

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 - 2008
 課題番号：19590785
 研究課題名 (和文) 劇症肝炎患者血漿中の肝細胞再生関連因子の同定とその生物活性に関する基礎的研究
 研究課題名 (英文) Identification and characterization of hepatocyte regenerative factor in the plasma of patients with fulminant hepatitis
 研究代表者
 滝川 康裕 (TAKIKAWA YASUHIRO)
 岩手医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：50254751

研究成果の概要：極めて予後不良な劇症肝炎の救命率を改善するためには、この疾患で肝再生を担っている肝幹/前駆細胞の至適増殖条件を見出し、人工肝補助によりその環境を達成することが必要であるとの考えに基づいて、マウス肝幹/前駆細胞の細胞生存、増殖に対し劇症肝炎血漿が与える影響を検討した。劇症肝炎血漿は同細胞を刺激 (JNK リン酸化を促進) することにより、細胞生存に作用していることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,900,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：消化器病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：劇症肝炎、肝再生、肝幹/前駆細胞、アポトーシス、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎の内科的救命率は 30%程度で肝移植の 70%に遠く及ばないため、救命のためには肝移植に頼らざるを得ないのが現状である。しかし、臓器不足や救命後の QOL などの点から内科的救命率の向上が緊急の課題である。劇症肝炎亜急性型の病態は広汎な肝細胞死と肝再生不全であり、内科的救命率向上には肝細胞死の制御と肝細胞再生促進治療の開発が不可欠である。

肝は本来再生能に富んだ臓器であり、事実、肝切除後の速やかな再生が実験的にも臨床

的にも確認されている (Science 1994;263:1149)。肝 2/3 切除や軽度の肝障害の修復では成熟肝細胞の 1-2 回の分裂で容易に臓器修復が達成されることが判明しているが、劇症肝炎のような広汎肝細胞死では残存成熟肝細胞が少ないため、いわゆる「幹/前駆細胞」の増殖・分化による組織再生が必要であると考えられている (Liver 2001;21:237)。さらに、「幹/前駆細胞」の増殖促進環境は成熟肝細胞とは異なっており、両者が同時に増殖することは少ないことが知られている (Hepatology 2004;39:1477)。

事実、劇症肝炎患者血清中には肝細胞増殖因子 (HGF) が高濃度に存在するにもかかわらず、肝再生は著明に障害されており、劇症肝炎患者血漿は再生肝細胞の増殖環境として不適切と考えられる。従って、劇症肝炎の内科的救命のためには、「幹/前駆細胞」の細胞生存・増殖条件に関する細胞生物学的研究が必要と考えられる。

2. 研究の目的

劇症肝炎亜急性型の救命率を向上させることを最終目的として、劇症肝炎患者の血漿が、肝幹/前駆細胞の生存・増殖に与える影響とその機序を検討することを本研究の課題とした。

3. 研究の方法

マウスの肝幹/前駆細胞株を劇症肝炎患者血漿下で培養し、①生細胞数の変化、アポトーシス細胞数の変化、②細胞内の細胞生存や増殖に関わるシグナル伝達、③JNK シグナルを抑制した際の細胞数の変化を検討した。具体的な手法を以下に示す。

(1) 細胞

東京大学 宮島篤教授らが、成熟 C57BL/6 マウスから EpCAM を表面マーカーとして分離樹立した肝幹/前駆細胞株 HSCE の供与を受け、実験に供した。細胞は containing 10% fetus bovine serum (FBS), 10mM nicotinamide, 2mM L-glutamine, 10^{-7} M dexamethasone, 0.2mM ascorbic acid, 20mM Hepes, 1mM Na pyruvate, 0.15% NaHCO₃, 14mM glucose, 50 μ g/mL gentamicin, HGF, EGF を含む William's E medium で培養した。細胞の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。また、細胞を 30% 劇症肝炎患者血漿、30% 健康人血漿、10 ng/ml HGF, 50 ng/ml EGF をそれぞれ含む William's E medium で刺激後、生細胞数、アポトーシス、細胞内シグナル伝達蛋白のリン酸化の変化を経時的に評価した。

(2) 生細胞数の評価

生細胞数は SF 試薬 (Nakarai Tesque Inc) を用いて測定した。当試薬は主成分として 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt を含み、この成分は細胞内の脱水素酵素により可溶性の Formazan 色素を生成することを利用し、生成した同色素濃度を 450 nm 吸光度により定量することにより細胞数を間接的に定量するものである。また、JNK 阻害薬 S600125 (Sigma-Aldrich Inc) を用いて JNK 活性阻害後の生細胞数の変化も確認した。

