

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590991

研究課題名(和文) Notch/Jagged-1シグナルを介した肝線維化と肝再生との病態連繋の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological correlation between fibrogenesis and regeneration in murine liver via Notch/Jagged-1 signal

研究代表者

三上 健一郎(MIKAMI, KENICHIRO)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00375263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝線維化進展過程におけるNotchシグナルの関与を解明するため、メチオニン・コリン欠乏食(MCD食)による肝線維化モデルでのNotchシグナルの発現動態を解析した。経時的に肝組織を採取して、Notch(Notch-1, -2, -3, -4)とNotchリガンド(Jagged-1, -2)の発現についてImmunoblot法で解析した。その結果、普通飼料で飼養したマウスとMCD食で飼養したマウスでは、Notchシグナルの経時的な発現変化について有意な変化はみられなかった。今後、肝線維化過程におけるNotchシグナルの関与について、他の肝線維化モデルも含めて更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the involvement of Notch signal in the correlation between fibrogenesis and regeneration in the liver, expression of Notch signal was examined by methionine/choline-deficient diet (MCD) model of liver fibrosis. Mice were sacrificed at 2, 4, and 8 weeks after MCD diet started. Hepatic expression of Notch receptors and Notch ligands were investigated by immunoblot. There were no significant differences between MCD group and control group in the expression of Notch signal during the progression of liver fibrosis. In our preliminary data by using conditional Mx/Cre Jagged-1 knockout mice, it was speculated that Notch signal modulates the correlation between fibrogenesis and regeneration in liver fibrosis. However, in MCD model, Notch signal was not involved in hepatic fibrogenesis. By using other liver fibrosis models, further studies are necessary for the elucidation of the role of Notch signal in the fibrogenic process in the liver.

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：肝線維化 Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性肝疾患と肝発癌

わが国にはB型あるいはC型肝炎ウイルスの持続感染などによる約300万人の慢性肝炎と、約30万人の肝硬変患者が存在すると推定され、これらの慢性肝疾患を背景に年間約3万人が肝細胞癌で死亡している。肝細胞癌は、部位別で肺、胃、大腸について4番目に多い悪性新生物であり、特にC型肝炎患者では、年率約7~8%で高率に肝細胞癌を発症する。肝炎ウイルスによる末期肝硬変症例に対して抗ウイルス療法を行うことは困難であり、唯一の治療法である肝移植もドナー数の圧倒的な不足のために実施症例はごく限られているのが現状である。最近の感染対策や治療薬の進歩により、ウイルス性慢性肝疾患から発症するHCCは今後減少してくるものと推測される。しかしながら、近年では高齢化と欧米型の食生活により、メタボリック症候群(肥満、糖尿病、高血圧症、高脂血症)が増加し、非アルコール性脂肪性肝炎などを基礎疾患とした非B非C型肝炎からの肝発癌も増加傾向にある。そのため、肝発癌の高危険群である肝硬変での肝線維化進展機序を解明して有効な予防と治療法を確立するとともに、新規の肝再生促進治療法を開発することは、基礎的・臨床的に重要であるだけでなく、社会的にも急務であると考えられている。

(2) Notchシグナルと肝臓

Notchシグナルは、進化の過程で保存され、昆虫から哺乳類まで種を超えて共通する細胞増殖・分化調節を行っている。Notchシグナルの特徴は、細胞膜表面に存在する受容体が、隣接する細胞の細胞膜表面に発現するリガンドと接触することによってシグナル伝達が行われることである。Notchシグナルは、発生過程や成体における組織修復・再生に多様な影響を及ぼし、骨髄、毛髪、生殖細胞など様々な臓器においては幹細胞とその支持細胞との細胞間相互作用を介して幹細胞ニッチの構築と維持に深く関わっていることが知られている。

肝臓においてNotchシグナルは、胆管系の発生に重要な役割を演じており、小葉肝胆管の胆管形成障害や先天性心疾患を伴うAlagille症候群では、Notchリガンドの1つであるJagged-1の遺伝子変異が原因とされている。また臨床研究において、肝線維化の進行に伴ってNotchシグナルが変化することが報告されており、肝の線維化の病態形成にNotchシグナルが何らかの関与をしていることが推測される。肝の線維化過程において中心的役割を担っているのは星細胞であり、この星細胞が活性化することによりコラーゲンなどの細胞外マトリックスが産生され、肝臓に線維組織の蓄積を生じる。この星細胞は、肝での幹細胞ニッチの支持細胞として注目されていたが、分子生物学的機序については

