

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2010～2012
課題番号：22390152
研究課題名（和文） 肝幹細胞ニッチ制御と骨髄幹細胞の分化誘導に基づく肝再生治療戦略
研究課題名（英文） Regeneration of Fibrotic Liver through Modulation of Hepatic Stem Cell Niche and Differentiation of Bone Marrow Stem Cells
研究代表者 稲垣 豊（INAGAKI YUTAKA） 東海大学・医学部・教授 研究者番号：80193548

研究成果の概要（和文）：肝臓は本来、再生能力に長けた臓器であるが、線維化が進行すると再生が阻害され、十分な回復ができなくなる。この時に駆り出されるのが、肝細胞の源となる「幹細胞」である。我々は、肝線維化の進行と、この幹細胞の動員との関連を握る重要な因子として、幹細胞表面の Notch 受容体に結合する Jagged-1 分子に着目した。Jagged-1 遺伝子を人為的に欠損させたマウスを用いて、Jagged-1 の欠損が正常な肝臓の発達や傷害肝の再生を妨げること、肝臓に線維化を引き起こすことを明らかにした。Notch/Jagged-1 のはたらきを調節することで、肝臓の線維化を抑えて再生を促進する、新たな治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Liver is considered to have a high potential of regeneration, but the presence of fibrosis suppresses the recovery of injured liver. Stem cells are utilized to compensate such impaired regeneration. We have been working on the Notch/Jagged-1 signal to link liver fibrosis and stem cell mobilization. Experiments using Jagged-1 knockout mice have revealed important roles of the signal in the development of normal liver as well as the regeneration of fibrotic liver. These results may eventually contribute to the development of a novel therapeutic strategy that suppresses liver fibrosis and accelerate regeneration of fibrotic liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

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：肝線維化、再生、幹前駆細胞、Notch/Jagged-1 シグナル

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞株の樹立により、幹細胞を各臓器の特異的細胞へと機能分化させる再生医療が現実味を帯びてきたが、幹細胞が移植臓器において分化形質を維持する上での微小環境ニッチの解明は、大きく立ち遅れている。加えて、線維肝の再生を考えるにあたっては、肝線維化と再生の病態連繋の解明のもとに、線維の過剰沈着を抑制しながら肝細胞の再生を促すという、他臓器の再生とは異なる視点に立脚した新たな再生治療の戦略が必要である。

Notch シグナルは、骨髄の造血幹細胞とその支持細胞との cell-cell interaction を通じて、幹細胞ニッチの構築と維持に深く関わることが知られている。本研究代表者は、Notch 受容体リガンドである Jagged-1 遺伝子を欠損させた Conditional ノックアウト (KO) マウスでは、四塩化炭素投与を行わない未処理の状態でも肝細胞壊死を伴わずに星細胞が活性化していることを見出し、肝における幹前駆細胞ニッチの支持細胞とされる星細胞の活性化と Notch シグナルとの関連に注目している。また、同 KO マウスに対して DNA 合成阻害剤である 2-Acetylaminofluorene (2AAF) を前投与した上で 70% 部分肝切除を行うと、野生型マウスの場合とは異なり、門脈域の胆管周囲に CD34 陽性の造血幹前駆細胞の集簇を認めたが、類洞内皮細胞への分化は阻害されていた。

さらに近年、研究分担者の浅原らにより、血管内皮前駆細胞 (EPC) の Notch シグナルが血管新生を促進することが報告された (*Circulation* 118: 157-165, 2008) ことから、類洞構造の修復に基づく肝再生の過程においても Notch シグナルが重要な役割を演じる可能性が強く示唆された。

これら研究代表者および分担者がこれまでに自ら得た知見を統合すると、生体内の cell-cell interaction において重要な役割を演じている Notch シグナルが、肝においても幹前駆細胞とその支持細胞である星細胞とのクロストークを司ることが示唆され、効率よい線維化改善と肝再生を得るには、肝幹細胞ニッチの制御や骨髄由来細胞の分化において Notch シグナルが果たす役割を包括的に解明することが必須であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は、肝線維化と再生の病態連繋における Notch シグナルの役割に着目して、骨髄細胞を線維肝組織へ動員して効率よい線維化改善と肝再生を得るための分子基盤を確

