

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658265

研究課題名(和文)線維化の増悪に係る「上皮-間葉転換」の形成機序の解明と病理学的・臨床学的意義

研究課題名(英文)Pathogenesis of epithelial-mesenchymal transition relating to progressing fibrosis and its clinical significance

研究代表者

山手 丈至(YAMATE, Jyoji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：50150115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：上皮-間葉転換(EMT)は、傷害された上皮細胞が筋線維芽細胞に転換する現象で、線維化の増悪に係る。尿細管、胆管、毛嚢について、それぞれ腎線維化、胆管線維化、皮膚線維化のラットモデルを作製し、解析した。不完全再生尿細管は筋線維芽細胞の特性を獲得し、このEMTは、PGE2やNGALにより抑制され、オステオポンチンにより促進された。後腎芽体には筋線維芽細胞の特徴があり、よって尿細管のEMTは後腎芽体への遡及現象として捉えられる。胆管線維化での胆管と皮膚線維化での毛嚢では、EMTは認めなかった。筋線維芽細胞は未分化幹細胞に由来する可能性が示された。EMT理論の構築と難治性線維化の治療法の開発に資する。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a phenomenon in which injured epithelia acquire myofibroblastic properties, leading to progressive fibrosis. EMT was analyzed in renal epithelia, bile duct epithelia and follicular epithelia in renal fibrosis, peribiliary fibrosis and cutaneous fibrosis, respectively. The acquisition of myofibroblastic properties of incomplete renal regeneration in renal fibrosis was demonstrated; this EMT was inhibited by PGE2 and NGAL, but promoted by osteopontin. Since nephric blastema showed myofibroblastic properties, suggesting that renal EMT is a retroactive phenomenon towards renal blastema. Evident EMT was not shown in the bile duct epithelia in peribiliary fibrosis or follicular epithelia in cutaneous fibrosis. Myofibroblasts may be derived from the mesenchymal stem cells such as pericytes and bone-marrow stem cells. The present study gives a novel concept (EMT theory), which would open clues of possible therapies for intractable fibrosis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：上皮-間葉転換 線維化 尿細管上皮 胆管上皮 毛嚢上皮 体性幹細胞

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

「上皮-間葉転換」(EMT)は、傷害後の再生尿細管上皮が筋線維芽細胞に転換することで腎線維化の増悪に関わる現象として見出された。しかし、尿細管上皮にみられる EMT の病理学的な意義、さらには、尿細管上皮に加え、肝線維化(胆管周囲線維化)での胆管上皮や創傷治癒後の皮膚線維化での毛嚢上皮にも EMT が生じると考えられるが、その特性については十分には解明されていない。EMT は、上皮細胞が膠原線維を産生する筋線維芽細胞へと転換することから、EMT の形成機序を解明し、その起源細胞を同定することは、臨床学的に EMT に起因する病的線維化(萎縮腎、胆管線維症、難治性皮膚肉芽組織など)のユニークな治療法・改善法の開発に繋がると考える。また、従前の病理学では、上皮細胞が間葉系細胞に変わることは否定されていたことから、この研究の遂行は、既存の学説を打破する新たな生命現象を提起すると考えている。本研究の遂行は、難治性線維化の治療法の開発にも資する。

### 2. 研究の目的

難治性線維化(萎縮腎、肝硬変/胆管周囲線維症、皮膚の肉芽組織など)は進行すると組織の機能障害を導く。異常分化現象「上皮-間葉転換(EMT)」は筋線維芽細胞を誘導し、線維化の増悪に係る。しかし、その病理発生機序と臨床学的意義の全貌は解明されていない。本研究では、肝、腎、皮膚のラット線維化モデルを作出し、EMT の形成機序を病理学的に解明するとともに、EMT は上皮の遡及現象と捉えていることから、幹細胞マーカーを用いてその起源細胞を体性幹細胞の観点から追究する。

### 3. 研究の方法

上皮-間葉転換(EMT)の発生機序と臨床学的意義を解明するために、以下の臓器毎に生じる線維化の EMT を、筋線維芽細胞の特徴である細胞骨格の発現と上皮細胞マーカーを指標に、主に免疫組織化学的・分子病理学的手法を用いて解析する。

3-1. 腎線維化: 腎毒性を有するシスプラチンをラットに投与することで腎線維化モデルを作出した。この研究では、筋線維芽細胞が有する細胞骨格(ビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -平滑筋アクチン)、Thy-1、カルボニンの発現に加え、細胞代謝・活性化物質(PGE<sub>2</sub>、

