

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461011

研究課題名(和文)血管微小環境を介した肝類洞リモデリング制御機構の解明と肝再生治療への応用

研究課題名(英文) Mechanism of liver regeneration in regulation of sinusoidal remodeling through vascular nich

研究代表者

北村 庸雄 (Kitamura, Tsuneo)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：20231285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は再生能が旺盛な臓器として知られ、ラットの肝臓を3分の2切除しても1週間程で元の重量に戻る事が知られている。この再生の主体は、肝機能の中心を担う肝実質細胞の増殖・分裂によるものであるが、このとき同時に血液の流れが伴わないと肝実質細胞は生存し機能することが出来ない。本研究では、血流の維持に不可欠な肝類洞(血液の通り道)の再構築がどのようにして起こるのかを肝微小循環の視点から検討し、その結果肝再生の過程においては肝類洞内皮細胞の増殖・遊走が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Liver has been well known to regenerate in response to injury as shown in two-thirds hepatectomy in rodents. It should be noted that regeneration following liver resection reflects compensative hyperplasia of cells, which is virtually proliferation and differentiation of hepatocytes. In this process, sinusoidal remodelling is important, because hepatocyte function cannot be maintained without blood flow that is formed by sinusoidal endothelial cells. In the present study, proliferation and migration of sinusoidal endothelial cells have been suggested to be crucial in liver regeneration.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝再生 肝類洞リモデリング 肝類洞再構築 肝類洞内皮細胞 スフィンゴシン-1-リン酸

1. 研究開始当初の背景

肝再生の研究は従来肝実質細胞の増殖を中心に進められてきたが、vascular biologyの進歩にともない、肝類洞内皮細胞 (Liver Sinusoidal Endothelial Cell: LSEC) の担う役割が新たに注目されつつある。すなわち、肝細胞の増殖には肝類洞内皮細胞の増殖・分化による類洞の再構築が必要であり、その機能制御を明らかにすることで肝再生不全の治療にも新たな展開が期待できるものと思われる。

一方、肝類洞は内皮細胞のみならず、pericyte (周皮細胞) として肝類洞内皮細胞に接して存在する星細胞、resident macrophage として機能する Kupffer 細胞、肝実質細胞としての肝細胞など種々の細胞から構成されている。その為、近年急速な進歩を遂げている幹細胞研究により各々の肝構成細胞を人工的に作成出来たとしても、それらの fine tuning を担う血管微小環境 (vascular niche) の役割を明らかにすることは、今後一層重要な課題と成り得るものと考えられる。

近年、血管内皮細胞の機能調節にスフィンゴリン脂質が重要な役割を果たしていることが明らかになり、特に sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor の発見を機に、分子血管細胞生物学は飛躍的に進歩している。しかし、S1P の肝類洞内皮細胞における役割については報告がなく、肝類洞内皮細胞機能制御と血管微小環境、肝再生を繋ぐ新しい分子として、治療にも新たな展開を期待することが可能と思われる。

2. 研究の目的

肝類洞内皮細胞の増殖・遊走能には血管微小環境 (vascular niche) が重要な役割を担っていることが示唆され、この制御機構を明らかにすることは肝再生を考える上で極めて有用と考えられる。本研究の目的は、肝の再生機構をスフィンゴリン脂質による肝類洞内皮細胞機能制御という新たな視点から分子薬理的に解析し、肝再生不全機構を明らかにすることで治療への応用に資することにある。

3. 研究の方法

(1) 初代培養肝類洞内皮細胞を用いた *in vitro* での検討:

初代培養肝類洞内皮細胞は Wistar 系雌性ラット肝をコラゲナーゼで灌流後 two-step Percoll gradient 法により分離した。細胞は EBM-2 培養液中にて 37°C で培養し実験に供した。

ラット F4/80 モノクローナル抗体およびデスミン抗体を用いた免疫染色により、それぞれ Kupffer 細胞、肝星細胞を同定し、肝類洞内皮細胞は SE-1 抗体を用いた免疫染色により確認した。Myosin light chain kinase (MLCK) 活性は anti-phospho-(Ser)19 MLC2 で MLC2 のリン酸化を解析することで検討した。線維状ア

クチン (F-actin) の形成は Alexa-594 phalloidin 抗体を用いて解析を行なった。細胞間ギャップジャンクションの発現は、connexin 32 抗体を用いた免疫染色により行なった。

細胞の DNA 合成能は BrdU labeling index により、アポトーシスの誘導は TUNEL 法により検討した。細胞内 Ca^{2+} 濃度は、膜透過型蛍光指示薬である fura-2/AM で細胞をそれぞれ前処置後、画像解析装置により単一細胞レベルで解析した。

