

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590719

研究課題名（和文）肝発生および肝疾患における非実質細胞の細胞間相互作用の解明

研究課題名（英文）Analysis of cell-cell interaction among hepatic non-parenchymal cells in liver development and diseases

研究代表者

田中 稔 (TANAKA MINORU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：80321909

研究成果の概要（和文）：肝臓の毛細血管網である類洞は主に肝星細胞と類洞内皮細胞により構成される。本研究では肝臓の線維化に関わる肝星細胞とその他の非実質細胞との細胞間相互作用に注目し、オンコスタチン M(OSM)が肝星細胞に直接作用することで TIMP-1 の発現を誘導してコラーゲン線維の分解を抑制するとともに、その他の非実質細胞を介して活性化することを見出した。また、肝臓に OSM を発現させることにより、肝障害を誘導することなく肝線維化のみを誘導できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Hepatic sinusoid is composed of stellate cells (HSCs) and sinusoidal endothelial cells. In this study, we focused on cell-cell interaction between HSCs and the other non-parenchymal cells (NPCs) at liver fibrosis. We found that Oncostatin M (OSM) directly induced TIMP-1 expression in HSCs and contributed to liver fibrosis by suppressing the digestion of collagen fiber. Furthermore, OSM seemed to induce the activation of HSCs indirectly via NPCs. Finally, overexpression of OSM in liver resulted in fibrosis without apparent hepatic injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝臓は様々な細胞種によって構成され恒常性を維持している。我々はこれまでに各細胞種に対するマーカー分子を同定し、そのモノクローナル抗体を作製することで細胞種毎の純化と培養系の構築を行ってきた。

(2) 肝臓の毛細血管網である類洞は肝星細胞と類洞内皮細胞によって構成される。これ

らの細胞は発生初期から接触して存在し、互いに分化や活性化を制御し合っていると考えられるがその詳細は不明である。

(3) 肝星細胞は肝線維化において最も重要な役割を果たす細胞である。そのため、星細胞そのものの活性化機構に関する研究は多くなされているが、細胞間相互作用という観点からの研究は進んでいなかった。

(4) オンコスタチン M は肝再生に寄与することを報告してきたが、肝線維化および肝星細胞に対する作用については不明な点が残されていた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、肝星細胞と類洞内皮細胞の共培養系を開発し、分化マーカーの発現を指標に最適な条件を検討することで、各細胞種の分化制御や活性化に関わる細胞間相互作用の特定と、責任分子を同定することを目的とする。

(2) 特にOSMの肝星細胞および非実質細胞に対する直接作用および間接作用を明らかにすることで、肝線維化における細胞間相互作用の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) まず、成体肝臓よりコラゲナーゼ灌流法により細胞を分散させ、肝星細胞と類洞内皮細胞を特異的抗体を用いて分離する。その上で、*in vitro*での培養法を検討し、培養条件の最適化を計る。

(2) 肝星細胞の単独培養または類洞内皮細胞や血液細胞との共培養系に OSM を添加することで、肝星細胞の活性化や発現遺伝子の解析を行ない、OSM の肝線維化における作用機序を明らかにする。

(3) OSM を Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi 法: マウスの尾静脈より発現プラスミドを短時間で注入することにより、肝臓で外来遺伝子を発現させる方法)により成体肝臓で発現させ、肝線維化に及ぼす作用を *in vivo* で検証する。

4. 研究成果

(1) 肝星細胞は培養するだけで活性化が進行する。そのため、定常状態で培養することが重要となる。様々な培養条件を検討した結果、無血清で 2%B27 添加 DMEM 培地が比較的長い間定常状態を維持できることが分かった。

(2) 類洞内皮細胞も同様に無血清で 2%B27 添加 DMEM 培地で培養可能であるが、VEGF, bFGF の添加を必要とした。

(3) 肝星細胞の単独培養に OSM を添加すると、筋線維芽細胞様の形態変化を誘導した (図 1)。筋線維芽細胞様細胞への分化転換は肝線維化時に肝星細胞で見られる現象であり、OSM が星細胞の活性化に直接関わる可能性が示された。

