

令和元年5月17日現在

機関番号：82610

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26110007

研究課題名(和文)肝幹細胞による肝再生を促進するダイイングコードの解明

研究課題名(英文)Elucidation of "Dying Code" for liver stem/progenitor cell-mediated regeneration

研究代表者

田中 稔(TANAKA, MINORU)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・細胞療法開発研究室長

研究者番号：80321909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 70,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肝疾患時の線維化や再生における細胞死の役割や意義を明らかにすることを目標とした。その結果、肝再生と肝線維化の制御に重要な役割を果たす新規因子を2つずつ同定し、それらが制御する細胞間相互作用を明らかにした。特に骨髄由来のマクロファージが線維化の進行に重要な役割を果たしていることを見出した。一方、肝前駆細胞(LPC)を生体内でモニターできるマウスを開発し、肝障害の種類に応じてLPCが肝再生に寄与することを明らかにした。また、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)に関わる細胞死の同定を本領域内の複数班と協力して行ない、フェロトーシスがNASH発症の引き金を引く細胞死であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究から、近年社会問題化しつつある非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の発症過程において、単純性脂肪肝から肝炎への移行にフェロトーシスという細胞死に関わることが明らかとなった。今後、フェロトーシスの分子メカニズムをさらに解明することでNASHの予防法や治療法の開発につながることを期待される。また、肝マクロファージが肝星細胞間との相互作用を介して肝線維化を誘導していることが判明した。肝臓が線維化に至るメカニズムの一端が明らかとなったことから、新規の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Our aim is to clarify the role and significance of cell death in the process of liver regeneration or fibrosis in the liver diseases. Consequently, we have succeeded in the identification of two novel factors related to cell death, which are involved in the regulation of liver regeneration and fibrosis, respectively. In addition, we revealed their regulatory mechanisms in liver regeneration and fibrosis based on the cell-cell interaction. Especially, we found that bone marrow derived macrophages plays an important role in the progression of liver fibrosis. On the other hand, we have developed the genetically manipulated mice capable of labeling the liver progenitor cells (LPCs) to monitor the liver regeneration mediated by LPCs in vivo. Furthermore, we discovered that ferroptosis plays a crucial role in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by cooperating with several units in this research group "Dying Code".

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞死 肝炎 肝線維化 肝再生 肝前駆細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)従来、死細胞は生体にとって有害であり、速やかに除去されるべき対象であると考えられてきた。ところが近年、死細胞より放出される因子が積極的に周囲に情報(ダイニングコード)を発信して影響を及ぼし、生体の恒常性維持に寄与するという新しい概念が提唱されてきている。また、細胞死の様式はアポトーシスとネクローシスに大別されるが、アポトーシスが能動的細胞死であるのに対して、ネクローシスは受動的細胞死と捉えられてきた。しかし、近年、ネクローシスにも細胞内シグナルカスケードを伴う計画的ネクローシスと呼ばれる死の様式が備わっていることが続々と明らかとなっており、種々の疾患の病態形成における多様な細胞死の意義が問われている。

(2)長期に渡って肝炎が持続する慢性肝疾患では肝線維化が進行し、やがては肝硬変、肝がんへと進展する。このような慢性肝疾患の病因としては、飲酒や肝炎ウイルスに加え、近年、生活習慣病の一環として、脂肪肝から慢性肝炎へと進行する非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)が増加しており、社会問題化しつつある。よって、NASHを含む様々な肝疾患においても、その発症機序を細胞死やダイニングコードから紐解くことにより、予防法や治療法の開発に有益な知見が得られることが期待される。

2. 研究の目的

肝臓は障害に対して高い再生能を有し、急性肝障害時には残存した肝細胞が分裂することで再生する。一方、慢性肝障害時には持続的な肝細胞死による炎症、肝線維化を背景として、肝幹/前駆細胞(Liver progenitor cell; LPC)が一過的に増殖し分化することで肝再生に寄与することが知られている。本研究では、様々な肝障害系における肝細胞死の様式を精査することで、細胞死とその後の生体応答の関連を明らかにし、肝疾患の予防法や治療法の開発に資する知見を取得することを目的とした。また、肝障害後の細胞死に付随して産生される因子についても、肝再生に寄与する有益な因子と肝線維化を誘導する有害な因子の実体を明らかにし、それらの作用機序や制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)まず、肝障害後の細胞死の状況を把握するために、PIをマウスの尾静脈から投与することにより簡便なネクローシスの検出系の確立を行なった。その上で、四塩化炭素投与による急性肝炎モデルや非アルコール性肝炎(NASH)モデルを行ない、肝細胞死の評価を行なった。また、研究領域内の研究者が保有する特定の細胞死を抑制する遺伝子改変マウスの利用や阻害剤の投与により、NASHの引き金となる細胞死の特定を行なった。また、領域内共同研究として、肝臓内の脂質解析を行ない、NASH発症と脂質との関連を調べた。

