

平成 23 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791284

研究課題名 (和文) 線維芽細胞の起源探求による肝線維化克服のための新たな治療戦略の開発

研究課題名 (英文) Development of a novel treatment strategy for liver fibrosis by exploring the origin of fibroblast

研究代表者

田浦 康二郎 (TAURA KOJIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80378629

研究成果の概要 (和文)：

肝線維化における線維芽細胞の起源を調べることは、肝線維化を克服するためのキーステップである。我々はコラーゲンプロモーター下にGFPを発現するマウス (以下Coll GFPマウス) を用いて肝線維芽細胞起源の探求に挑んだ。これまで肝線維芽細胞の起源と考えられていた肝星細胞とは極めて異なる形態 (小型球形) を示すGFP陽性細胞が観察された。Flow cytometryでも肝星細胞分画と一線を画した分画にGFP陽性細胞が現れた。肝線維化における新たな線維芽細胞起源の候補として注目される。

研究成果の概要 (英文)：

To investigate the origin of hepatic fibroblasts, we utilized the transgenic mice which express GFP under collagen type 1 promoter (Coll GFP mice). In fibrotic livers, several kinds of collagen expressing cells were found in addition to the hepatic stellate cells, which are believed to be the principal source of hepatic fibroblasts. It was noteworthy that there were small and round-shaped collagen-expressing cells with distinct morphology from hepatic stellate cells. Flow cytometry also demonstrated a GFP(+) cell fraction other than hepatic stellate cells. Although it has not been fully characterized yet, it could be a novel fibrogenic cells in the liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝線維化、線維芽細胞、星細胞、幹細胞、肝卵形細胞

1. 研究開始当初の背景

肝線維化の病態生理に関する研究は数多くあるが、肝線維化において線維を産生する線維芽細胞の由来については未だ議論が尽きない「古くて新しい問題」である。これまで肝細胞と類洞内皮細胞の間に存在している星細胞が活性化して線維芽細胞となるという考えが支配的であったが、門脈周囲に存在

するとされる portal myofibroblast、骨髄由来の fibrocyte、さらに肝細胞が epithelial mesenchymal transition (EMT) と呼ばれる形質変化を起こし線維芽細胞へと変化するという説が浮上してきた。私は 2008 年 3 月まで肝線維化の研究では第 1 人者である University of California San Diego 校の David Brenner 博士のもとで線維芽細胞由来

についての研究を行った。Collagen promoter 下に GFP を発現する（コラーゲンを発現する細胞が GFP を発現し緑色にマーキングされる）トランスジェニックマウス(Coll1 GFP マウス)を活用して研究を行い、肝細胞が EMT を起こして線維芽細胞になることはないことを証明した。また同研究を行う過程で線維芽細胞の幹細胞が存在する可能性があると考え、研究を行った。

2. 研究の目的

Coll1 GFP マウスを用いて、肝線維芽細胞起源の探究を行う。

3. 研究の方法

(1) Coll1 GFP マウスの breeding

私が UCSD 留学時に用いていた Coll1 GFP マウスを輸入し、実験に必要な数を得るための breeding を行った。以下の実験は同マウスの実験により行われた。

(2) 肝線維化の誘導

肝線維化の誘導は、上記の Coll1 GFP マウスに四塩化炭素 (0.5ul/g 体重) を 12 回 (週 2 回 6 週) 腹腔内投与することにより行った。

(3) 肝臓非実質細胞の分離

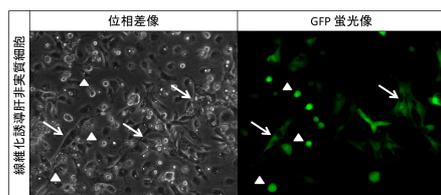
Coll1 GFP マウスの正常肝あるいは線維化誘導肝より、2 段階のコラゲナーゼ、プロテアーゼ処理を行い、そのうち密度勾配遠心法を用いて、肝臓の非実質細胞を分離培養した。

