製し、肝臓におけるTEM8発現を免疫組織学的に解析した。TEM8は正常肝臓の胆管（毛細胆管～小葉間胆管）の内腔面において発現しており、肝障害に伴い毛細胆管における発現が減少していることが明らかとなった。このことからTEM8はNASH病態時における胆管障害の指標となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、インテグリン類似蛋白であるTEM8が肝障害に伴って、その発現および局在を変化させることを免疫組織学的に明らかにし、TEM8がNAFLD/NASH病態時における新たな胆管障害マーカーとなり得ることを示唆する先駆け研究となった。

TEM8は肝前駆細胞から胆管形成ネットワークを構築する肝再生機序における因子として機能する可能性が高く、この研究の継続発展は肝再生医療への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to elucidate the role of Tumor Endothelial Marker 8 (TEM8) in the regulatory mechanism of liver regeneration and establish a research platform for the development of novel therapies for chronic liver diseases. We generated NAFLD/NASH-induced mice fed a choline-deficient, methionine-reduced, high-fat diet and analyzed TEM8 expression in the liver using immunohistochemistry. Our findings indicated that TEM8 was expressed on bile ducts (capillary to interlobular bile ducts). These results suggest that TEM8 may serve as an indicator of bile duct injury in the liver of NASH.

研究分野：消化器病学、肝臓病学、組織学

キーワード：肝臓病 肝炎 インテグリン類似蛋白

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓の再生には異なる二つの機序が存在する。急性障害によって肝細胞壊死などが生じた場合、成熟肝細胞の増殖により肝実質の再生が行われる。一方で、広範囲にわたる持続的な障害によって成熟肝細胞の増殖抑制が生じた場合、肝細胞および胆管細胞の両方に分化可能な肝前駆細胞(Hepatic progenitor cells: HPCs) が活性化することで、肝再生が行われることが明らかにされている。近年、HPCs の増殖・分化には、Epidermal growth factor (EGF)、Hepatocyte growth factor (HGF) あるいはTumor growth factor (TGF) などが関与し、また周囲微小環境におけるUrokinase-type plasminogen activator (uPA) 産生を介した増殖調節機構も存在する。しかし、HPCs の形質の多様性からその特異的マーカーは未だ存在せず、肝細胞および胆管細胞への分化を誘導する本質的な因子の解明には至っていない。現在、進行した慢性肝炎および肝硬変などに対する治療法は肝移植のみであるが、絶対的なドナー不足といった問題を抱えている。それらを打破するための新規治療開発が要求されており、そのためには肝再生におけるHPCs の多機能性および二相性分化誘導メカニズムのさらなる解明が必須である。

そこで、TEM8 がHPCs の増殖・分化における新たなシグナル経路として機能することで、肝再生調節機構に関与しているのではないかと着想に至った。

2. 研究の目的

本研究計画では、肝臓におけるTEM8 陽性細胞の形態・機能解析を実施することで肝再生調節機構への役割を検索し、さらには慢性肝障害モデルマウスに対するTEM8 陽性細胞に着目した肝再生治療を検討することで、肝再生におけるTEM8 を介したシグナル伝達を解明するための基礎的研究を遂行し、慢性肝疾患に対する新規治療法を確立するために基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 正常臓器および肝組織におけるTEM8 発現・局在解析

4週齢C57BL/6雄マウスに対して、4%PFA還流固定を実施し、パラフィンおよび凍結切片を作製した。TEM8、ZO-1(毛細胆管マーカー)およびCK19(胆管細胞マーカー)を用いた蛍光免疫組織化学染色を実施した。また未固定マウスを用いて、各臓器におけるRNA抽出を行った後、臓器別TEM8 mRNA発現解析を実施した。

(2) NAFLD/NASH誘導マウスの作製

4週齢C57BL/6雄マウスに対して、コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料(オリエンタル酵母工業株式会社にて作製)を4週間給餌することでNAFLD/NASH誘導マウスを作製した。NAFLD/NASH誘導の評価はHE染色、Oil Red O染色およびマッソントリクローム染色を用いることで、炎症細胞浸潤、肝細胞障害、脂肪蓄積、線維化により決定した。