オステオポンチン、NGAL など)の関与についても *in vivo* と *in vitro* で解析を加えた。

3-2. 肝硬変と胆管周囲線維化: ラットにチオアセトアミドあるいは  $\alpha$ -Naphthylisothiocyanate を投与し、それぞれ肝硬変での偽胆管形成とグリソン鞘における胆管周囲線維化の病態を作出し、EMT に焦点を置いて解析した。この解析では、筋線維芽細胞に変換する肝星細胞に発現する GFAP と幹細胞が有するネスチンの発現に焦点を置いた。

3-3. 皮膚線維化: ラットに皮膚パンチ創傷、あるいはプレオマイシン投与による皮膚硬化症モデルを作製し、毛包の病態を EMT の観点から解析した。

### 4. 研究成果

(1) 腎線維化における尿細管上皮の EMT 現象の解析

1-1. 細胞骨格発現を指標にした EMT 解析: 筋線維芽細胞は、ビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -平滑筋アクチンなどの様々な細胞骨格を発現する。特に、 $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現は、高度に分化した筋線維芽細胞の重要なマーカーと考えている。そこで、シスプラチン誘発ラット腎線維化病変に生じる傷害尿細管上皮におけるこれらの細胞骨格の発現を解析した。その結果、傷害後の再生尿細管は、ビメンチンを発現したが、デスミンと  $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現はみられなかった。ビメンチンのみを発現する尿細管上皮は、再生過程にある上皮で、EMT 現象とは必ずしも捉えられないとされる。そこで、高度な線維化部位における不規則な形態を示す異常な尿細管でより詳細に解析を行ったところ、尿細管上皮の一部に  $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現がみられた。このような尿細管は、大小のサイズで著しく拡張した腔を有する特徴や、あるいは基底膜が著しく肥厚し萎縮する特徴があった。このような異常な尿細管を内張りする上皮は小型立方状あるいは扁平状で、異常な再生過程にある尿細管と考えられた。このような不完全再生の尿細管上皮に EMT が生じる可能性が示された。

1-2. 尿細管上皮由来培養細胞での EMT 解析:

ラット尿細管上皮細胞株 NRK-52E と豚尿細管上皮細胞株 LLC-PK1 を用い、線維原性因子である TGF- $\beta$ 1 に対する影響を筋線維芽細胞に

特徴的な細胞骨格である  $\alpha$ -平滑筋アクチンを指標に検討した。その結果、どちらの細胞株においても TGF- $\beta$ 1 の添加で  $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現が増加した。さらに、NRK-52E においては上皮細胞の特性であるカドヘリンの発現が低下した。また、LLC-PK1 では、TGF- $\beta$ 1 と PDGF-BB の同時添加で、 $\alpha$ -平滑筋アクチン発現が相乗的に増加した。In vitro での尿管上皮の EMT 現象が確認された。

1 - 3 .Thy-1 発現を指標にした EMT の解析：近年、線維化との関連でThy-1の役割が注目されている。すなわち、Thy-1を発現する既存の線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化するとされる。Thy-1は、また未熟な間葉系細胞にも発現することから、そこで、ラット腎発生過程におけるThy-1発現細胞の動態を解析した。その結果、後腎芽体由来の未熟な間葉系細胞はThy-1を発現し、このThy-1発現細胞の多くはビメンチンを共発現し、さらに一部の細胞は  $\alpha$ -平滑筋アクチンも共発現していることが分かった。シスプラチン誘発腎線維化における筋線維芽細胞には、Thy-1、ビメンチン、 $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現がみられることから、後腎芽体由来の未熟な間葉系細胞には筋線維芽細胞と類似の性格があることが示された。後腎芽体細胞は、発生過程で尿管上皮と間質細胞に分化することから、腎線維化部位における筋線維芽細胞は、「尿管上皮の傷害不完全再生 後腎芽体間葉系細胞へと脱分化（未熟化）  $\alpha$ -平滑筋アクチン発現の間質細胞」の過程を辿る一種の遡及現象と考えられた。また、この実験では、腎線維化部位のThy-1発現の筋線維芽細胞は、形成初期の未熟型で、一方、  $\alpha$ -平滑筋アクチンを発現する筋線維芽細胞は高分化型と考えられる成果を得た。

1 - 4 .カルポニン発現を指標にしたEMTの解析：

$\alpha$ -平滑筋アクチンを発現する一部の細胞にカルポニンの発現がみられ、かつ異常な再生過程にある尿管の内張り細胞にもカルポニンが発現していた。カルポニンを指標にEMT現象が観察された。

