

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度 -2008 年度

課題番号：19590383

研究課題名（和文）慢性肝炎と肝線維化におけるオンコスタチン M の作用機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of the function of Oncostatin M in chronic hepatitis and liver fibrosis.

研究代表者

田中 稔 (Tanaka Minoru)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任講師

研究者番号：80321909

研究成果の概要：

肝障害時におけるオンコスタチン M(OSM)の作用機序の解明を目指した。高脂肪食投与による肥満モデルでは、OSM 受容体 KO マウスは野生型マウスに比べて有意に体重の増加を示し、肝臓内の脂質量が増加するなど、早期の脂肪肝を引き起こした。OSM は PPAR γ の発現を抑制することで脂肪肝を抑制していることが示唆された。また、肝炎惹起因子を投与した KO マウスは野生型マウスより感受性が高く、急性肝炎で死亡したことから、OSM には免疫抑制作用があることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

オンコスタチン M(OSM) 受容体 KO マウス(OSMR KO)では急性肝障害モデルである四塩化炭素を投与すると著しい肝再生不良および肝炎の持続と増悪化が認められ、これらの症状は OSM の投与により軽減される。このことから、OSM は急性肝炎においては抗炎症作用を有することが予想され、肝炎治療への応用が期待された。一方、慢性肝障害モデルにおいても OSMR KO マウスの肝臓では脂肪化、線維化が亢進していることが認められ、OSM の作用が肝脂肪化、線維化に関与していることが予想された。しかしながら、その標的細胞や発症機構は

不明であった。これらの現象における OSM の作用機序を明らかにすることにより、肝障害治療のための新たな標的分子が見つかる可能性が期待された。

2. 研究の目的

(1)本研究では様々な肥満モデルや、肝障害モデルを OSMR KO マウスに適用することで、in vivo および in vitro での OSM の作用機構を明らかにすることを目的とした。

(2)OSM の直接的な作用を調べるために、肝臓で OSM を発現させる系の確立を目指した。

(3)OSM の標的細胞を明らかにするために、肝

臓構成細胞を細胞種毎に分離する技術の確立と in vitro 培養系の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肥満モデルとしては高脂肪食を、脂肪肝誘導モデルとしてはコリン欠乏食をそれぞれ採用し、OSMR KO マウスと野生型マウスにおける反応の違いを、血清検査、肝臓凍結切片の HE 染色や免疫染色、遺伝子発現解析により調べた。

(2) これまでに行なった四塩化炭素による肝障害モデルは肝細胞に直接障害を与えて肝炎を惹起する系であることから、本研究では Concanavalin A (ConA) により直接的に免疫細胞を活性化させる系での検討を試みた。

(3) in vivo における OSM の直接的な作用は OSMR KO マウスでは分からない。そこで、ハイドロダイナミック法により肝臓で OSM を直接発現させる系の確立を試み、そのマウスの解析を行なった。

(4) 肝臓からコラゲナーゼ灌流やメッシング法により、様々な細胞を調製する方法を検討した。また、モノクローナル抗体を用いた細胞分離法の確立を試みた。さらに、in vitro 培養系の確立を試み、野生型マウスと OSMR KO マウスからそれぞれ調製した細胞を用いて OSM の作用を解析した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食投与による肥満モデルでは、OSMR KO マウスは野生型マウスに比べて有意に体重の増加を示し(図1)、肝臓内の脂質量が増加するなど、早期の脂肪肝を引き起こした(図2)。また、この時の肝臓での脂質代謝に関わる複数の遺伝子発現のプロファイルを qPCR で比較した結果、脂質の取り込みや排出に関わるトランスポーター類などには大きな発現変動は見られなかったが、PPAR の発現は野生型マウスに比べて KO マウスで上昇していた。我々はこれまでに OSM は脂肪細胞の分化誘導系において、OSM は脂肪細胞分化を強力に抑制するという結果を報告しており、PPAR の発現が抑制されていたことから、in vivo においても、OSM は PPAR の発現制御を介して脂肪肝を抑制している可能性が強く示唆された。