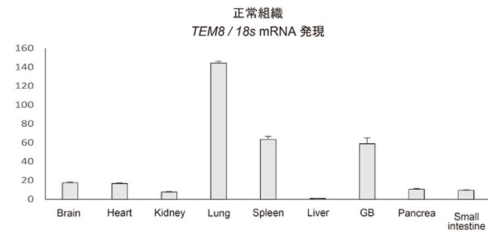
(3) NAFLD/NASH誘導マウスの肝臓におけるTEM8発現・局在解析

(2)で作製した各段階のNAFLD/NASH誘導マウスを4%PFA還流固定後、TEM8、ZO-1およびCK19を用いた蛍光免疫組織化学染色を実施した。

4. 研究成果

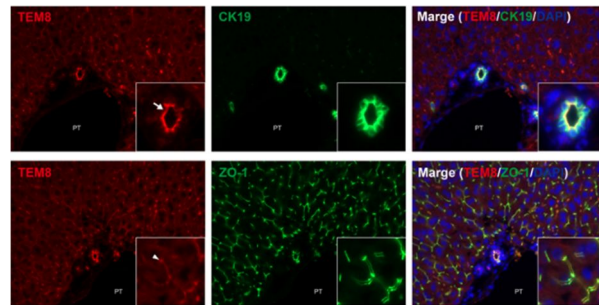
(1) 正常組織における *TEM8* mRNA 発現解析

4 週齢 C57BL/6 雄マウスの各臓器（脳、心臓、腎臓、肺、脾臓、肝臓、胆嚢、膵臓、小腸）における *TEM8* mRNA 発現を real-time PCR により解析した結果、*TEM8* mRNA は肺において最も高く、次いで脾臓・胆嚢で高い発現を示していた。また、肝臓における *TEM8* mRNA 発現は最も低いことが明らかとなった（右図）。



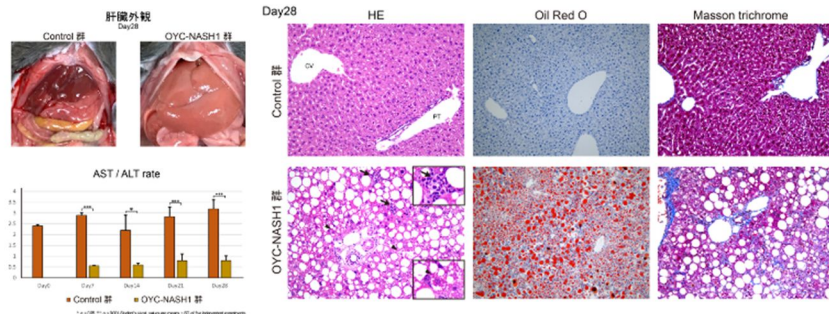
(2) 正常肝組織における *TEM8* 発現および局在

4 週齢 C57BL/6 雄マウスの肝臓において、蛍光免疫組織化学染色により *TEM8*、ZO-1 および CK19 発現解析を実施したところ、胆管細胞（CK19 陽性）で構成された小葉間胆管の内腔面において *TEM8* 発現が認められた（右図）。また ZO-1 陽性で示される毛細胆管領域において管腔状に *TEM8* 発現が認められた（右図）。このことから正常肝臓において、*TEM8* は胆管（毛細胆管～小葉間胆管）において発現しており、胆管を構成する特異的因子として機能している可能性が示唆された。



(3) NAFLD/NASH 誘導マウスの作製

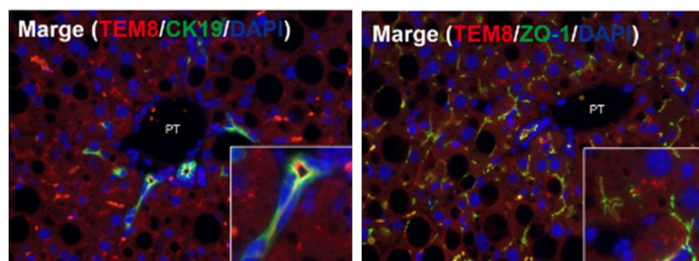
コリン欠乏メチオニン減量高脂肪飼料を用いて給餌を開始し、Day7、14、21、28 における組織構造解析および血液生化学検査により肝障害の評価を行った。