不明であった。他臓器においては、支持細胞はNotchシグナルを介して幹細胞ニッチを形成・維持していることから、肝でも支持細胞と考えられている星細胞がNotchシグナルを介して幹細胞ニッチを維持していると考えられるが、肝疾患の病態形成におけるNotchシグナルの発現意義や、同シグナルを介した肝幹細胞ニッチへの関与については未だ不明である。

(3) 遺伝子改変マウスでの予備実験

肝でのNotchシグナルを解析するために、Notch受容体リガンドの1つであるJagged-1を遺伝子改変により欠損させたマウスで予備実験を行っていた。このJagged-1 conditional ノックアウト(Jagged-1 KO)マウスを用いた予備実験の結果では、Jagged-1遺伝子を胎生仔期(生後4日目)に欠損させると、不規則な胆管増生の他に、それらを取り囲むように星細胞が活性化していた。しかもこの病態は、成長したマウス(生後14日目)でJagged-1を欠損させた場合には、全く認められず正常の肝臓を示していた。これらの結果から、星細胞の活性化と肝幹前駆細胞の動態(発育と再生)には、Notch/Jagged-1シグナルを介して何らかの相互作用があると推測されていた。

これらの知見から、星細胞活性化を標的とする新たな肝線維化改善・肝再生促進治療法を確立するには、Notch/Jagged-1シグナルを介した星細胞と周囲細胞との細胞間相互作用、とりわけ同シグナルによる星細胞活性化と肝幹細胞ニッチ形成、さらに肝幹前駆細胞動態との関係を解明することが重要かつ必須であると考え、これらを検討することにした。

2. 研究の目的

以上の背景から、肝線維化の新規治療法確立のためには、線維化と再生を包括的に捉える必要があると考えた。そのため、肝線維化過程においてNotch/Jagged-1シグナルが果たす役割を検証し、細胞間相互作用を介した星細胞の新たな活性化機序、および星細胞活性化と肝幹細胞ニッチ形成との関係、さらには肝幹前駆細胞動態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Notchシグナルと星細胞の関係

肝発育過程と星細胞

Jagged-1 KOマウスによる予備実験の結果を肝線維化過程の研究に展開させるために、野生型(C57BL/6J)マウスでの肝発育過程における星細胞の活性化を検討した。具体的には、生後4日目と14日目の野生型マウスの肝において、星細胞活性化のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)の発現を免疫染色によって比較した。

肝再生と星細胞

野生型マウスと Jagged-1 KO マウスに部分 2/3 肝切除術を行い、再生刺激による星細胞の活性化を α -SMA の免疫染色により比較検討した。

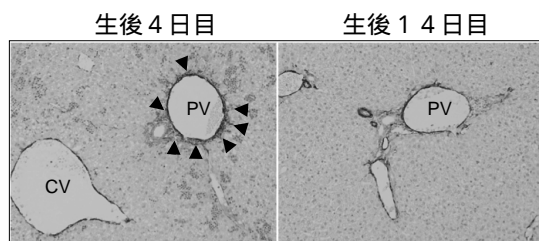
(2) 肝線維化過程での Notch シグナルの発現
6 週齢の雄性野生型 (C57BL/6J) マウスをメチオニン・コリン欠乏食 (MCD 食) で飼育することにより、脂肪肝と線維化をきたす肝線維化モデルを作成した。普通飼料で飼養したマウス (コントロール群) と MCD 食で飼養したマウス (MCD 群) において、2 週間後、4 週間後、8 週間後と経時的に肝組織を採取し、蛋白質を抽出して Notch を 4 種類 (Notch-1, -2, -3, -4) Notch リガンドを 2 種類 (Jagged-1, -2) の発現を Immunoblot 法で検討した。

4. 研究成果

(1) 研究で得られたデータ

肝発育過程と星細胞

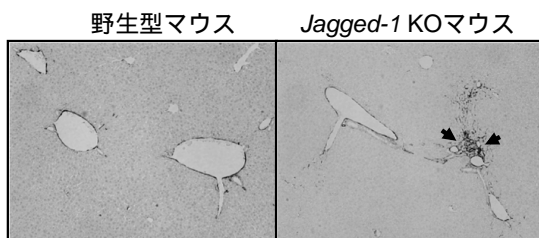
生後 4 日目のマウスの肝臓では、 α -SMA 陽性の活性化した星細胞が、門脈周囲を取り囲むように存在していたが、生後 14 日目では認められなかった。この研究データと予備実験の結果より、肝の発育過程において Notch/Jagged-1 シグナルと星細胞の関連が示唆される。



