

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 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591507

研究課題名（和文） 類洞内皮細胞を標的とした肝硬変治療薬の創薬—肝線維化の細胞学的機序に関する研究

研究課題名（英文） Potentiality of endothelial to mesenchymal transition in ex-vivo rarely contribute to hepatic fibrogenesis in vivo

研究代表者

富川 盛雅 (TOMIKAWA MORIMASA)

九州大学・大学病院・准教授

研究者番号：60325454

研究成果の概要（和文）：

マウス肝硬変モデルにて類洞内皮細胞が、肝線維化において主要な役割を担う間葉系細胞である筋線維芽細胞に変容するかどうかを検討した。血管内皮に GFP が高発現するダブルトランスジェニックマウスを使用。In vitro の実験では内皮細胞は間葉系細胞に変容することが示されたが、in vivo では間葉系細胞に変容する細胞は微小であった。この結果からマウス肝硬変モデルにおける肝線維化には、内皮細胞由来ではない間葉系細胞が主要な役割を担っていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

BACKGROUND AND AIMS: Recent studies have reported the possibilities of endothelial to mesenchymal transition (EndMT) in several tissues, which means endothelial cells migrating into fibrotic tissue exhibit a myofibroblast-like phenotype and may participate in the progression of tissue fibrosis. However, their contribution to fibrosis in liver has not been fully verified yet. We revisited this issue by using liver fibrosis models introduced into transgenic collagen reporter mice.

METHODS: Bone marrow of Tie2-Cre, CAG-CAT, GFP double transgenic mice was replaced by cells obtained from wild-type mice harboring endothelial cell-specific Tie2 gene linked to enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene. Liver fibrosis was introduced into those mice by repeated carbon tetrachloride injections. EGFP expression was assessed by confocal microscopic examination.

RESULTS: Endothelial cells performed mesenchymal transition during primary culture on plastic. In Tie2-Cre, CAG-CAT, GFP double transgenic mice, endothelial cells express EGFP, at the same time, a large number of EGFP-positive immunocompetent cells were observed. In contrast, Tie2-Cre, CAG-CAT, GFP double transgenic mice whose bone marrow was replaced by cells obtained from wild-type mice have no EGFP positive cells but endothelial cell. Though, double transgenic mice observed many EGFP-positive cells at liver fibrotic area,

there were few EGFP-positive cell in double transgenic mice whose bone marrow was replaced by wild-type mice.

CONCLUSIONS: By using a specific and sensitive experimental system, which detects cells whose roots were endothelial cells exclusively, we conclude an unexpectedly limited role of EndMT during CCl₄ induced liver fibrogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
—年度	—	—	—
—年度	—	—	—
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝硬変、肝線維化、類洞内皮細胞、EndMT

1. 研究開始当初の背景

肝線維化において、肝星細胞 (HSC) が活性化し、筋線維芽細胞へ変容することや、抗 TGF- β 抗体や Rho-kinase inhibitor が、筋線維芽細胞を不活化し肝線維化が改善することが報告されており、肝星細胞が肝線維化の主要な役割を果たしていると考えられている。しかし筋線維芽細胞の起源は未だ完全には明らかにされていない。心臓の線維化には血管内皮細胞の線維芽細胞への変容 (EndMT : endothelial-to-mesenchymal transition) が関わっていることが証明され、このことは臓器線維症において EndMT が重要な働きを担っていることが示唆された。肝線維化における EndMT の報告はなく、肝線維化における類洞内皮細胞の形態・機能の変化および、それに伴う肝微小循環の変化の解明により、肝線維化に対する新たな治療法が開発される可能性がある。

2. 研究の目的

類洞内皮細胞を多く含む肝臓においても、EndMT が肝線維化の機序の一翼を担っているとの仮説を立てた。その仮説を動物実験により証明すると共に、肝硬変に対する新たな治療薬を開発する糸口を見つけ出すことを目的とする。

3. 研究の方法

<マウス>

本研究では、Tie2-Cre, CAG-CAT-GFPダブルトランスジェニックマウス (Tgマウス) を使用

した。これは内皮細胞由来の細胞 (血管新生時より Tie2 promotor を持つ) が、生涯にわたり GFP を高発現するマウスである。

<in vitro実験>

Tgマウスより内皮細胞を MACS によりセレクトし、TGF β 1 の負荷がある状態と無い状態で培養した。細胞の表現マーカーを免疫化学染色および real time RT-PCR にて評価した。

<in vivo実験>

本研究で使用した Tg マウスは血管内皮細胞に加え骨髄細胞にも GFP を高発現する細胞が存在することが判明した。そこでワイルドタイプのマウス骨髄細胞を Tg マウスに移植し、血管内皮細胞のみに GFP が高発現するモデル (BMT マウス) を新たに作成した。四塩化炭素を投与することによりマウス肝硬変モデルを作成し、GFP 陽性細胞の分布を免疫組織化学染色および FACS にて評価した。

4. 研究成果

<in vitro実験>

TGF β 1 を負荷した内皮細胞は、筋線維芽細胞様に形態が紡錘形へと変化した。免疫染色でも GFP に加え筋線維芽細胞に特有の α SMA を発現していた。RNA の発現を調べたところ、Collagen I の発現も増加していた。

