

機関番号：37104

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：20790691

研究課題名

(和文) 肝再生における上皮間葉転換 (EMT) の病態生理学的な意義

研究課題名

(英文) Significance of epithelial-mesenchymal transition for liver regeneration

研究代表者

桑原 礼一郎 (REIICHIRO KUWAHARA)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30389275

研究成果の概要 (和文)：

【動物実験】 マウス肝組織を用いて肝幹細胞のマーカーである Pan Keratin と EMT 関連転写因子 (Snail、SIP1、Twist 等) との多種にわたる多重染色法 (免疫組織化学) を確立した。C57/BJ6 マウスにアセトアミノフェン (APAP) の投与を行い、急性肝不全を誘導したマウス肝組織では、肝幹細胞/肝前駆細胞である oval cell に間葉系マーカーである S100A4 蛋白の発現があることを見出した。

【ヒト肝組織の解析】 ヒト肝組織において肝幹細胞/肝前駆細胞での上皮間葉転換を検討するため、肝幹細胞/肝前駆細胞のマーカーである EpCAM と EMT 関連転写因子 (Snail、SIP1、Twist 等) さらに上皮系マーカー (keratin 19、E-cadherin)、間葉系マーカー S100A4 との多種にわたる多重染色法 (免疫組織化学) を確立した。肝移植術の摘出肝を用いた免疫組織化学での解析では、急性肝不全で出現する偽胆管を構築する上皮細胞で EMT を制御する蛋白 (Snail、Twist 等) の発現が亢進することを見出した。

研究成果の概要 (英文)：

【 Animal experiment 】 Protocols for double -immunostaining of hepatic stem/progenitor cell marker (pan keratin) and EMT regulators (Snail, SIP 1, Twist) were established in murine liver tissue. Analyses in the murine liver, leathery injured by APAP, revealed that mesenchymal marker (S100A4) were expressed in the oval cells after administration of APAP.

【Human liver】 For the analyses of EMT in hepatic stem/progenitor cell of human liver, protocols for double-immunostaining of hepatic stem/progenitor cell marker (EpCAM), epithelial markers (keratin 19 and E-cadherin), EMT regulators (Snail, SIP 1, Twist) and mesenchymal marker (S100A4) were established in human liver tissue. Explanted livers for liver transplantation were obtained from patients and analyzed by immunostaining methods. These analyses highlighted that EMT regulators (Snail and Twist) were expressed in the epithelial ductular cells when liver was leathery injured.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器病学

キーワード：肝臓病学・肝幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの肝幹細胞研究では、肝細胞と胆管上皮に分化する上皮系肝幹細胞（肝前駆細胞）の発見、同定、その由来と肝病態形成における役割が主に報告され、肝幹/肝前駆細胞については概ね以下のように理解されていた。①肝幹細胞は胆管末梢枝である細胆管ないし Hering 管の周囲に存在する。②成熟肝細胞/胆管細胞の高度障害、増殖抑制状態で活性化される。③肝幹細胞は肝細胞と胆管細胞の二つの Lineage に分化する肝前駆細胞となる。④肝幹/肝前駆細胞の活性化は、げっ歯類肝障害モデルでは oval cell proliferation、ヒト疾患肝では細胆管増生 ductular reaction に相当する。

(2) 近年の上皮間葉転換 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) 研究により、臓器の発生には上皮と間葉の相互転換が重要であることが明らかになってきた。肝においてもマウス胎仔肝の非造血細胞性間質細胞の一部が、肝原基内胚葉細胞の EMT に由来する可能性が指摘されている。またマウス肝幹細胞の一部は逆に間葉上皮転換 (MET: mesenchymal-epithelial transition) を起こし得るとも考えられている。

(3) しかしながら肝幹/肝前駆細胞が動員される病態において、肝再生と EMT の関連や

その分子機構については十分には解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 急性肝不全における肝再生に EMT 誘導機構がどのように関与するかを明らかにする。

(2) 肝再生不全において高頻度に見られる細胆管増生と EMT 誘導機構の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス急性肝不全モデルを用いた EMT 関連転写因子の検討

oval cell における EMT 関連転写因子の発現を検討するために、まずは急性肝不全時の肝組織内における蛋白発現解析を行う。動物実験のプロトコールは、既報の実験法 (Kofman AV. et al. Hepatology 2005) (Kawahara R. et al. Hepatology 2008) に準ずる。

1. BrdU 存在下において週令 8 週オス C57/BJ6 マウスにアセトアミノフェンを単回投与し、急性肝不全を誘導する。
2. マウスをアセトアミノフェン投与より 0、3、6、9、12、24、48 時間

後に屠殺し、肝組織と血清の採取を行う。

3. 肝組織よりタンパクを抽出し、Western Blottingによって、上述の転写因子の蛋白レベルでの発現を検討する。
4. 肝組織内における上述の蛋白の局在を、免疫組織化学（多重染色法）を用いて解析する。