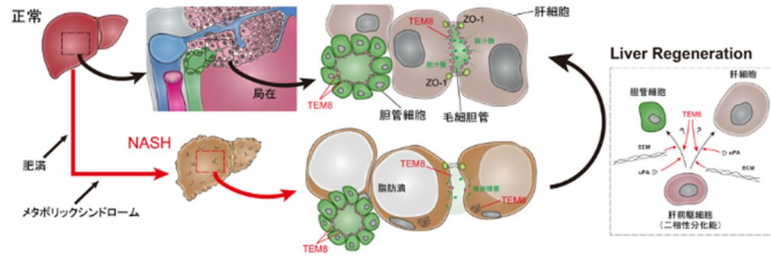
給餌初期から肉眼的肝腫大および Oil Red O 染色にて高度な脂肪的蓄積を認め、給餌日数が進むにつれて炎症細胞の出現および線維化といった組織学的変化が出現した（右図）。また血中 AST および ALT の上昇（AST/ALT: <1）を示していた。このことから、特殊飼料を用いた C57BL/6 マウスは Day28 において、NAFLD/NASH を発症することが明らかとなった。

(4) NAFLD/NASH 誘導マウスの肝臓における *TEM8* 発現・局在解析

NAFLD/NASH 誘導マウス肝臓において、蛍光免疫組織化学染色により *TEM8*、ZO-1 および CK19 発現解析を実施したところ、小葉間胆管（CK19 陽性）の内腔面における *TEM8* 発現は継続して認められた。一方で、毛細胆管（ZO-1 陽性）の内腔面における *TEM8* 発現は減少しており、肝細胞の細胞質において凝集した *TEM8* 発現が認められた（右図）。



これらの結果から、TEM8 は正常肝臓において胆管（毛細胆管～小葉間胆管）において発現していることが明らかとなった。TEM8 mRNA は各臓器の中で肝臓が最も低発現



を示していたが、これは組織局在の結果から、肝組織の中において TEM8 が胆管系に局限して発現していることに起因すると考えられた。このことから TEM8 は胆管系（特に内腔面）を構成する特異的因子として機能している可能性が示唆された。また、本研究において作製した NAFLD/NASH 誘導マウスを用いた非アルコール性肝障害に伴う発現解析の結果、TEM8 の毛細胆管における発現が減少していることが明らかとなった。このことから TEM8 は NASH 病態時における胆管障害の指標となる可能性が示唆された。

これまでに、TEM8 は uPA が生理的リガンドであり、また細胞外マトリクスである Ⅰ型およびⅢ型コラーゲンとの相互作用により細胞内シグナルが活性化されることが報告されている。これら uPA および細胞外マトリクスは肝臓の再生機構において肝細胞増殖や線維化の回復などに関与していることがわかっている。本研究において、我々が着目している TEM8 は胆管系に局限していたことから、肝再生での肝前駆細胞の胆管細胞への分化、または肝細胞の胆汁排泄機能獲得のための分子基盤として機能している可能性が示唆された。今後は、TEM8 の肝細胞における胆汁排泄能への影響および分離培養した肝前駆細胞を用いた機能解析を実施するとともに、さらに TEM8 の細胞内下流シグナルを解析することで肝前駆細胞の二相性分化能解析へと展開する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Araki Mami, Noguchi Syunya, Kubo Yoshiaki, Yasuda Akiko, Koh Miki, Otsuka Hirotsuda, Yokosuka Makoto, Soeta Satoshi	4. 巻 200
2. 論文標題 Expression of receptor-type tumour endothelial marker 8 in carcinoma cells showing luminal progenitor-like phenotypes in canine mammary gland carcinomas	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Pathology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcpa.2022.12.001	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口隼矢、添田聡、櫻井孝信、瀧澤俊広
2. 発表標題 正常およびNASH/NAFLD誘導マウスの肝臓におけるTEM8発現解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mami Araki, Noguchi Syunya, Akiko Yasuda, Yoshiaki Kubo, Miki Koh, Hirotsuda Otsuka, Makoto Yokosuka, Satoshi Soeta
2. 発表標題 Expression of tumor endothelial marker 8 and association with differentiation of tumor cells in canine mammary grand tumors.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回日本生理学会大会合同大会
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
---------	---------