(2)肝線維化に関わるダイニングコードとして見出したオンコスタチンM(OSM)のKOマウスを用いて慢性肝障害モデルを行ない、経時的な生化学検査、組織染色、遺伝子発現解析等により線維化への影響を評価した。また、肝臓より各構成細胞種を単離し、*in vitro*培養やFACS解析、遺伝子発現解析等により肝線維化に関わる細胞間相互作用を詳細に解析した。

(3)Trop2-Creノックインマウスとレポーターマウスを交配したF1マウスに様々な肝障害モデルを行ない、肝前駆細胞(LPC)による肝再生の評価を行なった。また、異なる肝障害で発現変動するダイニングコードとして見出したLutheranのLPCにおける作用機序を、単離したLPCの*in vitro*培養、遺伝子導入、スクラッチアッセイ、3次元培養等により解析した。さらに、Lutheran KOマウスを用いてNASHモデルを行ない、生体内での機能の検証を行なった。

4. 研究成果

(1)非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)における多様な細胞死の意義に関する研究成果

本研究課題では、PI投与による*in vivo*ネクローシスアッセイの妥当性の評価をまず行ない、四塩化炭素投与によるネクローシスの検出が可能であることが確かめられた。次に、本研究課題で使用するNASHモデルの検討を行なった。慢性脂肪性肝炎モデルの1つであるコリン欠乏エチオン添加(CDE)食餌投与モデルマウスを用いて、組織染色による脂肪滴の蓄積の観察と経時的な血清肝障害マーカーの測定を行った。その結果、CDEモデルは食餌投与2日という短期間で脂肪肝から肝炎を発症したため、NASH発症初期の解析に適していると考えられた(図1)。そこで、CDE食餌投与モデルを用いて、単純性脂肪肝からNASH発症への引き金となる炎症を惹起する細胞死はどのような細胞死であるのかの検討を行った。その結果、投与2日目ではアポトーシスとネクローシスが混在して誘導されていることが明らかとなった。さらに、時期を遡って解析したところ、ネクローシスが先行して生じていることが明らかとなった。次に、関与するネクローシスの様式を明らかにするため、選択的細胞死阻害剤や遺伝子改変マウスを用いた解析により検討した。その結果、Necrostatin-1s(Nec-1s)の

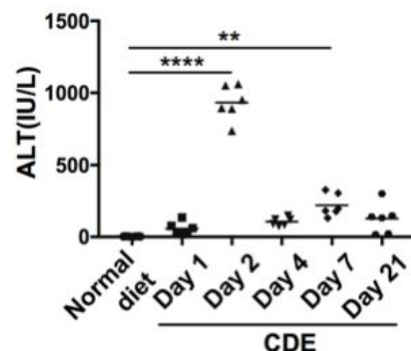


図1 CDE食餌投与後の血中肝障害マーカーALTの推移

投与やMiki KOマウスによるネクロトーシスの阻害を行なっても、CDE食餌投与後の肝障害の軽減は認められなかったため、ネクロトーシスの関与は低いと考えられた(図2左)。一方、フェロトーシス阻害剤であるTroloxやデフェリプロン(DFP)を投与すると、脂肪蓄積からの肝細胞死がほぼ完全に抑えられ、その後の炎症反応も著しく抑制された(図2右)。さらに脂質解析により、フェロトーシスの実行に重要であるとされる過酸化フォスファチジルエタノールアミンの肝臓内の含有量が、CDE食餌投与によって上昇し、Troloxの投与で正常肝のレベルまで低下することが明らかとなった。本研究の結果は、NASHの発症にフェロトーシスが関与していることを実験的に初めて示したものであり、世界に先駆けてその成果を論文として発表した(Cell Death Dis. in press)。また、本研究はフェロトーシスが有望なNASHの治療標的となることを示唆するものであり、今後のフェロトーシス研究の進展からNASHの予防や治療法の開発に繋がることが期待される。