(3) アポトーシスの評価

アポトーシス細胞は

4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma - Aldrich Inc) 染色後、蛍光顕微鏡により同定・計測し、全細胞数に対する比率 (AI%) として示した。

(4) 細胞内シグナル伝達蛋白のリン酸化

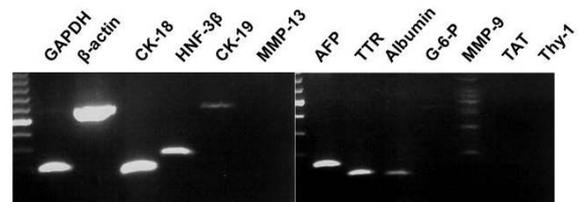
細胞生存、増殖、アポトーシスの代表的シグナル伝達物質である ERK, AKT, p38 MAPK (p38), JNK, I- κ B α および STAT3 のリン酸化 (p-) を Bio-Plex suspension array system (BioRad Laboratory Inc.) を用いて定量した。また、JNK のリン酸化に関しては、Western blot 法を用いて確認した。

4. 研究成果

(1) HSCE 細胞の mRNA 発現

定常状態の HSCE 細胞は、肝細胞、胆管細胞それぞれの主たる細胞骨格である CK18, CK19 いずれも発現し、肝細胞の生成する胎児蛋白である AFP、成熟肝細胞の生成する蛋白である Albumin, HNF-3 β を発現する一方で、高度分化肝細胞の指標である glucose-6-phosphatase (G-6-P), metalloproteinases (MMPs), and tyrosine aminotransferase (TAT) の発現は見られなかった (図 1)。細胞を Matrigel 内で oncostatin M を用いて刺激し、成熟肝細胞に分化させると、AFP, CK-19 の発現が消失し、G-6P, TAT の発現が見られたことから、HSCE 細胞は肝幹/前駆細胞としての性質を有していることが確認された。

図 1.



(2) 劇症肝炎血漿刺激後の生細胞数の変化

HSCE を健康人および劇症肝炎血漿で刺激すると、いずれにおいても生細胞数は 24 時間後に 300% 程度に増加したが、健康人血漿刺激では 48 時間後に 200%、72 時間後に 155% と急激に低下した。これに対し、劇症肝炎血漿刺激では 48 時間後 347%、72 時間後 288% と生細胞数を維持した (図 2)。

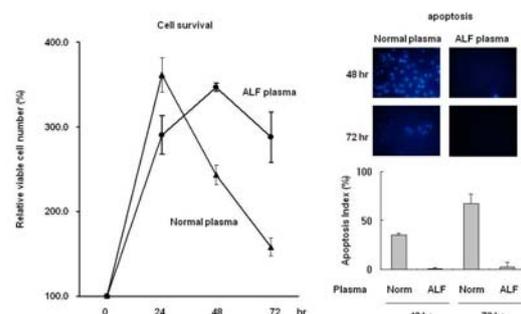


図 2

アポトーシス細胞 (AI%) を見ると、正常血漿刺激では 48 時間後に 35%、72 時間後 66% と著明に増加したのに対し、劇症肝炎血漿ではそれぞれ 0.6%、2.5% とほとんど認められなかった。また、72 時間後の生細胞の mRNA 発現を見ると定常状態と変化なかった (図 2)。

(3) シグナル伝達蛋白のリン酸化

血漿および EGF, HGF 刺激後のシグナル伝達蛋白のリン酸化の変化を見ると、劇症肝炎血漿刺激は HGF 刺激と同様の変動を示し、p-AKT, p-ERK が一過性に高度に増加した (図 3)。

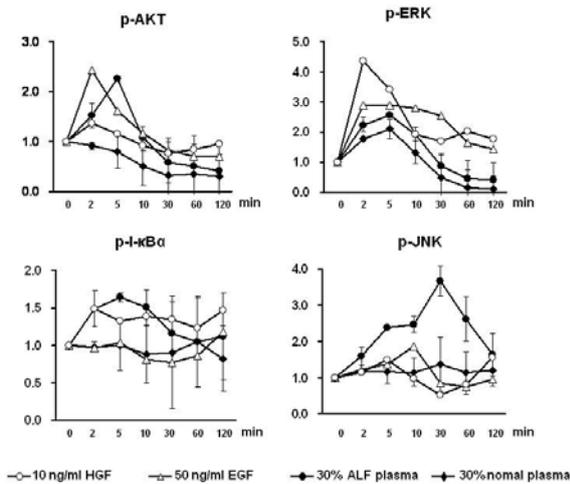
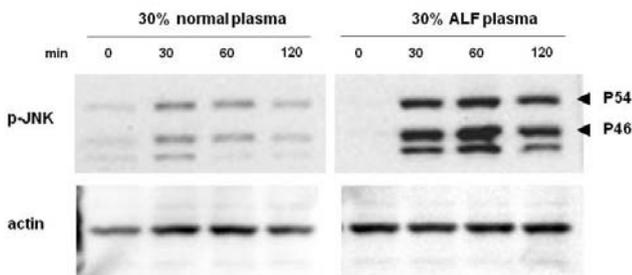