4. 研究成果

(1) 線維化誘導肝には星細胞以外にもコラーゲンを発現する細胞が存在する。

まず我々は、星細胞が定説通り真に唯一の線維芽細胞の起源であるかどうかについて検討を行った。星細胞の特徴として、①細胞質に突起を有している、②細胞質内にビタミン A (脂肪滴) を有する、③種々の肝線維化刺激により活性化する、④活性化した星細胞は増殖し、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを産生する、という特徴を有する。実験動物における代表的な肝線維化誘導モデルである四塩化炭素の腹腔内投与を行ったマウスの非実質細胞を分離したところ、図 1 に示すように上述の要素を満たす星細胞と考えられる細胞が多数認められる (図 1 中の矢印)。しかし同時に、コラーゲンを発現するものの上述の星細胞の特徴とは明らかに異なる、小型円形の Coll1 GFP 陽性細胞が多数観察された (図 1 中の矢頭)。

図1 線維化誘導肝における小型円形Coll1 GFP陽性細胞の出現



(2) 小型円形 Coll1 GFP 細胞の免疫細胞学的特徴

免疫細胞学的特徴

これらの細胞の免疫細胞学的特徴を明らかにするために、細胞免疫染色を行った。このような形態を持つ細胞でコラーゲンを発現しうる細胞の候補として骨髄由来の fibrocyte と肝前駆細胞として知られる oval cell (肝卵形細胞) を念頭に性質を調べた。結果、小型円形 Coll1 GFP 陽性細胞のほとんどは oval cell の特異的マーカーである A6 抗原が陽性であったのに対し、fibrocyte のマーカーである CD45 は陰性であった (図 2、図 3)。

図2 小型円形細胞はほとんどの細胞がA6抗原陽性である

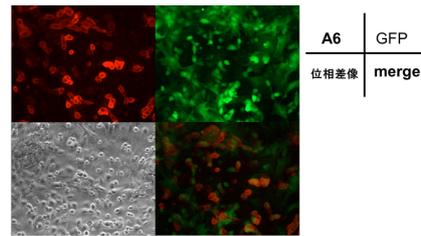
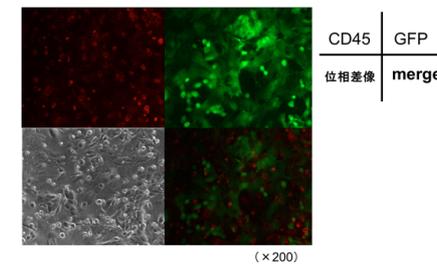


図3 小型円形細胞はCD45陰性である (×200)

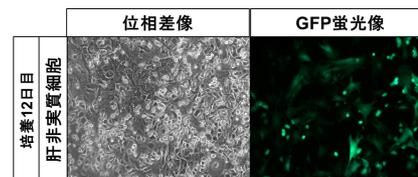


これらの結果より、肝線維化誘導に伴って現れる小型円形 Coll1 GFP 陽性細胞は oval cell である可能性が示唆された。これまで oval cell は肝細胞、胆管細胞への分化は示されているものの、線維芽細胞への分化の報告はない。

(3) 線維化非誘導肝における、小型円形 Coll1 GFP 陽性細胞の出現

これらの細胞が線維化誘導前に肝臓内に存在していた細胞なのか、あるいは線維化誘導刺激によって肝臓外から移動してきた細胞なのかを調べるために、肝線維化非誘導 Coll1 GFP マウスの肝非実質細胞を分離した。結果、培養を継続すると線維化誘導 Coll1 GFP マウスの肝非実質細胞と同様に、突起をだす線維芽細胞の他に、小型円形のコラーゲン陽性細胞が多数観察された (図 4)。

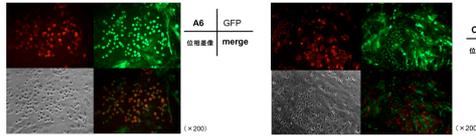
図4 肝線維化非誘導マウスの肝非実質細胞



すなわちこれらの細胞は、肝線維化誘導前か

ら肝臓内に存在した細胞であることが示唆された。次に前項で示された免疫細胞学的性質があるかどうかを調べるために、同じく A6 抗原、CD45 による細胞免疫染色を行った。結果図 5 に示す如く、これらの細胞は肝線維化誘導肝でみられた細胞と同様に、A6 抗原陽性、CD45 抗原陰性という結果であった。

