

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860140

研究課題名(和文) 肝線維化部位に集積する筋線維芽細胞による線維形成の分子機構に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanisms of fibrogenesis by myofibroblasts which accumulate around fibers

研究代表者

小川 智弘 (OGAWA, Tomohiro)

近畿大学・工学部・講師

研究者番号：70448752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓病態で見られる筋線維芽細胞の存在に着目し、この細胞が線維形成に重要な細胞であると考えている。本研究では肝臓のオステオポンチン(OPN)陽性の筋線維芽細胞の存在を明らかにし、その細胞の単離および機能解析を目的として研究を進めた。正常肝からOPN陽性細胞の分離を試みたが、その細胞はほとんど存在しなかったため、OPNの発現が高い障害肝モデルを探索した。その結果、マウスの線維化モデルやNASHモデルでOPNの強発現を確認することができた。その局在は門脈域周辺を中心に限局して存在していることが明らかとなり、OPNが線維化の初期段階における筋線維芽細胞の有用なマーカーであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We focused on the presence of myofibroblasts, which found in the liver pathology. Liver myofibroblasts are thought to be important cells in liver fibrogenesis. In this study, we reveal the presence of osteopontin (OPN)-positive liver myofibroblasts, and were studying the isolation and functional analysis of OPN-positive liver myofibroblasts. First, we tried to separate OPN-positive cells from normal liver, but the cells were no presence. Next, we searched for liver failure model, which had high expression of OPN genes. As a result, we confirmed the high expression of OPN genes in fibrosis model and NASH model in mice. It was clear that OPN-positive cells were mainly present in peripheral portal region. OPN was suggested to be useful a marker of myofibroblasts in the early stages of fibrosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：星細胞 インテグリン コラーゲン 肝臓 オステオポンチン 線維化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、食生活の欧米化に伴い、日本における患者数が増加している非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や、C型肝炎やB型肝炎などのウイルス性肝炎は、肝線維化を経て肝硬変や肝癌を発症し、死亡するケースも少なくない。これらの病態では、肝障害によって肝細胞が壊死を起し、壊死局所にコラーゲンなどの細胞外マトリックスが過剰に蓄積することによって肝線維化が引き起こされる。肝線維化は、肝障害が軽度の場合、残存していた肝細胞が増殖し、肝臓が修復され肝再生が起こる。しかしながら、障害が重度であったり、持続する場合には過剰な線維の蓄積が行われ、やがて肝硬変を発症する。肝硬変にまで至ると、肝臓の修復は非常に困難になってしまう。肝線維化を引き起こす一つの要因として、星細胞の活性化が重要な役割を担っていることが広く認知されているが、近年、この活性化星細胞と性質の異なる筋線維芽細胞の存在が示唆され、この細胞が線維化誘導や線維形成において非常に重要な役割があると考えられている。しかしながら、この細胞の肝線維化での役割について不明な点が多く、特に線維束周辺に集積する筋線維芽細胞の役割について明らかになっていない。2013年7月、東京大学の津久井らの研究によって肺線維症をもたらす活性化線維芽細胞が病変部位に集積するメカニズムの一端を明らかにした。肺線維症は、活性化した線維芽細胞が病変部位に集積し、コラーゲンを大量に産生するため、この細胞は肝臓の筋線維芽細胞と類似した性質を持ち、オステオポンチンを強発現していることに着目した。

## 2. 研究の目的

肝線維化は肝硬変や肝癌へと進展する可能性が非常に高い肝臓病態であり、その発症機序について不明な点が多い。そのため、肝線維化に対して薬剤による有効な治療法はない。近年、線維化をもたらす要因として、

線維化部位に集積する細胞 (オステオポンチン陽性筋線維芽細胞) の存在が非常に重要な役割を担っていることが報告された。そこで、本研究では、線維肝からオステオポンチン陽性筋線維芽細胞の分離および培養を試み、その細胞の特性を明らかにする。さらに、肝臓の筋線維芽細胞の線維形成に関わる分子制御機構を明らかにすることで、肝線維化の治療法の開発および創薬研究につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 正常肝臓からオステオポンチン陽性細胞の分離

C57BL/6 マウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流法により消化を行い、得られた肝臓細胞画分から、Nycodenz を用いた密度勾配遠心法により星細胞画分を分離することができる。これらの細胞を培養皿上で培養することで、*in vivo* における星細胞の活性化の様子を再現することができる。培養した星細胞のオステオポンチン抗体 (R&D Systems) を用いた免疫染色を行った。

### (2) 線維肝におけるオステオポンチンの発現

C57BL/6 マウスを使って、四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) 投与やメチオニン・コリン欠乏食投与により肝線維化動物モデルを作製し、線維肝におけるオステオポンチンの発現を Real-time PCR 法により遺伝子の発現解析を行った。CCl<sub>4</sub> はオリーブ油と CCl<sub>4</sub> を 9:1 の比で混合したものを腹腔内に 1 回投与したものを急性肝障害モデルとして、3 日に 1 回のペースで 8 週間腹腔内投与したものを慢性肝障害モデルとした。NASH モデルの作製にはメチオニン・コリン無添加食 (F2MCD) およびコントロール食 (高脂肪食) を 8 週間餌として投与した。