1 - 5 .PGE<sub>2</sub>とPGE<sub>2</sub>の産生に関与する酵素とレセプターとEMTとの係わり：

シスプラチン誘発腎線維化において、病変部位で COX-1 の発現上昇と、microsomal PGES-1 (mPGES-1) の発現増加、さらに PGE<sub>2</sub> レセプターのうち特に EP4 が増加することが分かった。すなわち、腎線維化部位において、COX-1

を介した PGE<sub>2</sub> の産生と、PGE<sub>2</sub> の EP4 を介した作用が存在することが示された。また、ラット尿管上皮細胞株 (NRK-52E) に PGE<sub>2</sub> あるいは EP4 アゴニスト (11-deoxy-PGE<sub>1</sub>) を添加するとアポトーシスと EMT 現象が抑制された。以上より、産生された PGE<sub>2</sub> は EP4 を介してアポトーシスの抑制による細胞の保護と EMT による線維化の抑制をもたらすことが示された。

1 - 6 .好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL) とオステオポンチンの EMT への係わり：

シスプラチン誘発腎線維化病変における NGAL とオステオポンチンの発現を解析した。その結果、NGAL 発現は、良好に再生しつつある尿管上皮に認められ、一方、オステオポンチンの発現は、拡張あるいは萎縮など異常な形態を示す尿管上皮にみられた。さらに、オステオポンチンの発現は線維化の進行と関連する TGF- $\beta$ 1 や筋線維芽細胞数と正の相関を示した。また、ラット尿管上皮細胞株 NRK-52E に TGF- $\beta$ 1 を添加すると、EMT 現象下で、NGAL の発現が低下し、オステオポンチンの発現が増加した。すなわち、NGAL は、良好な尿管の再生に、一方、オステオポンチンは EMT による線維化の形成に関与することが示された。

(2) 胆管周囲線維化における胆管上皮の EMT 現象の解析

グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) は通常は脳のアストロサイトに発現する細胞骨格であるが、近年、肝星細胞にも発現することが見出された。また、肝線維化では、肝星細胞が筋線維芽細胞に変換することが知られている。そこで、GFAP 発現を指標として胆管上皮の EMT 現象を解析した。

ラットにチオアセトアミド (TAA) を連日投与することで、肝硬変モデルを作製し、形成される偽胆管の特徴を、GFAP 発現細胞との関連で、EMT の観点から解析した。その結果、正常な肝組織には GFAP 陽性の肝星細胞が存在し、線維化の進行に伴い偽小葉の周囲の線維架橋部位に、多くの GFAP 陽性細胞が出現することが分かった。その部位における GFAP 陽性細胞は、ビメンチン、デスミン、 $\alpha$ -平滑筋アクチンを共発現したことから、GFAP 陽性の肝星細胞が筋線維芽細胞に変換することが示された。一方、偽胆管上皮は、胆管上皮に特異的なサイトケラチン CK19 を発現し、

さらに一部は GFAP 陽性を示した。この現象は EMT の可能性を示唆するが、しかし、正常な胆管上皮においても GFAP 陽性所見がみられること、また  $\alpha$ -平滑筋アクチンを発現する胆管上皮細胞はみられなかったことから、GFAP と CK19 共陽性の偽胆管上皮の反応は、EMT 現象とは捉えることはできないと判断した。

また、 $\alpha$ -Naphthylisothiocyanate による胆管周囲線維化における小葉間胆管上皮の細胞骨格の変化を観察したが、上皮にはビメンチンの発現はみられたが、 $\alpha$ -平滑筋アクチンの発現はみられなかった。胆管上皮での明らかな EMT 現象は掴めなかった。興味ある所見として、胆管周囲線維化での再生胆管上皮の一部と周囲の筋線維芽細胞にネスチンの発現がみられた。ネスチンは未分化細胞を認識することから、ネスチンの発現を指標とした EMT 解析（未分化細胞の上皮と筋線維芽細胞への双方への分化の可能性）を今後検討する必要がある。また、胆管周囲線維化では、一部の筋線維芽細胞は幹細胞の特徴を示すことが分かった。

### （3）皮膚線維化部位における毛包上皮の EMT 現象の解析

皮膚の創傷時の線維化において毛包上皮が EMT 現象により筋線維芽細胞に変化する可能性がある。そこで、パンチ創傷を作製し、その後形成される皮膚の線維化部位における毛包の変化を観察した。その結果、毛根周囲の毛包鞘細胞から  $\alpha$ -平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞が形成されている現象を掴まえることができた。この細胞は、コラーゲン IV の基底膜で分断される毛包鞘細胞のビメンチン陽性の間葉系細胞で、毛根上皮細胞とは異なった。すなわち、毛包上皮の明らかな EMT 現象は掴まえることができなかった。

