

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893232

研究課題名(和文)肝障害における肝細胞移植の効果 メカニズムの解明と臨床応用

研究課題名(英文)The effect of cell transplantation on liver injury model

研究代表者

齋藤 千恵子(Saito, Chieko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10735575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：解熱剤に含まれるAPAP(アセトアミノフェン)を過剰に摂取すると肝障害を引き起こす。APAPに対する感受性が高い雄肝細胞とAPAP感受性の低い雌肝細胞カプレットではギャップ結合を介して雌肝細胞が雄肝細胞を助けるという現象を発見した。このような現象が個体においても観察されるならば、雌肝細胞移植によって雄肝障害を減少させることができるのではないかと考えたが、有意な移植細胞治療効果はなかった。しかし、雌肝細胞に、Nrf-2(NF-E2-related factor-2)、Cx(Connexin)26,32を過剰発現させた後、APAP肝障害を引き起こした雄マウスへ移植したところ、肝障害は減少した。

研究成果の概要(英文)：Acetaminophen(APAP) overdose induced liver damage. APAP-sensitive male hepatocytes were protected by the attachment of APAP-insensitive female hepatocytes, with this protection being dependent on gap junctions. If this phenomenon happens in vivo, transplanted female hepatocytes might reduce liver damage in male mice. The results showed that transplantation of female hepatocytes did not decrease damage in male livers. However, male liver damage was decreased when female hepatocytes were overexpressed by Nrf-2(NF-E2-related factor-2), and Cx(connexin) 26, 32 after APAP overdose. Therefore under a certain condition, female hepatocytes could be effective for transplantation after APAP induced liver damage.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞 移植 肝障害

1. 研究開始当初の背景

解熱剤、鎮痛剤に多く含まれるアセトアミノフェン (APAP) を過剰に摂取すると肝障害を引き起こす事はよく知られている。申請者はマウスから肝細胞を分離した初代肝細胞の系において、APAP に対する感受性が高い雄 (♂) 肝細胞同士のカプレット (2つの肝細胞が接触しているもの) では APAP 処理後約 6 割が細胞死を引き起こすのに対し、APAP 感受性の低い雌 (♀) 肝細胞カプレットでは約 1 割の♀肝細胞しか細胞死を引き起こさない事を観察した。さらに、♂肝細胞と♀肝細胞をくっつけたカプレットでは、♀肝細胞が接触している♂肝細胞死を減少させるという現象を発見した。この現象は接着している♂♀の肝細胞間でコミュニケーションをとっているために起こったと考えられる。接着している細胞間のコミュニケーションとしてギャップ結合が知られている。ギャップ結合はコネクシン (Cx) という膜タンパクがチャンネルを形成し分子量 1KDa 以下の物質を細胞間で行き来させている。コネクシンは多くのファミリーがあるが、肝細胞には Cx26, 32 が発現している事が知られている。そこで、APAP における細胞間コミュニケーションにギャップ結合が関与しているかどうか調べるために、Cx32 ノックアウト (KO) 肝細胞に Cx26siRNA をトランスフェクションした (Cx26 KO マウスは胎生致死)。すると♂肝細胞は♀肝細胞と接触しているにもかかわらず、APAP の感受性が高いままだった。よって、APAP が誘導する肝細胞死はギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションによって調節されている事を明らかにした。このような現象が個体においても観察されるならば、肝細胞移植によって、肝障害の進行を早い

段階で食い止められる可能性があり、症状の緩和や肝移植を必要とする段階まで悪化させないようにするという治療が期待される。また、メカニズムを解析することにより細胞治療効率を上げ、肝臓以外の臓器においても応用できる可能性がある。ドナーの安全性や合併症など様々な問題を考えなければならない肝臓そのものを移植する方法や、癌化する可能性を排除しきれない幹細胞を移植する場合とは異なり、この成熟肝細胞を移植する方法は、安全かつ短期間に効果を上げることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、肝細胞移植によるアセトアミノフェン肝障害治療効果のメカニズムを探り、ヒトへの応用を目指す。