図5 肝線維化非誘導マウス肝における小円形Coll GFP 陽性細胞においても A6 陽性 CD45 陰性であった。

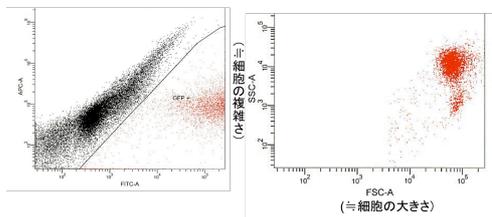


(4) 線維化誘導肝非実質細胞における、GFP 陽性細胞の characterization と特定細胞集団の分離培養

我々は線維化誘導時に、肝非実質細胞分画中に小型円形 Coll GFP 陽性細胞が存在し、かつ免疫細胞学的に oval cell である可能性を考えたが、そもそも肝線維化においてコラーゲンを発現している細胞は（既知の星細胞と我々が確認した小型円形細胞の他にも）どれだけの種類の細胞が存在しており、それらはどのように分類可能であるのかという未だ解決されていない問題と直面せざるを得なかった。

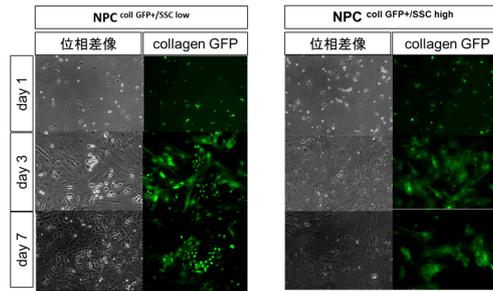
そこで我々は線維化誘導肝の非実質細胞分画を Fuluorescent Activated Cell Sorting (FACS) によって分離し培養を行った。FACS 装置には蛍光による分離のほか、レーザー光線の直進、散乱を検知する forward scatter と side scatter により細胞を分離可能である。forward scatter (前方散乱、以下 FSC) は細胞の大きさ、表面積を表し、side scatter (側方散乱、以下 SSC) は細胞密度、細胞内部構造の複雑さを反映する。図 6 の左図において、まず線維化誘導肝の非実質細胞分画から GFP 陽性細胞を分離する。そして Coll GFP 陽性細胞を FSC(細胞の大きさ)および SSC(細胞の内部構造の複雑さ)により分離したのが図 6 の右図である。

図6 Collagen GFP 陽性細胞はSSC(細胞内部構造の複雑さ)によって2群に分類できる。



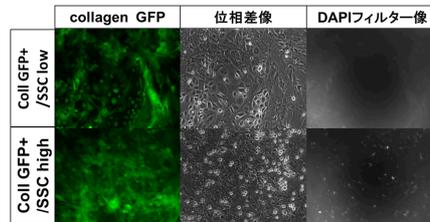
見て明らかなように細胞は 2 群に分類可能である。この 2 群において、細胞の大きさ (FSC) には各群多少のばらつきはあるものの、大きな違いはなく、細胞の複雑さ (SSC) によって分けられることが特徴的である。そこでこの SSC の高い群 (NPC coll GFP+/SSC high) と SSC の低い群 (NPC coll GFP+/SSC low) を分離し培養実験を行った (図 7)。

図7 Coll GFP陽性分画のSSCによる分離



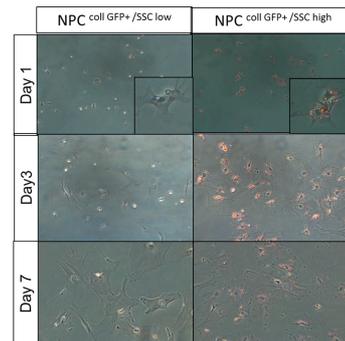
まず前項で我々が確認した小型円形 Coll GFP 陽性細胞は SSC low の分画に現れた。一方両方の分画において突起をだす細胞が確認された。次にこれらの細胞分画の差 (SSC の差) が何によるものなのかを明らかにするために、詳細に細胞観察を行った。位相差像ならびに GFP 蛍光像では両方の突起を有する細胞には明らかな相違を見いだせなかったものの、DAPI 蛍光フィルターを用いることにより両群間には明らかな細胞自家蛍光の違いがみられた (図 8)。