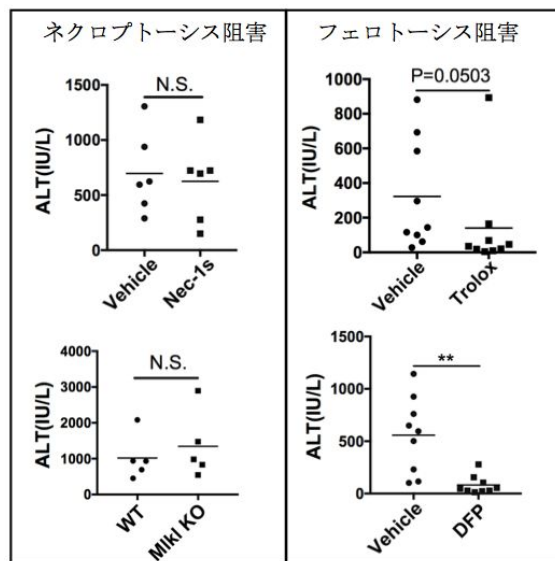


図2 NASH発症におけるネクロトーシス阻害(左列)またはフェロトーシス阻害(右列)の効果

(2)肝線維化を制御する細胞間相互作用に関する研究成果

本研究課題では、肝線維化の誘導に関わるダイニングコードとして同定したオンコスタチン M (OSM)を中心に、その作用機序を細胞間相互作用という視点から解析した。まず、マウスに肝線維化モデルである四塩化炭素の頻回投与モデル、チオアセタミド(TAA)飲水投与モデル、胆管結紮モデルを行なったところ、いずれのモデルでもコラーゲンの発現誘導や肝線維化の進行と同調して、肝臓内でのOSMの発現が上昇していることが明らかとなった。次にOSM KOマウスを用いてTAAモデルを行ない、肝線維化を誘導したところ、野生型に比べてKOマウスでは有意に肝線維化の軽減が認められた。以上の結果から、OSMは肝線維化の進行に必要な因子であることが示された。次に、OSMが肝線維化において十分な作用を示すか否かを確かめるために、Hydrodynamic Tail Vein injection (HTVi)法を用いて、正常な肝臓内でOSMを持続的に発現させた場合に線維化が誘導されるか調べた。その結果、通常の慢性肝障害モデルでは肝線維化に至るまでに数週間から数ヶ月かかるのに対し、OSMを肝内発現させると、1週間という極めて短い期間でコラーゲン産生上昇を伴った肝線維化が誘導されることが明らかとなった(図3)。また、驚くべきことに、通常の慢性肝障害モデルで認められる肝細胞死が、本モデルではほとんど起きていないことも明らかとなった。よって、OSMによる新規肝線維化モデルマウスは肝細胞死を背景とせずに線維化だけが進行する世界で初めてのモデルマウスとなるだけでなく、肝細胞死による過剰な炎症反応が起きないため、肝線維化の素過程を解析するには極めて有用なモデルマウスとなった。そこで、さらにOSMの標的細胞と作用機序について解析を進めた。まず、肝線維化に重要な役割を果たす肝星細胞を肝臓より単離して培養し、OSMを添加することで直接的な作用を検討した。その結果、コラーゲンの溶解に関わるマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)の阻害因子であるTimp1の著しい発現誘導が認められたが、コラーゲンの産生誘導は認められなかった。OSMによる肝臓内でのコラーゲン産生の上昇は、その他の細胞種へのOSMの作用を介したものであると想定されたことから、肝臓より各非実質細胞群をセルソーターで分離し、肝星細胞との共培養を試みた。その結果、F4/80陽性の肝マクロファージとの共培養においてOSMによる星細胞でのコラーゲン産生誘導が認められた。さらに、OSM刺激を受けた肝マクロファージの遺伝子発現解析を行なった結果、TFGβやCTGFといった線維化促進性のサイトカインの発現誘導が認められた。肝マクロファージには常在性のクッパー細胞(KC)と骨髄由来単球・マクロファージ(BMDM)の2つのマクロファージが存在することが知られる。そこで、次にOSMはいずれ