### （4）腎線維化、胆管周囲線維化、毛包周囲皮膚線維化での筋線維芽細胞の起源に関する解析

筋線維芽細胞は、未分化間葉系細胞（血管周皮細胞や骨髄幹細胞など）に由来することが幹細胞マーカーを用いた解析で示された。

**謝辞：**この研究成果は、学位取得を目指した大学院生や、卒業研究として携わった学部学生によるところが多く、興味を抱きこの研究に携わってきた学生諸子に心より感謝いたします。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Yuasa, T., Yano, R., Izawa, T., Kuwamura, M., Yamate, J. 2014. Calponin expression in renal tubulointerstitial fibrosis induced in rats by cisplatin. *J Toxicol Pathol*, 27: 97-103. doi: 10.1293/tox.2013-0048. 査読有.
2. Tennakoon, A.H., Izawa, T., Wijesundera, K.K., Golbar, H.M., Tanaka, M., Ichikawa, C., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Exp Toxicol Pathol*, 65: 1159-1171. 査読有. doi: 10.1016/j.etp.2013.05.008.
3. Golbar, H.M., Izawa, T., Ichikawa, C., Tanaka, M., Juniantito, V., Sawamoto, O., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Slowly progressive cholangiofibrosis induced in rats by alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT), with particular references to characteristics of macrophages and myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol*, 65: 825-835. 査読有. doi: 10.1016/j.etp.2012.12.001.
4. Yuasa, T., Juniantito, V., Ichikawa, C., Yano, R., Izawa, T., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Thy-1 expression, a possible marker of early myofibroblast development, in renal tubulointerstitial fibrosis induced in rats by cisplatin. *Exp Toxicol Pathol*, 65: 651-659. doi: 10.1016/j.etp.2012.07.005. 査読有.
5. Juniantito, V., Izawa, T., Yuasa, T., Ichikawa, C., Tanaka, M., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Immunophenotypical analysis of myofibroblasts and mesenchymal cells in the bleomycin-induced rat scleroderma, with particular reference to their origin. *Exp Toxicol Pathol*, 65: 567-577. doi: 10.1016/j.etp.2012.05.002. 査読有.
6. Hori, M., Juniantito, V., Izawa, T., Ichikawa, C., Tanaka, M., Tanaka, K., Takenaka, S., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Distribution of cells labelled by a novel somatic stem cell-recognizing antibody (A3) in pulmonary genesis and bleomycin

- induced pulmonary fibrosis in rats. *J Comp Pathol*, 148: 385-395. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.09.003. 査読有.
7. Ichikawa, C., Izawa, T., Juniantito, V., Tanaka, M., Hori, M., Tanaka, K., Takenaka, S., Kuwamura, M., Yamate, J. 2013. Rat hair follicle-constituting cells labeled by a newly-developed somatic stem cell-recognizing antibody: a possible marker of hair follicle development. *Histol Histopathol*, 28: 257-268. 査読有.
  8. Yamamoto, E., Izawa, T., Sawamoto, O., Juniantito, V., Kuwamura, M., Yamate, J. 2012. Amelioration of cisplatin-induced rat renal lesions by a cyclooxygenase (COX)-2 selective inhibitor. *Exp Toxicol Pathol*, 64: 625-631. doi: 10.1016/j.etp.2010.12.005. 査読有.
  9. Juniantito, V., Izawa, T., Yuasa, T., Ichikawa, C., Yamamoto, E., Kuwamura, M., Yamate, J. 2012. Immunophenotypical analyses of myofibroblasts in rat excisional wound healing: possible transdifferentiation of blood vessel pericytes and perifollicular dermal sheath cells into myofibroblasts. *Histol Histopathol*, 27: 515-527. 査読有.
  10. Golbar, H.M., Izawa, T., Murai, F., Kuwamura, M., Yamate, J. 2012. Immunohistochemical analyses of the kinetics and distribution of macrophages, hepatic stellate cells and bile duct epithelia in the developing rat liver. *Exp Toxicol Pathol*, 64: 1-8. doi: 10.1016/j.etp.2010.05.011. 査読有.

〔学会発表〕(計 13 件)

国際学会：

1. Immunohistochemical detection of macrophages and myofibroblasts in rat model of bleomycin-induced scleroderma. Juniantito V, Ichikawa C, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. The Joint Meeting of the 5th Conference and Congress of Asian Society of Veterinary Pathology (ASVP) 2011 and the 10th Scientific Symposium of Indonesia Society of Veterinary Pathology (ISVP) 2011. Bogor, Indonesia, Nov, 22-23. 2011.