図8 SSCの相違は細胞内顆粒の有無によるものである。



詳細に細胞を観察すると、これらの自家蛍光は細胞質に含まれる細胞内顆粒によるものであることを確認した。肝非実質細胞に含まれる自家蛍光であることより、この細胞内顆粒がビタミン A 脂肪滴であると予測し、脂肪染色である Oil O Red 染色を行った (図 9)。

図9 SSCの違いは細胞内脂肪滴の違いである



予想のごとく、SSC high の群には、赤く染まる細胞内顆粒がみられたのに対し、SSC low の群には脂肪滴を含む細胞は見られなかった。SSC high 分画に関しては、①線維化誘導非実質細胞に含まれる細胞である、②突起を有する細胞である、③コラーゲンを発現している、④細胞内に脂肪滴を有するという特徴

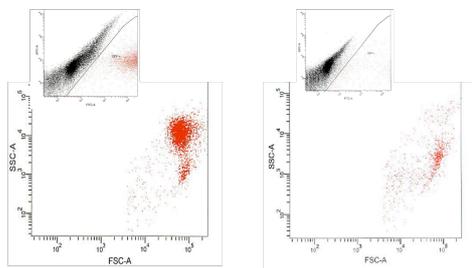
であることから、星細胞であると考えられる。一方 SSC low 分画の細胞に関しては、コラーゲンを発現している、細胞内に脂肪滴を持たないという共通した特徴をもつものの、その形態学的特徴は小型円形細胞から突起を有するものまで様々であることが観察され、さらなる亜分画に分類されることが示唆された。

(5) 線維化非誘導肝非実質細胞における GFP 陽性細胞の characterization

線維芽細胞起源についての諸説の中には、骨髄由来の細胞が大きな役割を果たすという説がある。我々は第2項において、小型円形細胞が fibrocyte の特異的マーカーである CD45 を発現しないことを示したが、前項にみた SSC の2群がそれぞれ線維化誘導前に肝臓内に存在する細胞か否かを調べるために、線維化を誘導していないマウスの肝非実質細胞を分離し、FACS により解析を行った(図10)。SSC low 分画については線維化誘導肝と同様にみられたものの、SSC high 分画(星細胞分画)については、ほとんど認めなかった。つまり GFP 陽性細胞分画中の細胞内顆粒(脂肪滴)を有さない細胞に関しては、線維化誘導前より肝臓内に存在し、かつコラーゲン発現細胞であることが判明した。

再掲 図6 線維化誘導肝の非実質細胞。

図10 線維化非誘導肝ではSSC highの分画がほとんど見られない。



(6) まとめ

我々は本研究において、線維化誘導 コラーゲン GFP マウス肝臓から細胞を得、GFP 発現強度、細胞形態により肝非実質細胞を FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) により分離培養した。その結果 GFP 陽性細胞は、その細胞の内部構造により2種類に分離されることが判明した。内部構造に細胞内顆粒(脂肪滴)をもつ細胞群は、星細胞であると考えられる。一方、内部構造に顆粒を持たない分画は、数種類の細胞が混ざっている可能性もあるものの、一部の細胞は表面抗原マーカーとして A6 抗原が陽性であるものが存在していることから、肝前駆細胞として知られる肝卵形細胞などの可能性を考えている。であった。

また我々は同様の細胞が、線維化誘導前に肝臓内に存在する細胞か否かを調べるために、

線維化を誘導していない細胞において同様の実験を行った。星細胞分画については、ごく少数を認めるのみであったものの、GFP 陽性細胞分画中の細胞内顆粒を有さない細胞に関しては、線維化誘導前より肝臓内に存在することが判明した。線維芽細胞起源についての諸説の中には、骨髄由来の fibrocyte が大きな役割を果たすという説があるが、我々の実験結果からは、この説は否定的であった。

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18件)