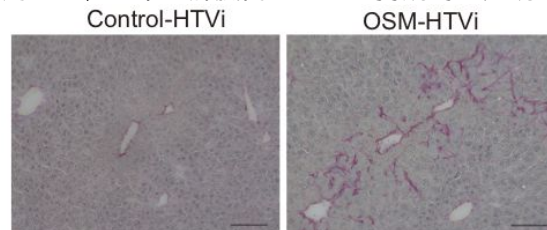


図3 シリウスレッド染色によるOSM発現1週間後の肝臓の線維化像

新規肝線維化モデルマウスは肝細胞死を背景とせずに線維化だけが進行する世界で初めてのモデルマウスとなるだけでなく、肝細胞死による過剰な炎症反応が起きないため、肝線維化の素過程を解析するには極めて有用なモデルマウスとなった。そこで、さらにOSMの標的細胞と作用機序について解析を進めた。まず、肝線維化に重要な役割を果たす肝星細胞を肝臓より単離して培養し、OSMを添加することで直接的な作用を検討した。その結果、コラーゲンの溶解に関わるマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)の阻害因子であるTimp1の著しい発現誘導が認められたが、コラーゲンの産生誘導は認められなかった。OSMによる肝臓内でのコラーゲン産生の上昇は、その他の細胞種へのOSMの作用を介したものであると想定されたことから、肝臓より各非実質細胞群をセルソーターで分離し、肝星細胞との共培養を試みた。その結果、F4/80陽性の肝マクロファージとの共培養においてOSMによる星細胞でのコラーゲン産生誘導が認められた。さらに、OSM刺激を受けた肝マクロファージの遺伝子発現解析を行なった結果、TFGβやCTGFといった線維化促進性のサイトカインの発現誘導が認められた。肝マクロファージには常在性のクッパー細胞(KC)と骨髄由来単球・マクロファージ(BMDM)の2つのマクロファージが存在することが知られる。そこで、次にOSMはいずれ

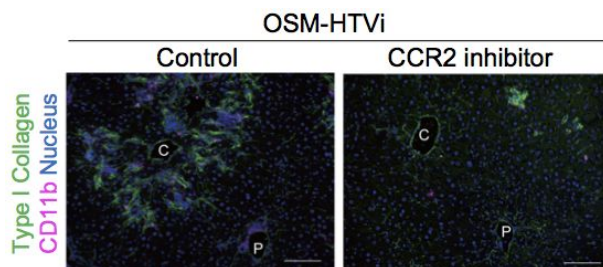


図4 OSM-HTViの肝線維化におけるBMDM動員の阻害効果 P:門脈 C:中心静脈

のマクロファージに作用して線維化を促進しているのかを調べた。BMDM は骨髄から CCL2 というケモカインにより動員されてくることから、CCL2 の受容体である CCR2 の阻害剤をマウスに投与して BMDM の動員を抑制した場合に肝線維化がどのようになるかを調べた。OSM-HTVi モデルマウスに CCR2 阻害剤を投与したところ、CD11b 陽性の BMDM が動員されなくなるとともに、肝線維化はほとんど誘導されなくなった (図 4)。以上の結果をまとめると、OSM は BMDM に対しては線維促進性活性化を促す一方で、肝星細胞には直接作用し Timp1 を誘導して線維の溶解を抑制していることが明らかとなった。この OSM による細胞間相互作用を介した相乗効果で OSM は短期間で肝線維化を増悪させていることが明らかとなった。本研究成果は OSM が肝線維化に対して有効な治療標的となることを示唆するだけでなく、肝マクロファージも有望な治療標的となりうることを示しており、その詳細については論文としてまとめ発表を行なった (Hepatology 2018)。

(3)肝前駆細胞 (LPC) による肝再生機構に関する研究成果

本研究課題では、LPC による肝再生機構について、生体内で LPC をモニターできるレポーターマウスの利用や、*in vitro* 培養による評価、LPC の制御に関わるダイニングコードの KO マウスの作製等により解析を行なった。まず、我々が以前に同定した LPC 特異的のマーカである Trop2 の遺伝子座に Cre リコンビナーゼをノックインしたマウスと R26-LSL-tdTomato マウスとの F1 マウスを用いて、8 週齢の正常肝において LPC をモニターできるか調べた。凍結肝切片を作製し、胆管マーカである CK19 で免疫染色を行なった結果、胆管細胞の中に tdTomato 陽性細胞が存在することが明らかとなった。また、この陽性細胞は胆管全体の数パーセントを占め、1 年齢のマウスにおいても同様に存在したことから、無障害では恒常性の維持には関わっていないことが示唆された。次に、このマウスに DDC 食餌投与による原発性硬化性胆管炎モデルまたは CDE 食餌投与による NASH モデルを行ない、その後の LPC の運命追跡を行なった。その結果、胆管炎モデルでは tdTomato 陽性細胞は無数の再生胆管に寄与したのに対して、肝細胞への寄与はほとんど認められなかった。一方、肝細胞が主に障害を受ける NASH モデルでは tdTomato 陽性の肝細胞が出現し LPC が肝再生に寄与していることが示された。現在、複数の研究グループより胆管内に肝再生に寄与する細胞が存在することが報告されているが、再生に寄与する細胞は胆管全体なのか一部の特別な細胞なのかは不明なままである。本研究から Trop2 でラベルされた胆管の一部の細胞が、少なくとも肝再生に寄与できる能力を有することが明らかになった (投稿準備中)。

従来の研究では、CDE 投与 (NASH) モデルと DDC 投与 (胆管炎) モデルで増殖する胆管マーカ陽性細胞を LPC と称し、モデル間で区別されることなく解析されてきたが、今回の我々の研究から両モデルで出現する LPC には性状に大きな違いがあることが予想された。実際、NASH モデルと胆管炎モデルでは LPC の形態は大きく異なり、前者は高い運動性を、後者は高度な管腔形成を示すが、その制御機構についてはこれまで全く不明であった。我々は肝障害モデルの違いに応じて LPC 上で発現変動するダイニングコードとして Lutheran を見出した。Lutheran は NASH モデルの LPC では高く発現する一方で、胆管炎モデルの LPC では逆に発現が低下していた (図 5)。そこで、NASH モデルの障害肝より Lutheran 強陽性と陰性の LPC をそれぞれ単離し、*in vitro* でのスクラッチアッセイで運動性を、3 次元培養で管腔形成能を評価したところ、Lutheran の発現量に一致して LPC の性状が規定されていることが明らかとなった。さらに、Lutheran はラミニン 511 に結合し、ラミニン 511 からのインテグリンシグナルを競合的に阻害することで LPC の形態を制御していることを明らかにした。また、KO マウスを作製し NASH モデルを行なったところ、LPC が胆管炎モデルに近いフェノタイプに変化したことから、生体内においても Lutheran は LPC 制御において重要な役割を果たすことが証明された (図 6)。

本研究では、異なる肝障害モデル間で区別されることなく同様に扱われてきた LPC に対して、Lutheran というダイニングコードの発現の違いにより明確に区別が可能であることを示すとともに、LPC におけるその機能についても明らかにした。本研究の成果については論文としてまとめ発表を行なった (eLife 2018)。

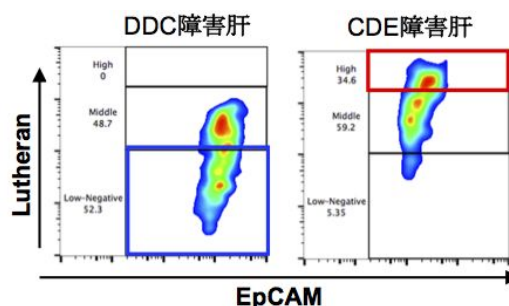


図 5 FACS解析によるLPCでのLutheran発現の比較

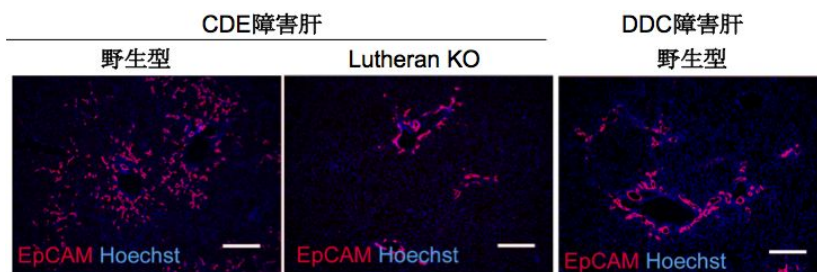


図 6 NASHモデルにおけるLutheran KOマウスLPCのフェノタイプの変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, Nakasone M, Sakamoto T, Matsuoka M, Imai H, Kok YC, Okochi H, Nakano H, Miyajima A, Tanaka M. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis.* (2019) In press 査読あり

Miura Y, Matsui S, Miyata N, Harada K, Kikkawa Y, Ohmuraya M, Araki K, Tsurusaki S, Okochi H, Goda N, Miyajima A, Tanaka M. Differential expression of Lutheran/BCAM regulates biliary tissue remodeling in ductular reaction during liver regeneration. *Elife.* 7. pii: e36572. (2018) doi: 10.7554/eLife.36572. 査読あり

Matsui S, Harada K, Miyata N, Okochi H, Miyajima A, Tanaka M. Characterization of Peribiliary Gland-Constituting Cells Based on Differential Expression of Trophoblast Cell Surface Protein 2 in Biliary Tract. *Am J Pathol.* 188(9):2059-2073. 査読あり

Matsuda M, Tsurusaki S, Miyata N, Saijou E, Okochi H, Miyajima A, Tanaka M. Oncostatin M causes liver fibrosis by regulating cooperation between hepatic stellate cells and macrophages in mice. *Hepatology.* 67(1):296-312. (2018) doi: 10.1002/hep.29421. 査読あり

Yagai T, Matsui S, Harada K, Inagaki FF, Saijou E, Miura Y, Nakanuma Y, Miyajima A, Tanaka M. Expression and localization of sterile alpha motif domain containing 5 is associated with cell type and malignancy of biliary tree. *PLoS One.* 12(4):e0175355. (2017) doi: 10.1371/journal.pone.0175355. 査読あり

Yagai T, Miyajima A, Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *Am J Pathol.* 184: 2250-9 (2014) doi: 10.1016/j.ajpath.2014.04.018. 査読あり

〔学会発表〕(計 45 件)

発表者(代表)名、発表標題、学会等名、発表年を記入すること。

1. 田中 稔, 慢性肝疾患における肝リモデリングの制御機構の解明, 第 27 回日本 Cell Death 学会, 2018 年
2. Minoru Tanaka, Cell Death and Regeneration in Liver Diseases. Australia-Japan Meeting on Cell Death, 2018 年
3. 田中 稔, 松田道隆, 宮島篤, オンコスタチン M は肝星細胞とマクロファージの相互作用を介して肝線維化を誘導する, 第 31 回肝類洞壁研究会, 2017 年
4. 田中 稔, 肝臓の疾患および再生における多様な細胞死の意義, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年
5. 田中 稔, 肝再生過程における肝幹/前駆細胞の実体解明を目指して, 第 23 回肝細胞研究会, 2016 年
6. Yagai M, Miyajima A, Tanaka M. Study on the molecular mechanisms linking between hepatic cell death and fibrosis. Japan Australia Meeting on Cell Death, 2015 年

〔図書〕(計 5 件)

著者名、出版社名、書名、発行年(西暦)及び総ページ数(共著の場合は最初と最後の頁)を記入すること。

1. 田中 稔 肝前駆細胞による肝再生機構 **臨床免疫・アレルギー科** 第 72 巻 第 1 号 科学評論社 (2019)
2. 田中 稔 肝線維化におけるマクロファージの役割 **臨床免疫・アレルギー科** 第 68 巻 第 5 号 pp. 489-495. 科学評論社 (2017)
3. 田中 稔 細胞死からみた肝線維化の制御機構 **実験医学** 第 34 巻 7 号 pp.158-163 (2016)
4. 田中 稔 細胞死と肝臓の再生および線維化 **臨床免疫・アレルギー科** 第 63 巻 第 5 号 pp. 445-451. 科学評論社 (2015)
5. 田中 稔 gp130 を介して作用するサイトカイン サイトカイン・増殖因子キーワード辞典 pp. 52-66. 羊土社 (2015)

〔その他〕

ホームページ: <https://ncgm-regenerative-medicine.org/>

アウトリーチ活動情報: 研究室体験と研究に関するセミナーを計 4 回行った。

1. 岐阜県下呂市立竹原中学校 3 年生 (参加人数 6 名) 平成 28 年 5 月 26 日 (木)
2. 渋谷教育学園渋谷中学校 3 年生 (参加人数 11 名) 平成 28 年 5 月 13 日 (金)
3. 新宿区立成城中学校 3 年生 (参加人数 7 名) 平成 28 年 7 月 26 日 (火)
4. 山形県立酒田東高等学校 (参加人数 13 名) 平成 28 年 11 月 11 日 (金)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松田道隆

ローマ字氏名：Matsuda Michitaka

研究協力者氏名：松井理司

ローマ字氏名：Matsui Satoshi

研究協力者氏名：三浦泰史

ローマ字氏名：Miura Yasushi

研究協力者氏名：鶴崎 慎也

ローマ字氏名：Tsurusaki Shinya

研究協力者氏名：木村 拓也

ローマ字氏名：Kimura Takuya

研究協力者氏名：長島 有里

ローマ字氏名：Nagashima Yuri