肝類洞内皮細胞における S1P receptors (S1P₁₋₃) の発現は real-time PCR により解析した。

肝類洞内皮細胞の遊走能の解析は cell transwell migration assay により行なった。

肝類洞内皮細胞の fenestrae (有窓) は走査型電子顕微鏡により観察し、その定量的解析は ImageJ software により行なった。

(2) ラット部分肝切除後モデルを用いた *in vitro* および *in vivo* での検討:

3分の2肝切除 (PHx) を行なったラットより肝類洞内皮細胞 (PHx-LSEC) を分離し、コントロール (sham operation) のラットより分離した肝類洞内皮細胞 (Sham-LSEC) との比較を行なった。

一方、*in vivo* の実験として、部分肝切除後早期 (肝切除 24 時間後) および肝切除後晚期 (肝切除 72 時間後) のラットを作製し、sphingosine kinase 1 阻害剤の投与による肝再生の評価を肝重量および肝組織における細胞増殖能により検討した。

4. 研究成果

(1) S1P による肝類洞内皮細胞の遊走能の解析:

正常ラットより分離した肝類洞内皮細胞は培養 2 日後には遊走能を有するようになり、S1P の添加により遊走能はその濃度依存性に増加を示した。

real-time PCR により、分離した肝類洞内皮細胞の S1P receptor (S1P₁₋₃) を解析した結果、S1P₁ の発現が有意に亢進していることが明らかとなった。実際、cell transwell migration assay により観察した肝類洞内皮細胞の遊走能は S1P₂ の阻害剤 (JTE-013) の添加により変化がみられなかったのに対し、S1P_{1/3} の阻害剤 (VPC23019) によって減少したことから、S1P による肝類洞内皮細胞の遊走促進能は S1P₁ を介したものと考えられた。

(2) S1P による肝類洞内皮細胞の遊走メカニズムの解析:

画像解析装置を用いて単一細胞レベルでの細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定を行なった結果、S1P による刺激によって細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇が観察されたが、この現象は S1P_{1/3} の阻害剤 (VPC23019) により阻害された。

一方、cell transwell migration assay を用いた細胞遊走能の検討では、calmodulin 阻害剤 (trifluoperazine) による前処置に

より遊走能は有意に低下し、Rho-kinase 阻害剤 (Y-27632) および MLCK 阻害剤 (ML-7) でも同様の遊走能抑制効果が認められた。

さらに、肝類洞内皮細胞を S1P で前処置することにより、免疫染色で MLC2 のリン酸化と F-actin の形成が認められた。

以上より、S1P による肝類洞内皮細胞の遊走能亢進は、S1P receptor 1 (S1P₁) の刺激による細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇が Ca²⁺-calmodulin complex を介して MLCK を活性化し、actin-myosin の連関収縮が惹起された結果である可能性が示唆された。

尚、内皮細胞は一般に nitric oxide synthase (NOS) により nitric oxide (NO) を産生することが知られているが、NOS 阻害剤 (L-NAME) による前処置では S1P 刺激による肝類洞内皮細胞の遊走能に変化はみられなかった。

(3) 部分肝切除後ラットより作製した肝類洞内皮細胞 (PHx-LSEC) と sham operation 後ラットより分離した肝類洞内皮細胞

(sham-LSEC) における形態学的・機能的比較:

sham-LSEC は培養 2～3 日後には紡錘状の湾曲した内皮細胞特有の形態を示すようになり、培養 5 日目には confluent となりその後自然に剥離した。この培養経過は正常ラットより作製した肝類洞内皮細胞とほぼ同様であった。一方、PHx-LSEC においては、培養 1 日目で既に紡錘状の湾曲した形態を示し、sham-LSEC ではみられることのない F-actin の形成が観察された。

さらに、cell transwell migration assay を用いた検討では、PHx-LSEC は sham-LSEC と比べ遊走能が亢進していることが明らかとなった。

S1P 産生に関わる sphingosine kinase の解析を PCR により行なった結果、PHx-LSEC では sham-LSEC と比べ sphingosine kinase 1 の発現が有意に亢進していたが、sphingosine kinase 2、S1P lyase および S1P₁₋₃ の発現に関しては PHx-LSEC と sham-LSEC の間で差異は認められなかった。

sphingosine kinase 1 の細胞遊走能に及ぼす影響を検討する為、その阻害剤である SKI-II を用いたところ、sham-LSEC では遊走は阻害されなかったのに対し PHx-LSEC では有意に遊走能が低下した。