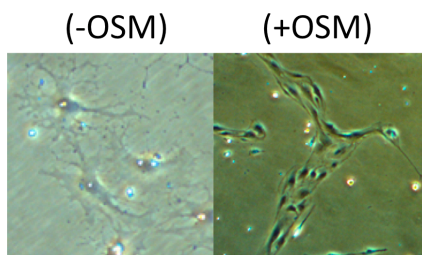


図1 OSM添加による形態変化

(4) OSM は肝星細胞に対して TIMP-1 の遺伝子発現を強く誘導した。TIMP-1 はコラーゲンを分解する MMP の活性を阻害する分子であることから、TIMP-1 の発現を介して肝線維化に関わる可能性が示された。しかしながら、OSM は直接的にはコラーゲン遺伝子の発現は誘導しなかった (図 2)。

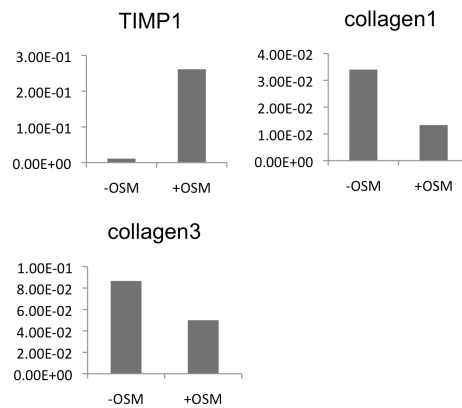


図2 肝星細胞培養系にOSMを添加3日後の遺伝子発現

(5) OSM は肝星細胞の単独培養ではコラーゲン遺伝子の発現を誘導しなかったが、その他の非実質細胞との共培養系ではコラーゲン遺伝子の発現を誘導した。このことから、OSM は非実質細胞にも作用し、間接的に肝星細胞の活性化に関わることが示唆された。

(6) *in vivo*での OSM の作用を検討するために、HTVi 法により OSM の発現プラスミドを肝臓で発現させた。シリウスレッド染色を行った結果、OSM の発現により肝線維化が誘導されていることが明らかとなった (図 3)。

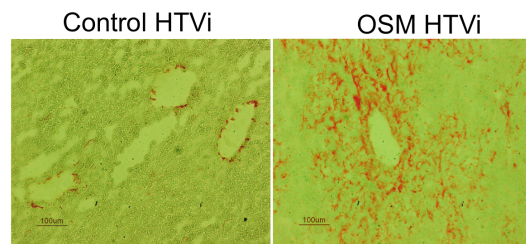


図3 HTVi法によりOSMを肝臓で発現後4週間後の肝臓のシリウスレッド染色

また、線維化関連遺伝子 (コラーゲン遺伝子、TGFb, aSMA など) の発現も有為に誘導されていた (図 4)。TIMP-1 も *in vitro*の結果と同様に強く発現誘導されていた。興味深いことに、血中肝障害マーカーである ALT や AST を測定した結果、肝障害はほとんど起きていないことが明らかとなった (図 5)。通常、肝線維化は慢性肝炎を背景とすることから、肝炎時に産生される OSM が肝星細胞に直接的および間接的に作用し、コラーゲン遺伝子産生の亢進と TIMP-1 によるコラーゲン分子の分