立することを目的とした。

本研究により、自家骨髄細胞の線維肝組織における分化動態や活性化星細胞との細胞間クロストークに及ぼす Notch シグナルの影響が明らかになれば、これを制御することで肝硬変症に対する新たな再生治療戦略の構築へと繋がるのが期待できる。また、現在、再生医療の新たなツールとして注目されているヒト iPS 細胞の場合にも、同細胞由来の肝細胞が線維肝組織に生着して分化形質を安定発現するための肝局所のニッチ制御は必須であり、その制御因子の解明なくして再生医療の実現化は困難である。Notch シグナルによる肝幹細胞ニッチ制御に着目した本研究は、iPS 細胞を利用した肝線維化改善と再生促進治療法を確立する上でも重要な情報と分子基盤を与えるものである。

3. 研究の方法

(1) マウス肝細胞および星細胞の分離と初代培養

野生型マウスの門脈内にカニューレーションを行い、コラゲナーゼ灌流法もしくはコラゲナーゼ・プロナーゼ灌流法を用いて、それぞれ肝実質細胞と星細胞を分離し、これを初代培養に供した。

(2) ウェスタン・ブロット法

初代培養肝細胞および星細胞における Jagged-1 の発現を、ウェスタン・ブロット法により解析した。このうち星細胞については、培養 2 日目の静止期と、7 日目の活性期における発現を比較し、培養に伴う活性化過程における発現変化について検討した。

(3) Conditional Jagged-1 ノックアウトマウス

通常の Jagged-1 ノックアウトマウスは、胎性致死であることが知られている。そこで本研究においては、以下の 3 種類の Conditional Jagged-1 ノックアウトマウスを用いた。

まず 1 番目は、IFN 感受性の Mx 遺伝子のプロモーターを Cre 組換え酵素に連結し、Poly IC もしくは IFN α を投与することで Cre/lox P システムにより Jagged-1 遺伝子を欠損させる Mx/Cre Jagged-1 KO マウスである (図 1 A)。次いで 2 番目は、アルブミン遺伝子のエンハンサー・プロモーターを用いて肝細胞特異的に Jagged-1 遺伝子を欠失させる Alb/Cre Jagged-1 KO マウス (図 1 B)、最後が間葉系細胞において活性化される SM22 遺伝子のプロモーターにより Jagged-1 遺伝子を欠失させる SM22/Cre Jagged-1 KO

マウスである (図 1 C)。

A. Mx/Cre Jagged-1 KOマウス



B. Alb/Cre Jagged-1 KOマウス



C. SM22/Cre Jagged-1 KOマウス



図 1 . 本研究に使用した Conditional Jagged-1 ノックアウトマウス

(4) 組織染色

これらのマウスにおける胆管上皮細胞または肝組織前駆細胞を CK19 染色により、肝線維化の程度をシリウスレッド染色により評価した。

4. 研究成果

野生型マウスの初代培養肝細胞と静止期星細胞では、Jagged-1 の発現はわずかであったが、培養により活性化した星細胞では Jagged-1 発現が著しく亢進していた (図 2)。

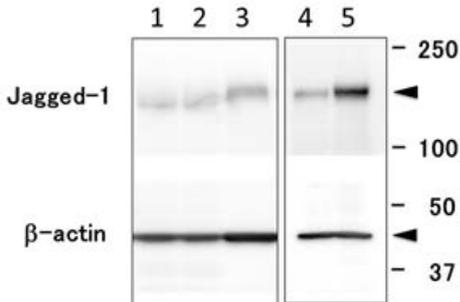


図 2 . 初代培養肝細胞ならびに星細胞における Jagged-1 発現

- レーン 1, 2 : 肝細胞
- レーン 3, 4 : 静止期星細胞
- レーン 5 : 活性化型星細胞

次に、生後間もなく IFN α 投与により全ての肝臓構成細胞で Jagged-1 遺伝子を欠損させた Mx/Cre Jagged-1 KO マウスでは、不規則な胆管増生と周囲の星細胞の活性化、さら