また、コリン欠乏食においても、高脂肪食の時と同様に OSMR KO マウスでは野生型マウスに比べ、早期に著しい脂肪肝の誘導が認められた。しかしながら、この系においては PPAR の発現には大きな差異は認められなかったことから、高脂肪食とは異なる機序で脂肪肝誘導が亢進しているものと考えられた。

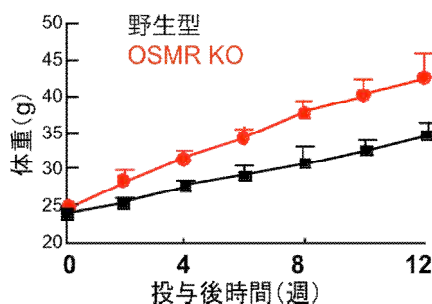


図1 高脂肪食投与後の野生型マウスと OSMR KO マウスの体重変動

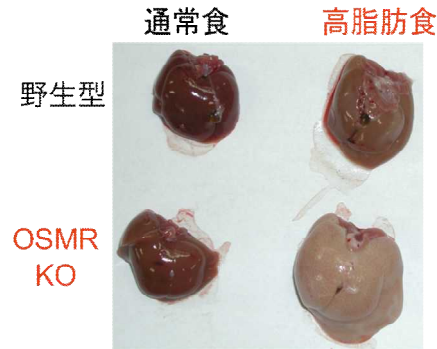


図2 高脂肪食投与後 10 週目の野生型マウスと OSMR KO マウスの肝臓

(2) Concanavalin A (ConA) による肝炎モデルを OSMR KO マウスと野生型マウスを用いて行なった。15mg/kg の ConA を投与した結果、野生型マウスは死ななかったのに対し、KO マウスでは約 3 割のマウスが 8 時間以内に死亡した。生き残ったマウスについて、肝障害マーカーである血中 ALT を測定した結果、OSMR KO マウスでは野生型マウスに比べて有意に高値を示したことから(図3)、死亡したマウスは劇症肝炎により死亡したものと推定された。以上の結果から、OSM は免疫細胞惹起に起因する肝障害モデルにおいても、感受性が高いことが示された。

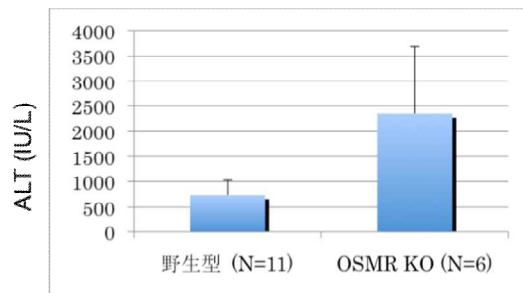


図3 ConA 投与後 12 時間後の野生型および OSMR KO マウスの血中 ALT

(3) これまでの結果は OSMR KO が肝炎や脂肪肝に対して抵抗性が低いことを示したが、野生型マウスにおける OSM の標的細胞や直接的な作用機序は不明である。この点を明らかにするためには、野生型マウスに OSM を投与するか直接 in vivo で OSM を発現させる系の開発が必要となった。そこで、OSM を肝臓で効率的に発現させるためにハイドロダイナミック法の検討を行っ