（2）急性肝不全ヒト肝組織における肝幹/肝前駆細胞と EMT 関連転写因子の検討

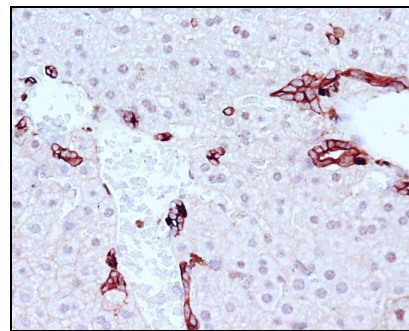
劇症肝不全あるいは遅発性肝不全発症後に肝再生不全となり、肝移植を受けた症例からの摘出肝あるいは救命されず剖検によって得られた肝組織を研究材料とする。この研究によって肝再生における EMT 関連転写因子の関与を検討するため、比較対照群として内科治療のみ肝再生が促され治癒に至った症例から得た肝生検組織、非活動性慢性肝疾患患者から得た肝生検組織を用いることとする。

1. 肝再生不全の患者から得た肝組織は、免疫組織化学に用いるため緩衝ホルマリン液にて固定を行う。
2. 肝組織において病理組織学的検討を行うために、各種免疫組織化学を行う。この検討では、特に EpCAM 陽性肝細胞とその周辺の胆管細胞あるいは oval cell に注目し、検討を行う。具体的には、ヒト肝組織において EpCAM と EMT 関連転写因子（Snail、SIP1、Twist、E2A 等）との免疫組織化学（多重染色法）を確立し、これらの細胞群における EMT 関連転写因子の発現の有無、発現の局在を検討する。

4. 研究成果

【動物実験】

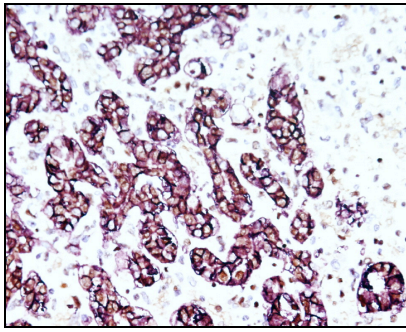
採取した肝組織を用いて上述の蛋白の発現・局在を解析するために、肝幹細胞のマーカーである Pan Keratin と EMT 関連転写因子（Snail、SIP1、Twist 等）さらに細胞分裂の指標である BrdU との多種にわたる多重染色法（免疫組織化学）を確立した。急性肝不全を誘導し肝再生を検討するために、BrdU 存在下において週令 8 週オス C57/BJ6 マウスにアセトアミノフェンの投与を行った。APAP 後に屠殺し、肝組織と血清の採取を行った。確立した各種の免疫組織化学的技法を用いて、急性肝不全発症後の肝再生における EMT の解析を行い、肝幹細胞/肝前駆細胞である Oval cell に EMT 関連転写因子の発現があることを見出した。



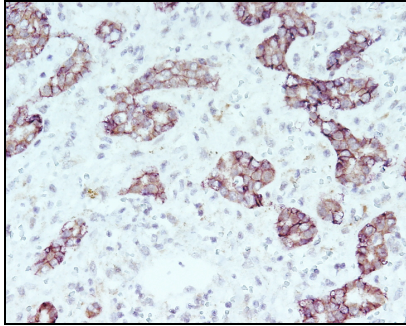
（Pan-keratin/S100A4 多重免疫染色）

【臨床検体の解析】

肝幹細胞/肝前駆細胞での上皮間葉転換を検討するため、肝幹細胞/肝前駆細胞のマーカーである EpCAM と EMT 関連転写因子（Snail、SIP1、Twist 等）さらに上皮系マーカー（E-cadherin、EpCAM）、間葉系マーカー S100A4 との多種にわたる多重染色法（免疫組織化学）を確立した。劇症肝不全（生体肝移植術の摘出肝）と慢性肝疾患の患者より肝組織の採取を行った。免疫組織化学での解析では、急性肝不全で出現する偽胆管を構築する細胞群では EMT を制御する Snail 1 と Twist の発現が亢進することを見出した。



(Snail/EpCAM 多重免疫染色)



(Twist/EpCAM 多重免疫染色)

尚、本研究で得られた結果をまとめた論文の投稿準備を進行中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① So-Mi Yoon, Domniki Gerasimidou, Reiichiro Kuwahara, Prodromos Hytiroglou, Jeong Eun Yoo, Young Nyun Park, Neil D. Theise. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* 53: 964-973, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 肝幹細胞 Niche 探索と Oval cell kinetics -アセトアミノフェン急性肝障害マウスモデルを用いて-. 第 17 回肝細胞研究会 (2010 年 6 月 19 日、秋田市)
- ② 肝幹細胞 Niche 探索と Oval cell kinetics -アセトアミノフェン急性肝障害マウスモデルを用いて-. 第 13 回九

州肝不全研究会 (2009 年 9 月 22 日、福岡市)

- ③ 急性肝障害マウスにおける Oval cell kinetics と肝再生. 第 45 回日本肝臓学会 (2009 年 6 月 3 日、神戸市)

[図書] (計 2 件)

- ① 桑原礼一郎、神代龍吉. 劇症肝不全・世界の現状 (Overview). 肝胆膵 59: 371-380, 2009.
- ② 桑原礼一郎、神代龍吉. 劇症肝炎の管理指針 (Guidelines for fulminant hepatic failure). 救急・集中治療ガイドラインー最新の治療指針ー 2010-' 11. 280-281, 2010.

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 礼一郎 (KUWAHARA REIICHIRO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30389275

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者