### (3) 線維肝におけるオステオポンチン発現細胞の局在

上記(2)で作製した肝組織を使用して、オ

ステオポンチンの免疫染色を行いオステオポンチン陽性細胞の局在を調べた。それと同時に、オステオポンチンがクッパー細胞などのマクロファージでも発現していると言われていたため、マクロファージのマーカー F4/80 や活性化星細胞などのマーカー  $\alpha$ -SMA を使用して病理学的に立証を行った。

#### (4) オステオポンチン陽性筋線維芽細胞のインテグリンの発現解析

オステオポンチン陽性細胞であるヒト活性化星細胞 LX2 のオステオポンチン受容体である各種インテグリンと CD44 の発現を PCR 法により調べた。そして、組換えオステオポンチンを LX2 細胞に作用させ、細胞形態およびコラーゲン産生の発現を調べることでオステオポンチンの機能解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 正常肝臓から Nycodenz 密度勾配遠心法により星細胞分画を分離し、オステオポンチン陽性細胞を確認したところ、オステオポンチン陽性細胞を確認することができなかった。そのため、正常肝臓からオステオポンチン陽性細胞の分離を試みたが、オステオポンチン陽性細胞がほとんど存在せず、細胞を分離することができなかった。次に、 $\text{CCl}_4$  投与やメチオニン・コリン欠乏食投与により肝線維化動物モデルを作製し、線維肝からオステオポンチン陽性細胞を分離することとした。

(2) 作製した線維肝から total RNA を抽出し、cDNA 合成を行いオステオポンチン遺伝子の発現を Real-time PCR 法により調べた結果、障害肝では正常肝に比べオステオポンチンの発現が増加傾向にあり、肝線維化の進展に伴い発現が上昇することが明らかとなった (図 1)。また、肝障害を軽減する働きのあるプロポリスなどを同時に添加することでオステオポンチンの発現が抑制されることも明らかとした (図 1)。

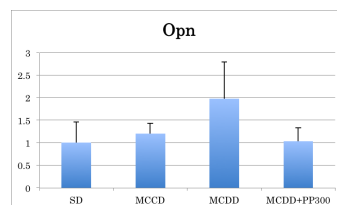


図 1 障害肝におけるオステオポンチン (Opn) の発現 (MCDD: メチオニン・コリン欠乏食投与マウス肝、MCDD+PP300: プロポリス投与したマウス肝)

(3) 上記(1)の結果、障害肝でのオステオポンチン陽性細胞数が非常に少ないことが想定されたため、オステオポンチンの発現が高い障害肝モデルを探索した。その結果、メチオニン・コリン欠乏食を投与した NASH モデルや  $\text{CCl}_4$  投与した肝線維化モデルでオステオポンチン陽性細胞を確認することができた (図 2)。それと同時に、マクロファージのマーカーである F4/80 や活性化星細胞などのマーカーである  $\alpha$ -SMA の免疫染色を行い、その局在の違いを比較した。その結果、オステオポンチン陽性細胞の局在は F4/80 陽性細胞と局在が異なり、門脈域周辺に局限して存在していることが明らかとなった (図 2)。これらのことから、オステオポンチンが線維化の初期段階における筋線維芽細胞の有用なマーカーであることが示唆された。現在、障害肝から細胞を分離する技術の確立を目指している。オステオポンチン陽性細胞の割合は非常に少ないため、効率よく細胞を分離する技術が求められる。

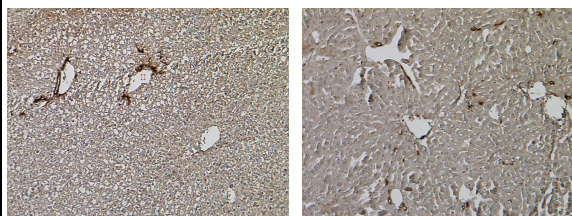


図 2 オステオポンチンの免疫染色 (左: NASH モデル、右: 肝線維化モデル)

(4) オステオポンチンの作用機序を目的でヒト星細胞株 LX-2 細胞にヒト組換えオステオポンチンを作用させた。この細胞はオステオポンチンを発現しており、その受容体であるインテグリン  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_5$  お

よび CD44 を発現していることを確認された (図3)。オステオポンチンを発現している筋線維芽細胞は、周囲の細胞に対してパラクライン的に働きかけるだけでなく、オートクラインに作用している可能性が示唆された。これらの作用が肝線維化の進展や線維形成に深く関与していると考えられた。この細胞の線維形成に関わる分子制御機構を明らかにすることで、肝線維化の治療法の開発および創薬研究につながることを期待される。



図3 オステオポンチン受容体の遺伝子発現

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

小川智弘，山田康枝，河田則文，

“ Propolis components suppresses activated hepatic stellate cell invasion by inhibition of MMP-2 and MMP-9 expression and its activation. ”，18th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid(ISCHS)，2015-11-11，アシロマ(アメリカ)

小川智弘，平尾凌，寺田拓実，山田康枝，兵庫秀幸，河田則文，“ Propolis components suppresses collagen production and cell proliferation in activated hepatic stellate cells ”，Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2015，2015-3-14，イスタンブール(トルコ)

小川智弘，平尾凌，寺田拓実，“ 肝星細胞のコラーゲン産生および細胞増殖に対するブラジル産プロポリス成分の効果の検討 ”，第28回肝類洞壁

細胞研究会学術集会，2014-12-13，アークホテル岡山(岡山県岡山市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 智弘(OGAWA, Tomohiro)

近畿大学・工学部・講師

研究者番号：70448752