3. 研究の方法

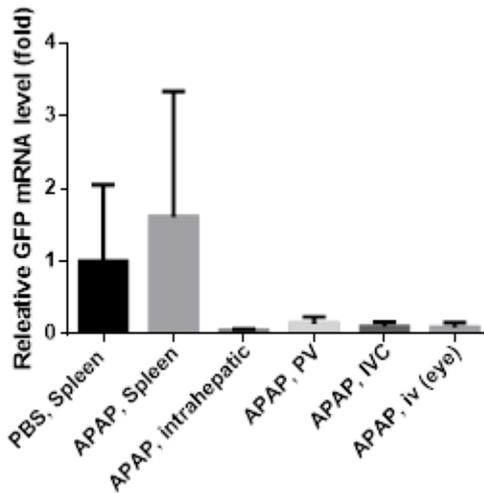
計画している具体的な研究項目は、

- ①肝細胞移植方法の検討
- ②肝細胞移植後の肝機能解析
- ③移植肝細胞と障害をうけた肝細胞間でどのようなコミュニケーションがあるか解明する事である。

4. 研究成果

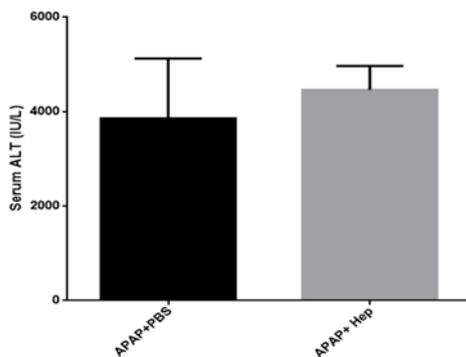
どの部位から肝細胞を移植するのが一番効果的か調べるために、GFP タンパクを発現しているマウスより肝細胞を分離した。絶食させた C57BL/6 オスマウスに PBS または 300mg/kg APAP を投与 3 時間後に GFP 肝細胞を、脾臓、肝臓内、門脈、下大静脈、眼静脈より  $1 \times 10^6$  cells の細胞をそれぞれ移植した。その 4 時間後に sacrificed し、肝臓から RNA を摘出、cDNA 合成後、real time PCR により GFP mRNA の発現を調べた。すると、脾臓より肝細胞を移植するのが一番効果的である事が示唆された (図 1)。

図 1



次に、APAP をオス C57BL/6 マウスに投与し、その 3 時間後に、メス肝細胞を脾臓より移植した。その後、4 時間後に sacrificed し肝障害マーカーである血清中の ALT を測定した。すると予想に反して、メス肝細胞を移植してもオスマウス肝障害は軽減されない事が示された (図 2)。

図 2

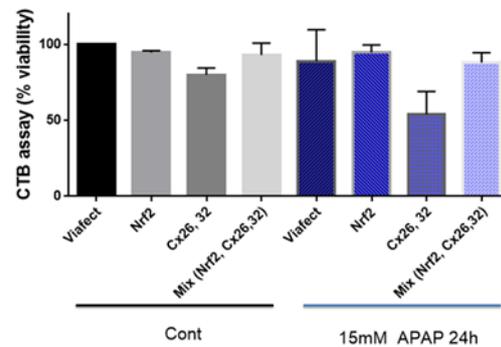


この結果は、肝臓より肝細胞を単離する際に♀肝細胞にストレスがかかり、ギャップ結合の構成因子であるコネキシンの発現や、抗酸化物質である GSH を軽減させている可能性があるために、細胞移植しても肝障害を減少させることができなかつたのではないかと考えた。

そこで、Cx26, Cx32 や、酸化ストレス防御機構において中心的役割を果たす転写因子 Nrf2 (NF-E2-related factor-2) をメス肝細胞

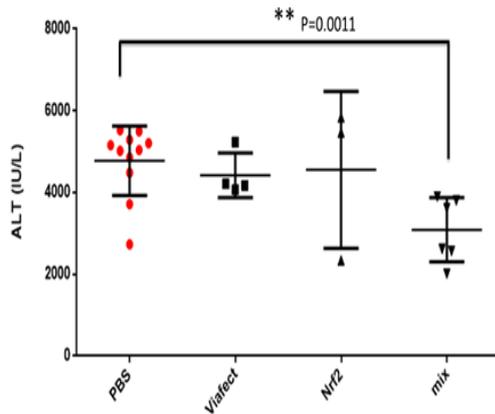
に ViaFect™ トランスフェクション試薬を用いて過剰発現させた。メス肝細胞に Nrf2, Cx26, Cx32, または Nrf2, Cx26, 32 (Mix) を発現させ 15mM APAP を暴露し 24 時間後に CTB アッセイ (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay) を行った (図 3)。CTB アッセイは細胞生存率をモニタリングするためのもので、生細胞が酸化還元色素であるレサズリンを蛍光産物であるレゾルフィンに変換したものを測定した。

図 3



理由は不明だが、Cx26, Cx32 のみを過剰発現させると生細胞率が減少した。そのため、Nrf2, または Nrf2, Cx26, 32 (Mix) すべて過剰発現させたメス肝細胞を APAP 誘導肝障害を受けたオスマウスに移植し 8 時間後に sacrificed し血清中の ALT 値を測定した。Nrf2, Cx26, 32 を過剰発現させた肝細胞を移植すると、細胞移植していない群に比べて ALT 値は有意に下がった。また、その肝障害減少効果は、Nrf2 のみを過剰発現させた群より 3 つの遺伝子を過剰発現させた群のほうが高い事がわかった (図 4)。

図 4



これら結果より、ギャップ結合が細胞移植において重要であるかどうかはわからない。しかし、少なくとも脾臓より移植する細胞に Cx26, Cx32, Nrf2 を共に過剰発現する事が肝障害を減少させるのに必須であるならば、移植した肝細胞の抗酸化効果がコネキシンを介したなんらかの細胞間コミュニケーションを通して肝障害治療メカニズムに関与している事が示唆された。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件) 査読有

Saito C, Shinzawa K, Tsujimoto Y.  
Synchronized necrotic death of attached hepatocytes mediated via gap junctions.  
Sci Rep. 4:5169, 2014,  
doi: 10.1038/srep05169

[学会発表] (計 1 件)

ポスター発表

Saito C, Shinzawa K, Tsujimoto Y.  
アセトアミノフェンにより誘導されるギャップ結合を介する接着肝細胞の同期的な細胞死 第34回分子病理学研究会  
神戸ホテル フルーツ・フラワー (兵庫県神戸市) 2015年7月25日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤 千恵子 (SAITO CHIEKO)