図 3

これに対し、JNK は劇症肝炎血漿刺激後でのみ約 3.7 倍 (60 分後) に増加した。この変化は Western blot 法でも同様に確認された (図 4)。

図 4



(4) JNK 阻害の生細胞数に対する影響

JNK 阻害薬投与下で血漿刺激後の生細胞数の変化を検討すると、JNK 阻害薬非投与下で認められた、劇症肝炎の生細胞数維持効果は約半分程度に抑制された (図 5)。

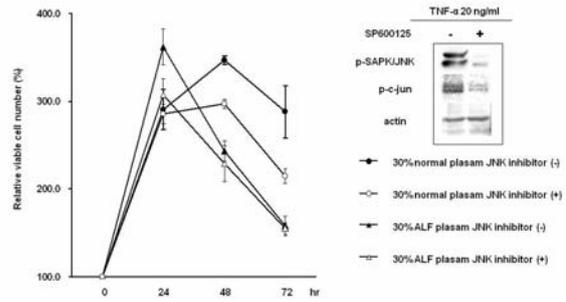


図 5

(5) まとめ

以上の研究結果から、劇症肝炎患者血漿はマウス肝幹/前駆細胞に対し、細胞生存を促進する作用があり、その作用は JNK を活性化する経路に依存していることが判明した。劇症肝炎の肝再生を促して救命につなげるという当初の研究目的から、次の段階として劇症肝炎患者血漿中の JNK 活性化物質の検索に進むべきと考えられた。

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 6 件)

1. Kakisaka K, Takikawa Y, Onodera M, Wang T. The influence of plasma of acute liver failure patients on survival of a mouse stem/progenitor cell line. *J Iwate Medical Assoc* 2009; 57: in print.
2. Nagata Y, Maesawa C, Tada H, Takikawa Y, Yashima-Abo A, Masuda T. Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. *Int J Mol Med* 2009: In print.
3. Takikawa Y, Suzuki K. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan. *Hepatol Res* 2008;38(Suppl. 1):S14-S-18.
4. Shiv Kumar Sarin, Ashish Kumar, Yasuhiro Takikawa, 他 22 名. Acute on chronic liver failure (ACLF): Consensus recommendations of the asian pacific association for the study of the liver (APASL). *Hepatol Int* 2008 in print.
5. Sainokami S, Abe K, Sato A, Endo R, Takikawa Y, Suzuki K, Okamoto H. Initial load of hepatitis B virus (HBV), its changing profile and precore/core promoter mutations correlate with the severity and outcome of acute HBV infection. *J Gastroenterol* 2007;42: 241-249.

6. Yasumi Y, Takikawa Y, Endo R, Suzuki K. Interleukin-17 as new marker of severity of acute hepatic injury. Hep Res 2007;37:248-254.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Kakisaka K, Takikawa Y, Inoue E, Onodera M, Lin SD, Suzuki K. Fulminant hepatic failure plasma suppresses cell proliferation and activates JNK phosphorylation in mouse liver stem/progenitor cells. AASLD San Francisco, USA, Nov. 1-4, 2008.
2. Kakisaka K, Takikawa Y, Inoue E, Onodera M, Lin SD, Suzuki K. A comprehensive analysis of cell survival and the proliferation signals in hepatocyte: effects of growth factors, Fas ligand, bile acids and fulminant hepatic failure plasma. APASL Seoul, Korea, March 23-26, 2008.
3. Takikawa Y, Suzuki K. Five cases with ACLF. APASL working party on acute on chronic liver failure. Live-data share and consensus developing meeting. New Delhi, India, Jan. 22-23, 2008.
4. Takikawa Y, Suzuki K. Differentiation of ACLF from ALF, SAHF and GLF. APASL working party on acute on chronic liver failure. Live-data share and consensus developing meeting. New Delhi, India, Jan. 22-23, 2008. (New Dehli)
5. Takikawa Y, Suzuki T. The Effect of Artificial Liver Support on Acute Liver Failure. APDW 2007 年 10 月 16 日（於神戸）
6. Takikawa Y, Suzuki T. Clinical epidemiology of fulminant hepatitis in Japan. 6th JSH Single Topic Conference. 2007 年 9 月 28 日（於盛岡）.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝川 康裕 (TAKIKAWA YASUHIRO)
岩手医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50254751

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：10326647