以上の結果より、部分肝切除後の残存肝では sphingosine kinase 1 の発現亢進により S1P の産生が促進され、その結果肝類洞内皮細胞の遊走が増強している可能性が示唆された。

(4) 走査型電子顕微鏡による肝類洞内皮細胞の形態学的解析:

肝類洞内皮細胞には fenestrae (有窓) が存在することが特徴的であり、その形態学的変化と肝類洞内皮細胞の機能に関しては多くの報告がなされている。そこで部分肝切除後の肝類洞内皮細胞における fenestration

に変化がみられるかどうかを、PHx-LSEC と sham-LSEC とにおいて比較検討した。その結果、fenestrae の単位面積あたりの数は PHx-LSEC で増加していたが、fenestrae の径に関しては有意な差異は認められなかった。

一方、S1P 刺激により肝類洞内皮細胞の fenestrae に変化がみられるかどうかを検討したが、PHx-LSEC、sham-LSEC とともに影響は認められなかった。

以上の結果より、部分肝切除後の肝類洞内皮細胞の遊走能亢進は少なくとも fenestration の変化と直接関係するものではないことが示唆された。

(5) 部分肝切除後ラット肝組織における肝類洞の形態学的変化:

部分肝切除後ラットの肝組織が肝切除後の経時的変化にともないどのように変化するかを、肝類洞内皮細胞の特異的マーカーである SE-1 (CD32b 抗体) により免疫染色し観察した。その結果、部分肝切除 2～3 日後には残存肝に類洞のない肝実質細胞の塊 (cluster) がみられるようになり、その後その中に肝類洞内皮細胞が侵入していく様子が観察された。

(6) 部分肝切除後残存肝における肝実質細胞の増殖に及ぼす S1P および sphingosine kinase 阻害剤の影響:

部分肝切除後早期 (肝切除 24 時間後) および部分肝切除後晚期 (肝切除 72 時間後) においてラットの腹腔内に S1P を投与し、残存肝組織の肝実質細胞の DNA 合成能をそれぞれ検討した。その結果、部分肝切除後早期に S1P を投与した場合には、残存肝組織中の肝実質細胞増殖能に変化はみられなかったのに対し、部分肝切除後晚期に S1P を投与した場合には残存肝組織の肝実質細胞の DNA 合成能に有意な亢進が認められた。

この結果は、S1P 自体に肝実質細胞の増殖促進作用がないことを示すと同時に、肝類洞の再構築 (肝類洞内皮細胞の増殖) が生じる肝再生晚期に S1P が作用し、肝類洞再構築を促進することによって肝実質細胞の増殖に寄与している可能性を示すものと考えられた。

一方、部分肝切除後ラットにおいて内因性 S1P が肝類洞再構築に関与しているかを検討する為、部分肝切除後早期および晚期のラット腹腔内に sphingosine kinase 1 阻害剤を投与して、残存肝の重量および残存肝組織中の肝実質細胞増殖能の変化を観察した。その結果、部分肝切除後早期および晚期のいずれにおいて投与した場合でも残存肝重量に変化はみられなかったが、部分肝切除後晚期に sphingosine kinase 1 阻害剤を投与した場合には、投与しなかった場合に比べ残存肝組織の肝実質細胞の DNA 合成能に有意な低下が認められた。

以上の結果は、部分肝切除後肝再生の後期 (肝類洞再構築過程) における S1P の役割

を示唆するものと考えられた。

(7) 研究結果の考察と今後の展望:

肝再生は肝実質細胞の増殖のみならず、肝非実質細胞 (Kupffer 細胞、星細胞、肝類洞内皮細胞など) との協調により精妙にコントロールされている。この過程で、最初に増殖を開始するのは肝実質細胞であり、その増殖が終了した後に非実質細胞の増殖が開始され、肝類洞の再構築が完了するとともに肝全体としての再生は終了すると考えられている。この肝再生後期における類洞再構築に大きく関与しているのが肝類洞内皮細胞であるが、そのメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

sphingosine 1-phosphate (S1P) はリン脂質の一種である脂質メディエーターであり、近年その様々な生理活性が注目されている。S1P は細胞内においてのみならず、細胞膜上のリセプター (G-protein coupled receptor) を介して細胞外からも作用し、S1P は sphingosine kinase による産生と、S1P lyase および S1P phosphatase による分解によって制御されている。S1P は一般に細胞保護作用を有するが、その前駆物質である ceramide や sphingosine はアポトーシスを誘導する性質を有する為、これらのバランスは細胞の運命を規定する “sphingolipid rheostat” と称されることもある。

S1P には細胞の増殖を促進する作用があることが知られているが、遊走能に関する知見は少ない。そこで、肝再生後期にみられる肝類洞再構築の過程において、S1P が肝類洞内皮細胞の遊走にどのように関わっているかを検討する為実験を行なった。

その結果、肝類洞内皮細胞には S1P receptor 1 (S1P₁) の発現がみられ、その刺激により細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇し、myosin light chain kinase (MLCK) 活性を介した actin-myosin の連関収縮が細胞遊走を制御している可能性が明らかとなった。

我々は S1P が eNOS (endothelial nitric oxide synthase) の活性化を介した NO 産生により肝類洞内皮細胞の増殖に関与することを既に報告しているが (Hepatology 44: 1278-1287, 2006)、今回の cell transwell migration assay における検討では、遊走は eNOS の阻害剤により影響を受けなかったことより、S1P による遊走能の亢進は増殖とは直接関係なく生じているものと考えられた。

しかし、S1P がどの細胞で産生されているかについては不明な点が多い。一般に、S1P は血小板に多く含まれていることが知られているが、人為的に血小板を取り除いても血漿中の S1P 濃度は変化しないという報告もみられ、S1P の存在に血小板が必須であるかについては議論の余地が残されている。

今回の実験で注目すべき点は、部分肝切除後ラットより作製した肝類洞内皮細胞 (PHx-LSEC) においては sham operation 後ラットより分離した肝類洞内皮細胞

(sham-LSEC) に比べ、sphingosine kinase 1 の発現が亢進していたという点である。両者間で S1P receptor の発現に差異はなく、sphingosine kinase 1 の阻害剤により sham-LSEC の遊走には変化がみられなかったのに対し PHx-LSEC の遊走が抑制されたという結果は、S1P が肝切除後の肝類洞内皮細胞で産生されている可能性を示唆するものと考えられる。

一方、*in vivo* における肝組織像の検討では、肝再生後期において肝類洞内皮細胞が cluster となった肝実質細胞の間に侵入していく様子が観察された。又、S1P を肝再生前期に投与しても肝実質細胞の増殖はみられなかったのに対し、肝再生後期に投与した場合には肝実質細胞の有意な増殖能亢進が認められた事実は、S1P による肝類洞再構築の促進が肝実質細胞の増殖を惹起したという可能性を示唆しており興味深い。又、sphingosine kinase 1 の阻害剤を肝再生後期に投与することで肝実質細胞の増殖が抑制されたという結果は、以上の可能性を支持するものと考えられる。

肝再生後期における肝類洞の再構築が、sphingosine kinase 1 の発現亢進を介した類洞内での S1P レベルの上昇により促進される点として、それが何故、肝実質細胞の増殖を誘導するのかという点に関しては不明である。肝実質細胞の増殖は主として肝星細胞、血小板、あるいは肝類洞内皮細胞に由来する肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor; HGF) により制御されると考えられているが、S1P がこれらの細胞に作用して HGF 産生を惹起するという報告はみられない。

しかし、最近の報告では、肝類洞内皮細胞と肝実質細胞を共培養することにより、両者の細胞間接着が肝実質細胞の増殖を引き起こすという結果が得られている。S1P によって肝類洞内皮細胞が肝実質細胞の cluster 内への遊走・侵入することにより両者の細胞間接着が生じ、その結果肝実質細胞の増殖が誘導されるという可能性は興味深いと考えられる。

以上の結果は、S1P による肝類洞内皮細胞の遊走促進が肝類洞再構築を誘導するという仮説を支持するものであるが、一方で他の血管増殖誘導因子の関与を否定するものではない。VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) は内皮細胞の sphingosine kinase 1 を活性化し S1P の産生に関与することが知られているし、S1P は細胞内 receptor crosstalk により内皮細胞の VEGF receptor を transactivate するという報告もみられる。さらに複雑なことに、VEGF は S1P receptor の発現を亢進させるという知見も得られていることより、S1P と VEGF はそのリセプターを含め相互に制御しながら機能しているものと考えられる。

肝臓は古来、再生能の旺盛な臓器として知られるが、肝再生研究が必ずしも期待通りに

進展していると言えないのは、肝構成細胞が多岐に渡り、そのコーディネートが容易ではないことに一因があると思われる。肝実質細胞を取り巻く非実質細胞との微小環境の制御機構を解明していくことが今後の大きな課題と考えられる。

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 10 件)

- 1) Okubo H, Kitamura T, Ando H, Fukada H, Igusa Y, Kokubu S, Miyazaki A, Fujimura A, Shiina S, Watanabe S. Gadoxetic Acid-Enhanced MR Imaging Predicts Simeprevir-Induced Hyperbilirubinemia During Hepatitis C Virus Treatment: A Pilot Study. *J Clin Pharmacol*, 00(0) 1-7, 2016. (査読あり)
- 2) Kagawa T, Hirose S, Arase Y, Oka A, Anzai K, Tsuruya K, Shiraishi K, Orii R, Ieda S, Nakazawa T, Tomita K, Hokari R, Miura S, Ebinuma H, Saito H, Kitamura T, Horie Y, Okuse C, Wasada M, Inoko H, Tohkin M, Saito Y, Maekawa K, Takikawa H, Mine T. No Contribution of the ABCB11 p.444A Polymorphism in Japanese Patients with Drug-Induced Cholestasis. *Drug Metab Dispos* 43: 691-697, 2015. (査読あり)
- 3) Tabe Y, Hatanaka Y, Nakashiro M, Sekihara K, Yamamoto S, Matsushita H, Kazuno S, Fujimura T, Ikegami T, Nakanaga K, Matsumoto H, Ueno T, Aoki J, Yokomizo T, Konopleva M, Andreeff M, Miida T, Iwabuchi K, Sasai K. Integrative genomic and proteomic analyses identifies glycerol-3-phosphate acyltransferase as a target of low-dose ionizing radiation in EBV infected-B cells. *Int J Radiat Biol*. Jan;92:24-34, 2016. (査読あり)
- 4) Sueyoshi K, Sumi Y, Inoue Y, Kuroda Y, Ishii K, Nakayama H, Iwabuchi K, Kurishita Y, Shigemitsu H, Hamachi I, Tanaka H. Fluorescence imaging of ATP in neutrophils from patients with sepsis using organelle-localizable fluorescent chemosensors. *Ann Intensive Care*. 6:64, 2016. (査読あり)
- 5) Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, Kinoshita T, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Yokoyama N, Ogawa H, Takamori K, Iwabuchi K. Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of

mycobacteria by human neutrophils. *Sci Signal*. Oct 11; 9 (449): ra101, 2016.

(査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

- 1) Iwabuchi K, Nakayama H. Lactosylceramide is a key player in immunological functions of human neutrophils. *Cell Symposium: 100 year of Phagocytes*. Sicily, Italy, Sep, 2016.
- 2) Iwabuchi K, Nakayama H, Yokoyama N and Iwabuchi K. Human neutrophils phagocytose mycobacteria through interactions between LacCer and α 1,2-monomannose side, The Society For Leukocyte Biology's 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016", Verona, Italy, Sep, 2016.
- 3) Nakayama H, Yokoyama N and Ishii K. Organization and immunological functions of Lactosylceramide-enriched lipid rafts, The Society For Leukocyte Biology's 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016", Verona, Italy, Sep, 2016.
- 4) Iwabuchi K, Nakayama H. Role of Lactosylceramide-enriched lipid rafts in innate immune response of human phagocytes. 1st Japan-Korea Lipid Biology Joint Meeting, Cheju Island, Kores, May, 2016.
- 5) 横山紀子, 石井久美子, 小林俊秀, 加藤幸成, 井ノ口仁一, 岩淵和久. 抗体や毒素を用いたスフィンゴ糖脂質の脂質マイクロドメインの構造と機能解析について. 第9回セラミド研究会, 東京, Oct. 2016

[図書] (計 7 件)

- 1) Kitamura T, Watanabe S. Bile Acids and NAFLD/NASH. *Bile Acid in Gastroenterology: Basic and Clinical*. Tazuma S and Takikawa H (eds), Springer Japan, Chapter 10, 145-155, 2017, DOI 10.1007/978-4-431-56062-3_10.
- 2) Nakayama H, Iwabuchi K: Molecular mechanisms underlying the immunological activities of glycosphingolipid-enriched lipid rafts in phagocytes. Reference Modules entitled *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier 2017, in press.
- 3) 北村庸雄, 高森建二: 慢性肝疾患における難治性そう痒症の治療の実際. *新薬と臨床*, 66: 76-80, 2017.
- 4) 北村庸雄, 高森建二: 胆汁酸研究の進歩と展望. *痒みの発生機序*. 肝・胆・膵, 72: 877-891, 2016.
- 5) 中山仁志, 岩淵和久: スフィンゴ糖脂質の脂質ラフトの構造と機能: ラクトシルセラミドの脂質ラフトを介した自然免疫

応答, 生化学 第 89 卷 第 1 号, 62-72,
2017

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村庸雄 (KITAMURA, Tsuneo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号: 20231285

(2) 研究分担者

岩渕和久 (IWABUCHI, Kazuhisa)

順天堂大学・看護学部・教授

研究者番号: 10184897