には同部に線維の蓄積が認められた (図 3)。

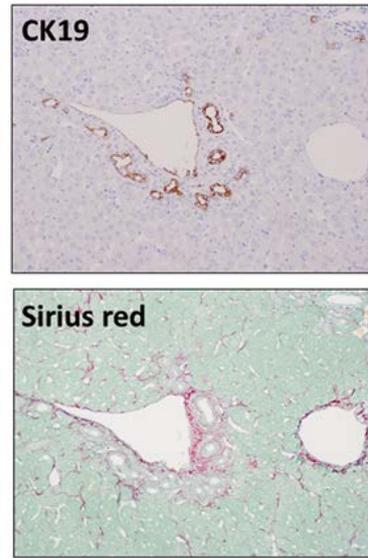


図 3 . Mx/Cre Jagged-1 KO マウスにおける胆管形成異常と肝線維化所見

一方、肝細胞特異的に Jagged-1 を欠損させた Alb/Cre Jagged-1 KO マウスにおいては胆管構造に異常は見られなかったのに対して、門脈域の間葉系細胞特異的に Jagged-1 遺伝子を欠損させた SM22/Cre Jagged-1 KO マウスでは、生直後から門脈周囲に CK19 陽性の不完全な胆管細胞の集簇が見られ、多くのマウスは黄疸の進行により早期に死亡した。一部の生存マウスでは、成体になってからも胆管構造の異常が持続し、その周囲に多数の CD34 陽性細胞が集簇するとともに、著明な線維化所見が認められた (図 4)。

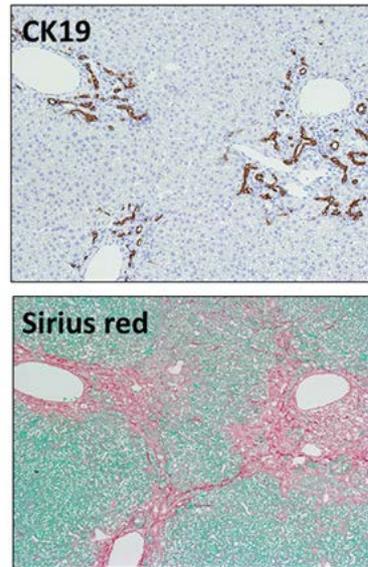


図 4 . SM22/Cre Jagged-1 KO マウスにおける胆管形成異常と肝線維化所見

これらの所見から、間葉系細胞から幹前駆細胞へと伝達されるNotch/Jagged-1シグナルが、肝臓の発達や再生のみならず線維化進展を制御している可能性が示唆され、同シグナルを介する肝線維化と再生の病態連繋が初めて明らかにされた。活性化星細胞におけるJagged-1発現の亢進は、線維化進展に対する防御反応とも考えられ、星細胞が肝幹・前駆細胞ニッチの支持細胞としても注目されていることから、その詳細な調節機構を解明することで、Notch/Jagged-1シグナルを標的とする新たな線維化抑制ならびに肝再生促進治療法の開発が期待される。

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17件)

- ① Inagaki Y, Higashiyama R: Interplay between bone marrow and liver in the pathogenesis of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 42: 543-548, 2012 (査読あり)
- ② Inagaki Y, Higashiyama R, Higashi K: Novel anti-fibrotic modalities for liver fibrosis: Molecular targeting and regenerative medicine in fibrosis therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 27: 85-88, 2012 (査読あり)
- ③ 稲垣 豊, 中尾祥絵、瀧澤友里、他: 肝線維症治療の研究はどこまで進展したか? *肝胆膵* 65: 253-260, 2012 (査読なし)
- ④ Masuda H, Iwasaki H, Asahara T, et al. Development of serum-free quality and quantity control culture of colony-forming endothelial progenitor cell for vasculogenesis. *Stem Cells Transl Med* 1: 160-171, 2012 (査読あり)
- ⑤ Higashiyama R, Nakao S, Inagaki Y, et al. Differential contribution of dermal resident and bone marrow-derived cells to collagen production during wound healing and fibrogenesis in mice. *J Invest Dermatol* 131: 529-536, 2011 (査読あり)
- ⑥ Higashi K, Tomigahara Y, Inagaki Y, et al. A novel small compound that promotes nuclear translocation of YB-1 ameliorates experimental hepatic fibrosis in mice. *J Biol Chem* 286: 4485-4492, 2011 (査読あり)
- ⑦ Masuda H, Alev C, Asahara T, et al. Methodological development of a clonogenic assay to determine endothelial progenitor cell potential. *Circ Res* 109: 20-37, 2011 (査読あり)
- ⑧ Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* 29: 1650-1655, 2011 (査読あり)
- ⑨ Ii M, Takeshita K, Asahara T, et al. Notch signaling regulates endothelial progenitor cell activity during recovery from arterial injury in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 121: 1104-1112, 2010 (査読あり)