PV: 門脈, CV: 中心静脈

肝再生と星細胞

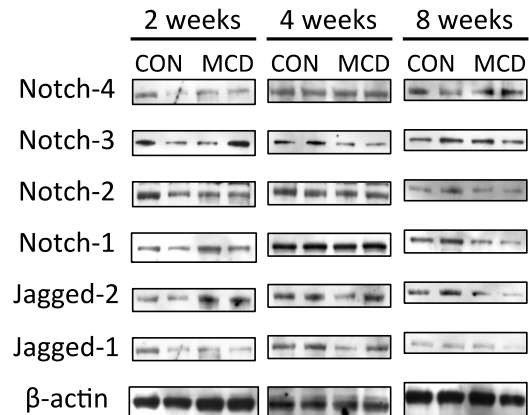
Jagged-1 KO マウスでは、2/3 肝部分切除術により星細胞の活性化が認められた。一方、野生型マウスでは、星細胞の活性化はみられなかった。この結果は、Notch/Jagged-1 シグナルが、肝の再生と線維化の両者に同時に関与することを示唆している。



Alpha-SMA染色

肝線維化過程での Notch シグナルの発現
MCD 群では、経時的に肝の脂肪化と線維化が進行していた。飼養開始 2 週後、4 週後、8 週後いずれの時期においても、MCD 群とコ

ントロール群では、Notch (Notch-1, -2, -3, -4) および Notch リガンド (Jagged-1, -2) の蛋白発現に有意な変化は認められなかった。



結果のまとめ

肝発育と肝再生には Notch/Jagged-1 シグナルを介して、肝線維化の中心的役割を果たしている星細胞の活性化が関与していることが示唆された。しかしながら、MCD モデルによる肝線維化では Notch シグナルの発現に変化がみられなかった。

(2) 得られた成果の位置づけ

我々の予備実験の結果、及びこれまでの臨床研究の報告より、肝線維化進展過程においては Notch シグナルが病態形成に関与していることが推測されていたが、今回の MCD モデルでは Notch シグナルの関与が明らかではなかった。今回検討を行った MCD モデルは、脂肪肝を伴って肝線維化を生じるモデルであり、非アルコール性脂肪性肝炎の病態に類似して汎用されている動物モデルである。臨床的に慢性肝炎や肝硬変の最も多い原因は、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスなどの肝炎ウイルスによるものであるが、新規の治療薬等により今後はウイルス性の慢性肝疾患は減少してくると考えられている。今後は生活の欧米化に伴い、慢性肝炎、肝硬変の原因として非アルコール性脂肪性肝炎が増加すると推定されていることから、本研究においては非アルコール性脂肪性肝炎の動物モデルである MCD モデルでの検討を行った。しかしながら、今回の結果からは臨床でのアルコール性脂肪性肝炎の病態と MCD モデルの病態では、Notch シグナルに関して検討してみると異なった病態である可能性が考えられた。

(3) 今後の展望

これまでの臨床報告では肝線維化過程に伴って Notch シグナルの発現が変化していることは明らかであり、Notch シグナルは肝線維化過程の病態形成に何らかの形で関与していることが示唆される。Notch シグナルは様々の臓器において、幹細胞ニッチの構築・維持に関与していることから、肝でも肝幹前

駆細胞のニッチ形成への役割が解明されることにより、線維化と再生を包括的に捉えた新たな抗線維化治療や肝再生治療の研究基盤の構築に貢献できる可能性がある。そこで今回の研究成果をふまえて、今後は肝線維化過程における Notch シグナルの関与について、他の肝線維化モデルも含めて更なる検討が必要と考えられた。

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)

[学会発表](計2件)

1. 三上健一郎、東山礼一、稲垣 豊 . 肝線維化と肝再生の病態連繋における Notch/Jagged-1 シグナルの関与 . 第 47 回日本肝臓学会総会、2011 年 6 月 3 日、東京 .
2. Kenichiro Mikami, Sachie Nakao, Reiichi Higashiyama, Hiroshi Fukumitsu, Tadashi Moro, Kaori Minakawa, Katsuto Hozumi, Isao Okazaki, Shinsaku Fukuda, Yutaka Inagaki. Notch/Jagged-1 signal modulates pathophysiological correlation between fibrogenesis and regeneration in murine liver. The 62nd Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Disease. November 7, 2011, San Francisco, USA.

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 健一郎 (KENICHIRO MIKAMI)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00375263

(2)研究分担者(平成25年6月20日削除)

稲垣 豊 (YUTAKA INAGAKI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：80193548

(3)連携研究者

穂積勝人 (Katsuo Hozumi)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30246079