国内学会：

1. ラット発生過程の腓とイヌの線維化腓における腓星細胞と筋線維芽細胞の免疫組

- 織学的特性解析．橋本 愛，井澤武史，田中美有，Golbar HM，Wijesundera K，桑村 充，山手丈至．第 30 回日本毒性病理学会学術集会，徳島 2014 年 1 月 30-31 日．
2. 正常肝と肝硬変ラットにおける上皮-間葉転換の観点からの肝星細胞の特徴解析．Tennakoon A，井澤武史，Wijesundera K，Golbar HM，田中美有，桑村 充，山手丈至．第 30 回日本毒性病理学会学術集会，徳島．2014 年 1 月 30-31 日．
  3. Characterization of GFAP-expressing hepatic stellate cells (HSCs) and myofibroblasts (MFs) in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. Tennakoon A，井澤武史，Wijesundera K，村上 宙，Golbar HM，田中美有，市川智彩，桑村 充，山手丈至．第 155 回日本獣医学会学術集会，東京．2013 年 3 月 28-30 日．
  4.  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) により誘発したラットの急性と慢性胆管病変におけるマクロファージと筋線維芽細胞の特性比較．Golbar HM，井澤武史，市川智彩，田中美有，桑村 充，山手丈至．第 29 回日本毒性病理学会学術集会，つくば．2013 年 1 月 31 日-2 月 1 日．
  5. ラット体性幹細胞標識抗体 A3 が認識する毛発生過程における上皮細胞の特性解明．市川智彩，井澤武史，田中勝啓，竹中重雄，桑村 充，山手丈至．第 154 回日本獣医学会学術集会，盛岡．2012 年 9 月 14-16 日．
  6. シスプラチン誘発ラット腎間質線維化におけるカルボニンの発現と筋線維芽細胞との関連．湯浅隆弘，井澤武史，桑村 充，山手丈至．第 28 回日本毒性病理学会学術集会，東京．2012 年 2 月 2-3 日．
  7. Nestin expression in  $\alpha$ -naphthylisocyanate (ANIT)-induced acute bile duct injury lesions in rats. Golbar HM，井澤武史，市川智彩，田中美有，桑村 充，山手丈至．第 152 回日本獣医学会学術集会，堺．2011 年 9 月 19-21 日．
  8. Involvement of macrophages and myofibroblasts in chronic alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT)-induced peribiliary fibrosis in rat model．Golbar HM，井澤武史，矢野遼，澤本修，桑村 充，山手丈至．第 27 回日本毒性病理学会学術集会，大阪．2011 年 1 月 30-31 日．
  9. シスプラチン誘発ラット腎傷害における内因性 PGE<sub>2</sub> の影響．山本絵美，増野功一，藤澤可恵，土屋紀子，松嶋周一，高須伸夫，鳥井幹則，井澤武史，Juniantito

(3)連携研究者 なし

- V, 桑村 充, 杉浦喜久弥, 竹内正吉, 山手丈至. 第 27 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪. 2011 年 1 月 30-31 日.
10. ラット腎間質線維化における Thy-1 免疫陽性細胞の動態, 特に筋線維芽細胞との関連について. 湯浅隆弘, 井澤武史, 桑村 充, 山手丈至. 第 27 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪. 2011 年 1 月 30-31 日.
11. Comparisons of properties of macrophages and myofibroblasts between two different cutaneous fibrosis rat models. Juniantito V, 井澤武史, 矢野遼, 桑村 充, 山手丈至. 第 27 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪. 2011 年 1 月 30-31 日.

招待講演

1. Mechanisms of cutaneous wound healing, based on functional properties of macrophages and myofibroblasts. Yamate J. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 東京. 2012 年 3 月 29 日.

〔図書〕(計 1 件)

教科書: 動物病理学総論(第 3 版) 第 5 章: 細胞の増殖と分化およびその異常 6. 線維化、瘢痕形成. 日本獣医学会編(分担執筆: 山手丈至) 2013 年 pp.88-90. 文永堂.

〔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

山手 丈至 (YAMATE, Jyoji)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授  
研究者番号: 50150115

### (2)研究分担者

桑村 充 (KUWAMURA, Mitsuru)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号: 20244668

竹中 重雄 (TAKANAKA, Shigeo)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授  
研究者番号: 10280067

井澤 武史 (IZAWA, Takeshi)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
研究者番号: 20580369