- ① Kitamura K, Hatano E, Higashi T, Taura K (13人中7番目) Prognostic value of (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in patients with extrahepatic bile duct cancer. JHepatobiliary Pancreat Sci. 査読有, 18巻, 2011, 39-46.
- ② Yamanaka K, Hatano E, Narita M, Taura K, (10人中8番目) Olprinone attenuates excessive shear stress through up-regulation of endothelial nitric oxide synthase in a rat excessive hepatectomy model. Liver Transplantation. 査読有, 17巻 2011, 60-69.
- ③ Akasaka T, Shibata T, Isoda H, Taura K (7人中4番目) Septic complication after balloon-occluded retrograde transvenous obliteration of duodenal variceal bleeding. Cardiovasc Intervent Radiol. 査読有, 33巻, 2010, 1257-61.
- ④ 田浦康二郎, 波多野悦朗, 金井雅史, 上本伸二 (4人中1番目) 【一般外科医が知っておくべき胆道癌外科治療の現状】胆道癌補助療法の実際、査読有、外科治療、102巻、2010、251-257
- ⑤ Taura K, Miura K, Iwaisako K, Osterreicher CH (7人中1番目) Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. Hepatology, 査読有, 51巻, 2010, 1027-36.
- ⑥ Kanai M, Yoshimura K, Tsumura T, Taura K (23人中11番目) A multi-institution phase II study of gemcitabine/S-1 combination chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer. Cancer Chemother Pharmacol 査読有, 2巻, 2010, 55-62.

- ⑦ 波多野悦朗, 田浦康二朗, 安近健太郎, 新田隆士, 寺嶋宏明, 上本伸二 (6人中2番目) 【手術機器の使い方 基本と応用】開腹手術用機器 CUSA、手術、査読有、64巻、2010、751-756.
- ⑧ 波多野悦朗, 中村公治郎, 田浦康二朗, 上本伸二 (4人中3番目) 診断・治療支援の部 転移性肝がんにおける術中造影超音波検査の意義 INNERVISION 査読有、25巻、2010、64-67.
- ⑨ Kodama Y, Kisseleva T, Iwaisako K, Taura K, (10人中5番目) c-Jun N-terminal kinase-1 from hematopoietic cells mediates progression from hepatic steatosis to steatohepatitis and fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 査読有, 137巻, 2009, 1467-1477.
- ⑩ Kodama Y, Taura K, Miura K, (6人中2番目) Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*. 査読有, 136巻, 2009, 1423-34.
- ⑪ Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, (8人中4番目) CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology*. 査読有, 50巻, 2009, 185-97.
- ⑫ Osterreicher CH, Taura K, De Minicis S, Seki E, (11人中2番目) Angiotensin-converting-enzyme 2 inhibits liver fibrosis in mice. *Hepatology*. 査読有, 50巻, 2009, 929-938.
- ⑬ Narita M, Hatano E, Arizono S, Taura K, (11人中7番目) Expression of OATP1B3 determines uptake of Gd-EOB-DTPA in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 査読有, 44巻, 2009, 793-8.
- ⑭ Narita M, Hatano E, Ikai I, Taura K, (9人中8番目) A phosphodiesterase III inhibitor protects rat liver from sinusoidal obstruction syndrome through heme oxygenase-1 induction. *Ann Surg*. 査読有, 249巻, 2009, 806-13.
- ⑮ 田浦康二朗 (1人中1番目) ミラノ基準を満たす肝細胞癌 293例に対する肝切除成績の検討 肝硬変が予後に与える影響 肝臓フォーラム記録集、査読有、2009、211-221.
- ⑯ 安近健太郎, 猪飼伊和夫, 加茂直子, 田浦康二朗 (7人中4番目) 【肝胆膵; 難治がん】に挑む-分子標的治療時代の到来【肝臓分野: 高度進行肝細胞がんに対する外科的アプローチ 門脈浸潤を伴う肝細胞癌に対する外科治療 肝・胆・膵、査読有、59巻、2009、751-755.
- ⑰ 田浦康二朗, 猪飼伊和夫, 波多野悦朗, 安近健太郎, 上本伸二 (5人中1番目) 【肝臓 基礎・臨床研究のアップデート】進行性肝癌への外科的治療 日本臨床、査読有、67巻、2009、524-528.
- ⑱ 玉置信行, 田浦康二朗, 波多野悦朗, 猪飼伊和夫, 上本伸二 (4人中2番目) 血小板減少を伴う切除不能肝細胞癌に対し脾摘後の肝動注化学療法が奏効した1例、肝臓、査読有、50巻、2009、185-191.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田浦 康二朗 (TAURA KOJIRO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80378629