解抑制が相乗的に働き、肝線維化が進行するものと考えられた。

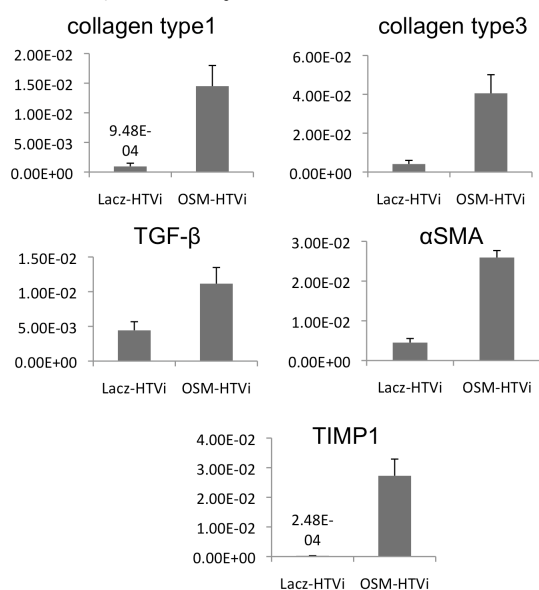


図4 HTVi法によりOSMを肝臓で発現後2週間の肝臓での遺伝子発現解析

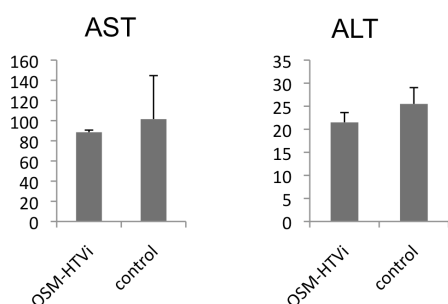


図5 HTVi法によりOSMを肝臓で発現後2週間の血清中肝障害マーカー

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 4 件)

- ① Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. Inagaki, FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi, K, Oyaizu N, Kokudo N, Miyajima A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 430:751-6 (2013) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.076. 査読有り
- ② TROP2 expressed in the trunk of the ureteric duct regulates branching morphogenesis during kidney development. Tsukahara Y, Tanaka M, Miyajima A. *PLoS One* 6(12):e28607 (2011) doi:

10.1371/journal.pone.0028607. 査読有り

- ③ Liver stem/progenitor cell: their characteristics and regulatory mechanisms. Tanaka M, Ito T, Tanimizu N, Miyajima A. *J Biochem.* 149(3):231-239 (2011) doi: 10.1093/jb/mvr001. 査読有り

- ④ Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. Kubin T et al. (13人中8番目) *Cell Stem Cell* 9(5):420-432 (2011) 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 標題: オンコスタチンMはマクロファージのM1/M2バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する 発表者: 田中稔 学会名: 第85回 日本生化学会 場所: 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 発表日: 2012年12月16日
- ② 標題: オンコスタチンMはマクロファージのM1/M2バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する 発表者: 田中稔 学会: 第19回 肝細胞研究会 場所: 札幌医科大学 発表日: 2012年6月29日
- ③ 標題: Characterization of hematopoietic niches in mouse fetal liver 発表者: 田中稔 学会: 10th ISSCR annual meeting 場所: 横浜 発表日: 2012年6月15日
- ④ 標題: Identification of fetal liver cells contributing to hematopoiesis during mouse embryogenesis 発表者: 田中稔 学会: BMB2010 場所: 神戸 発表日: 2010年12月9日

- ⑤ 標題: Identification of fetal liver cells contributing to hematopoiesis during mouse embryogenesis 発表者: 田中稔 学会: FASEB Summer Research Conference 場所: アメリカ・Snowmass 発表日: 2010年8月18日 [図書] (計 4 件)

- ① Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells. Tanaka M, Miyajima A. *Methods Mol Biol.* 826:25-32 (2012) doi: 10.1007/978-1-61779-468-1_3. 査読無し
- ② マーカー分子による肝幹/前駆細胞の性状解析 田中稔 *生化学* 第84巻第8号, pp635-641 (2012) 査読無し
- ③ 細胞間相互作用による肝幹細胞の発生・分化の制御機構 伊藤暢, 田中稔 *実験医学* (29巻13号8月号) 羊土社 (2011) 査読無し
- ④ Liver stem cells. Itoh T, Tanaka M, Miyajima A. *Regenerative Medicine*

from Protocol to Patient (Springer 327 Ed. G. Steinhoff) p327-349. (2011) 査読無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：オンコスタチンM受容体シグナリング制御によるメタボリック症候群の治療

発明者：森川吉博、宮島篤、田中稔、小森忠祐

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2011-208354

出願年月日：2011 年 9 月 26 日

国内外の別：国内

名称：非アルコール性脂肪肝炎モデル非ヒト哺乳動物及びその作製方法

発明者：宮島篤、田中稔

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：特願 2011-208354

出願年月日：2012 年 6 月 28 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 稔 (TANAKA MINORU)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：80321909

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：