<in vivo実験>

Tgマウスの肝硬変モデルは肝線維化に伴って GFP 陽性細胞が遊走されていたが、BMT マウスの肝硬変モデルは肝線維化部位に GFP 陽性細胞をほとんど認めなかった。肝臓をホモジナ

イズし、付着細胞をFACSにて検討したところ、GFP陽性細胞はほとんどがCD31を発現しており、その分布はほぼ変化がなかった。

<結論>

マウス肝類洞内皮細胞はEndMTを誘導する能力を兼ね備えていると考えられたが、マウス肝硬変モデルにおいてEndMTは肝線維化にほぼ関与していなかった。

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 9 件)

- ① Tomikawa M, Akahoshi T, Kinjo N, Uehara H, Hashimoto N, Nagao Y, Kamori M, Kumashiro R, Maehara Y, Hashizume M. Rigid and flexible endoscopic rendezvous in spatium peritonealis may be an effective tactic for laparoscopic megasplenectomy: significant implications for pure natural orifice transluminal, endoscopic surgery. Surg Endosc, 査読有、26(12)、2012、3573-9
- ② Tomikawa M, Korenaga D, Akahoshi T, Kohshi K, Sugimachi K, Nagao Y, Tsutsumi N, Takenaka K, Kakeji Y, Hashizume M, Maehara Y. Quality of life after laparoscopy-assisted pylorus-preserving gastrectomy: an evaluation using a questionnaire mailed to the patients. Surg Today, 査読有、Jul;42(7)、2012、625-32
- ③ 富川 盛雅, 大内田 研宙, 家入 里志, 橋爪 誠, 【Robotic surgery の今】 肝・胆・膵・脾の robotic surgery、外科、 査読有、74 巻 8 号、2012、834-837
- ④ Hashizume M, Akahoshi T, Tomikawa M: Management of gastric varices. Journal of Gastroenterology and Hepatology 26(1)、査読有、2011、102-108,
- ⑤ Tomikawa M, Korenaga D, Akahoshi T, Konishi K, Sugimachi K, Ikeda Y, Takenaka K, Maehara Y, Trends in treatment outcomes for advanced colorectal cancer, an analysis at a single community hospital in Japan. Surg Today 41、査読有、2011、801-805,

[学会発表] (計 12 件)

- ① 富川 盛雅、長尾 吉泰、赤星 朋比古、橋爪 誠、 流体力学的解析を応用した門脈圧

推定の試み、第 19 回日本門脈圧亢進症学会総会、2012 年 09 月 07 日～08 日
東京

- ② 富川 盛雅、赤星 朋比古、橋本 直隆、長尾 吉泰、前原 喜彦、橋爪 誠、 門脈圧亢進症 肝性脳症に対するバルーン閉塞下逆行性経静脈的塞栓術とその治療成績の向上を目指した新たな工夫、第 48 回日本肝臓学会総会、2012 年 06 月 07 日～08 日、金沢
- ③ 富川 盛雅、赤星 朋比古、堤 敬文、長尾 吉泰、家守 雅大、神代 竜一、橋本 直隆、大内田 研宙、家入 里志、大平 猛、前原 喜彦、橋爪 誠 Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery を想定した脾摘術の意義と新しい先端医療機器開発への取り組み、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 04 月 12 日～14 日、千葉
- ④ 富川盛雅、長尾吉泰、植村宗則、吉田正樹、堀淳一、石井裕之、大内田研宙、赤星朋比古、家入里志、大平 猛、橋爪 誠、 単孔式鼠径ヘルニア修復術に対するドーム型立体映像表示システムの有用性、第 10 回日本ヘルニア学会学術集会、2012 年 04 月 27 日～28 日、名古屋
- ⑤ 富川 盛雅、植村 宗則、神代 竜一、大内田 研宙、家入 里志、石井 裕之、大平 猛、橋爪 誠、 内視鏡外科手術の効果的トレーニング法の開発と評価システムを導入したヘルニア修復術トレーニング、第 74 回日本臨床外科学会総会、2012 年 11 月 29 日～12 月 01 日、東京
- ⑥ 富川盛雅、赤星朋比古、是永大輔、竹中賢治、橋爪 誠、 感染のリスクを伴った肝硬変に合併する臍ヘルニアに対するメッシュ修復術の工夫、第 73 回日本臨床外科学会総会、2011 年 11 月 19 日、東京
- ⑦ Tomikawa M, Oda M, Uemura M, Nagao Y, Akahoshi T, Ieiri S, Mori K, Hashizume M, Clinical Application of Image-Based Simulation Systems for Surgery. The 7th Asian Conference on Computer Aided Surgery 2011 (ACCAS 2011), August 27, 2011, Bangkok, Thailand

[図書] (計 1 件)

長尾吉泰、富川盛雅、橋爪誠、 照林社、やさしくわかる内視鏡 検査・治療・ケア、2011、231 ページ

[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

富川 盛雅 (TOMIKAWA MORIMASA)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：60325454

(2) 研究分担者

赤星 朋比古 (AKAHOSHI TOMOHIKO)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：20336019

神代竜一 (KUMASHIRO RYUICHI)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：10631591

長尾 吉泰 (NAGAO YOSHIHIRO)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：70608968

(3) 連携研究者

なし