た。この方法は発現プラスミドを含む液を尾静脈から短時間でインジェクションすることにより、肝臓でのプラスミド cDNA の発現が誘導される系である。OSM cDNA を用いて実際に行なった結果、驚いたことにコントロールプラスミドをインジェクトしたマウスが軽度の肝障害を受けたのに対し、OSM をインジェクトしたマウスでは広範囲の肝障害を誘導した。実際に ALT を測定してみると、OSM をインジェクトしたマウスでは野生型マウスに比べて高値を示し、肝炎が増悪化していることが推測された。さらに、OSM に反応することのない OSMR KO マウスに同様の実験を行なった結果、OSMR KO マウスでは ALT の上昇がほとんど認められず、肝炎がほとんど惹起されなかった。よって、野生型マウスでの肝炎の増悪化は OSM シグナルによるものであることが強く示唆された(図4)。興味深いことに、OSM シグナルを受けた肝臓では PPAR γ の発現が有意に低下していた(図5)。これは OSMR KO マウスで見られた PPAR γ の発現上昇が OSM のシグナル欠損により起こっていた可能性を示唆するものである。

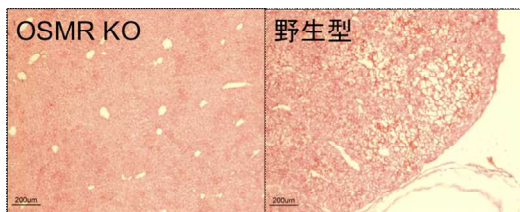


図4 OSM cDNA をハイドロダイナミック法により発現させた OSMR KO マウスと野生型マウスの肝臓 (24 時間後の HE 染色像) 野生型マウスでは広範囲での肝細胞障害が認められた。

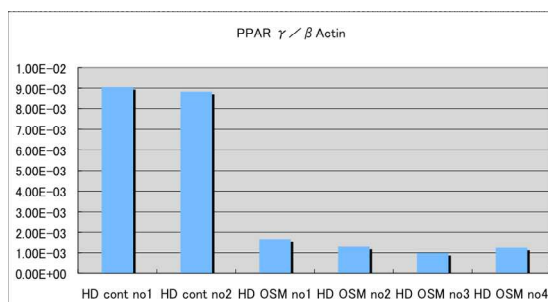


図5 ハイドロダイナミック法によるコントロールプラスミドまたは OSM 発現プラスミド導入後 24 時間後の肝臓における PPAR γ の発現コントロール(N=2) OSM (N=4)

(4) 肝臓には実質細胞(肝細胞)の他に、非実質細胞と呼ばれる類洞内皮細胞、肝星細胞、クッパー細胞、胆管上皮細胞など様々な細胞種が存在する。これらの細胞の中で、どの細胞が OSM の標的細胞であるかを調べるためには、細胞を分離する必要がある。そこで、細胞の分離方法の確立を試みた。肝臓をコラゲナーゼ灌流

した後に、密度勾配遠心法により肝星細胞の分離を試みた。また、抗 p75NTR 抗体を用いたセルソーターによる細胞分離も試みた。その結果、いずれの方法でも肝星細胞を分離することができた。肝星細胞は肝障害時に線維化の原因となる重要な細胞であることが知られている。正常時にはビタミン A を貯蔵することで比重が軽く、密度勾配遠心法で分離可能だが、線維化時にはビタミン A を放出することから、同法は適用できない。抗 p75NTR 抗体による分離法は線維化時も適用できるため、活性化時の星細胞の性状を調べるために有用であると考えられた。一方、抗 Stab2 抗体や抗 Lyve1 抗体を用いて類洞内皮細胞を分離することにも成功した。

さらに、これらの細胞を in vitro 培養するための培養条件を検討した。類洞内皮細胞は ITS と VEGF, basic FGF を添加することにより、少なくとも1週間は形態を保ったまま培養することができた。そこで、野生型マウスと OSMR KO マウスの肝臓からそれぞれ調製した類洞内皮細胞と肝星細胞の培養系に OSM を添加し培養7日目に観察した(図6)。その結果、野生型マウスの肝臓より調製した肝類洞内皮細胞と肝星細胞では著しい形態変化と活性化が誘導されたが、KO マウスから調製した細胞では活性化は見られなかった。よって、OSM 受容体はこれらの非実質細胞にも発現しており、OSM シグナルを受け活性化することが示された。また、OSM はこれら非実質細胞を介して肝脂肪化や炎症に関与している可能性が示された。