[学会発表] (計32件)

- ① Inagaki Y, Sumiyoshi H, Fukumitsu H, et al. Identification of a novel bone marrow cell-derived factor that suppresses fibrogenesis and accelerates regeneration of murine fibrotic liver. 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2012. 11. 12, Boston, MA, U. S. A.
- ② 稲垣 豊: 線維肝の再生における骨髄と肝臓の臓器相関. 第11回日本再生医療学会総会、シンポジウム5「臓器再生の名脇役達—血管再生と炎症・間質組織の生理学的および病理学的役割—」、2012年6月14日、横浜
- ③ 三上健一郎、東山礼一、稲垣 豊、他: Notch/Jagged-1シグナルを介した肝前駆細胞動員と線維化の制御機構. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ21「肝線維化の病態解明と治療への展開」、2012年6月8日、金沢
- ④ 福光 寛、東山礼一、稲垣 豊、他: 骨髄細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用. 第48回肝臓学会総会、ワークショップ15「肝再生、幹細胞研究が臨床医学にもたらす可能性」、2012年6月7日、金沢
- ⑤ Mikami K, Nakao S, Inagaki Y, et al. Notch/Jagged-1 signal modulates pathophysiological correlation between fibrogenesis and regeneration in murine liver. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2011. 11. 7, San Francisco, CA, U. S. A.
- ⑥ 三上健一郎、東山礼一、稲垣 豊: 肝線維化と肝再生の病態連繋におけるNotch/Jagged-1シグナルの関与. 第47回日本肝臓学会総会、ワークショップ10「肝再生医学研究の新展開」、2011年6月3日、東京
- ⑦ Mikami K, Nakao S, Inagaki Y: Notch/

Jagged-1 signal modulates patho-physiological correlation between fibrogenesis and regeneration in murine liver. American Association for the Study of Liver Diseases, Basic Research Single Topic Conference "Stem Cells in Liver Diseases and Cancer", 2011. 3. 19, Atlanta, GA, U.S.A.

- ⑧ 稲垣 豊、東山礼一、三上健一郎：肝線維化と再生の病態連繫における骨髄と末梢の臓器相関. 第17回肝細胞研究会、シンポジウム2「肝幹細胞と肝再生」、2010年6月19日、秋田

[図書] (計1件)

- ① 稲垣 豊、東山礼一、茂呂 忠、他：肝線維化病態に対する分子形態学的アプローチ. 病気の分子形態学. (日本臨床分子形態学会編)、学際企画、東京、2011、p. 109-111.

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

- ① 名称：肝臓線維化抑制剤
発明者：稲垣 豊、茂呂 忠
権利者：学校法人東海大学・株式会社ミノファーゲン製薬
種類：特許
番号：2011-250746
出願年月日：2011年11月16日
国内外の別：国内
- ② 名称：生体組織再生を促進させる薬剤を製造するための加工細胞
発明者：稲垣 豊、東山礼一、東 清史、斎藤幸一
権利者：学校法人東海大学・住友化学株式会社
種類：特許
番号：PCT/JP2011/062556
出願年月日：2011年5月24日
国内外の別：国外
- ③ 名称：生体組織再生を促進させる薬剤を製造するための加工細胞
発明者：稲垣 豊、東山礼一、東 清史、斎藤幸一
権利者：学校法人東海大学・住友化学株式会社
種類：特許
番号：2010-122501
出願年月日：2010年5月28日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

http://www.med.u-tokai.ac.jp/daigakuin/pdf/inagaki_yutaka_2013_04_01.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 豊 (INAGAKI YUTAKA)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：80193548

(2) 研究分担者

浅原 孝之 (ASAHARA TAKAYUKI)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：20246200

(3) 連携研究者

穂積 勝人 (HOZUMI KATSUTO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30246079