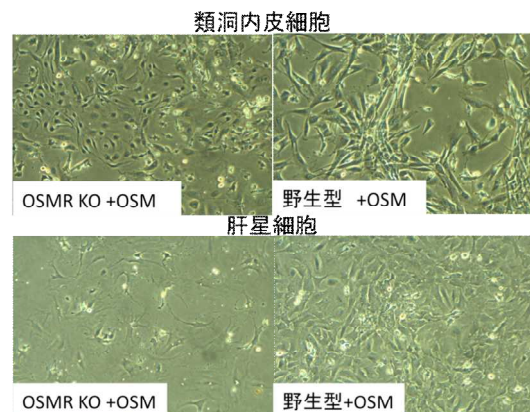


図6 野生型マウスと OSMR KO マウスの肝臓から調製した類洞内皮細胞と肝星細胞の in vitro 培養(OSM を添加後1週間の形態) 類洞内皮細胞と肝星細胞は OSM の刺激により著しい形態変化と増殖が認められた。

(5) 今後の展望

本研究により、OSM が様々な肝障害時に誘導され、炎症や脂肪化などに積極的に関与していることが示された。また、OSM が作用する細胞は肝細胞のみならず、肝星細胞や類洞内皮細胞などの非実質細胞にも及ぶことが示唆された。

今回は平常時の野生型マウス肝臓から非実質細胞を調製して OSM の作用を検討したが、今後は肝障害時の非実質細胞を単離して、性状解析を行いたい。その際、抗 p75NTR 抗体による肝星細胞の単離法が有効となろう。

また、脂肪化における OSM の1つの作用機序は PPAR γ の発現を抑制することであると考えられた。しかし、コリン欠乏食での実験からその他の作用機序の存在も示唆されたためさらなる解析が必要と考える。また、ハイドロダイナミック法により OSM を発現させた際に、予想に反して肝障害の増悪化が認められた。これはハイドロダイナミック法で用いたプラスミドのプロモーターが強力過ぎて、一過性に生理濃度を超える OSM が発現したためと考えている。今後はより発現量の低いプラスミドを用いることにより、免疫機構を中心とした解析法で OSM の生理的な作用を追求したいと考えている。これらの解析により、新たな疾患治療の標的となる分子が見つかることを期待している。

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 5 件)

Okabe M*, Tsukahara Y*, Tanaka M*†, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, and Miyajima A. *: equally contribution, †: corresponding author. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers. *Development* 136(11):1951-60. 2009 査読有り

Suzuki K*, Tanaka M*, Watanabe N, Saito S, Nonaka H, Miyajima A *: equally contribution. p75 neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology*. 135(1):270-281. 2008 査読有り

Hams E et al. (計 11 人、7 番目) Oncostatin M receptor-beta signaling limits monocytic cell recruitment in acute inflammation. *J. Immunology*. 181(3):2174-80. 2008 査読あり

Hamada T et al. (計 12 人 9 番目) Oncostatin M gene therapy attenuates liver damage induced by dimethylnitrosamine in rats. *Am. J. Pathol.* 171, 872-881, 2007. 査読有り

Nonaka H., Tanaka M., Suzuki K. and Miyajima A. Development of murine hepatic sinusoidal endothelial cells characterized by the expression of hyaluronan receptors. *Dev. Dyn.* 236, 2258-2267, 2007. 査読有り

[学会発表](計 2 件)

田中稔

抗 p75NTR 抗体を用いた胎生肝臓における間葉系前駆細胞の分離・同定

BMB2007(日本分子生物学会・日本生化学会合同大会) 2007年12月12日 神戸

田中稔

肝幹細胞の分離と性状解析

肝細胞研究会 2008年6月28日 静岡

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 稔 (MINORU TANAKA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任講師

研究者番号：80321909

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし