

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 8 月 24 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461008

研究課題名(和文)肝再生不全克服に向けた成熟肝細胞および肝前駆細胞の再生機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on the proliferation mechanism of mature and progenitor hepatocytes for the treatment of impaired regeneration of the liver

研究代表者

滝川 康裕 (Takikawa, Yasuhiro)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：50254751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓が重症の肝障害を負った時に、肝臓の再生を担うのは通常の肝細胞(成熟肝細胞)ではなく、それより未熟な細胞である肝前駆細胞といわれているので、この細胞の増殖に必要な刺激物質あるいは細胞内の刺激伝達経路および臨床的血清マーカーを実験的に検索した。急性肝不全の患者血漿では肝前駆細胞の増殖が引き起こされたが、健常者の血漿では増殖しなかった。その刺激の伝達経路はP2Y受容体、JNKおよびATF2であることを確認した。急性肝不全症例での前駆細胞の動員は血清AFPと比較的強く相関し、マーカーとして有用であった。

研究成果の概要(英文)：Progenitor hepatocyte, but not mature hepatocyte is considered to repair the injured liver in the patients with severe liver injury. We investigated the suitable condition for the proliferation of progenitor hepatocyte (PHC) to reveal the best microenvironment for recovery from acute liver failure (ALF). We found that PHC proliferate under the condition with the existence of the serum from ALF patients. The signal of the proliferation was transduced through P2Y receptor, JNK and ATF2 activation.

We also found that PHC introduced in the liver tissue of the patients with severe liver injury, which was reflected to the elevation of serum AFP levels.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝再生 肝前駆細胞 急性肝不全 AFP

1. 研究開始当初の背景

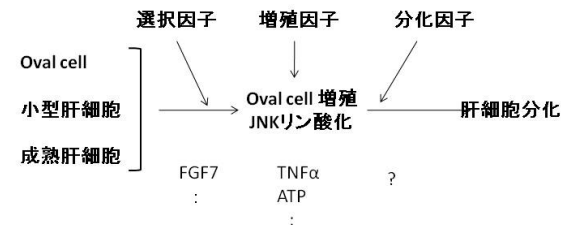
日本で行われる肝移植の90%以上を生体肝移植が占めている。生体肝移植では、ドナーとなる健常人に大きな精神的・肉体的負担を強いる。このような状況で、肝移植を安全に進めるには肝再生機構の解明が欠かせない。また、低迷する急性肝不全の救命率を向上させるためには、肝の再生促進療法の開発が必須である。岩手医大は北東北の肝不全治療の中心的施設として、肝移植も含めた治療を積極的に行っている。このような臨床的あるいは社会的背景に基づいて申請者は、最終的には「病的肝臓における肝再生促進療法の開発」を目指し、その前段階の基礎的研究として本研究を立案した。

肝は本来再生能に富んだ臓器であり、正常の肝臓では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., Radiology 2009;252:426.)。これに対し、急性肝不全や生体肝移植の過少グラフトのような病的肝臓では肝再生不全が認められることも確認され (Liver Int 2006;26:1225-1233., Hepatology 2010;52:715.)、その克服が臨床的に大きな課題となっている。

この課題の克服には、病的な肝臓における肝組織の再生機構に関する基礎的な研究が不可欠であるが、これまでの研究では、部分肝切除モデルを用いた正常肝の再生機構の研究が主体であった。肝組織修復に動員される細胞を見ると、正常肝の2/3切除モデルでは成熟肝細胞の1-2回の分裂で容易に臓器修復が達成されるのに対し、急性肝不全のような広汎肝細胞死では、肝前駆細胞の増殖・分化による組織再生が必要と考えられている (Liver 2001;21:237)。さらに、肝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)。

申請者はこれまで急性肝不全や生体肝移植ドナーの臨床検体(肝組織および患者血清)を用いて、病的肝臓における肝再生機構について基礎的な研究を行い、再生細胞の選択から増殖、成熟肝細胞への分化について下図のような仮説を得ている。

広汎肝細胞死からの肝再生過程(仮説)



本研究ではこの過程を詳細に解析することにより、臨床的な現象を解明するための研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、重症肝障害患者の肝組織中で肝再生に肝前駆細胞が動員されていることを確認する。重症肝障害患者の肝再生に肝前駆細胞が動員されていることを示す血清マーカーとその意義を検討する。肝前駆細胞の増殖シグナルがTNF、細胞外ATPによるJNKリン酸化を介する経路であることを確認する。

3. 研究の方法

1) 肝再生への肝前駆細胞動員

急性肝障害症例で急性期に肝組織を採取できた例を対象として、肝細胞中の前駆細胞マーカーであるCK7を免疫組織化学的に染色、重症度と比較した。

2) 肝前駆細胞動員の血清マーカーとその意義

急性肝障害症例で急性期に肝組織を採取できた例を対象として、CK7発現細胞の比率と血清フェトプロテイン(AFP)値との関連を検討した。また、病的肝臓ではなく、正常肝の再生のモデルである生体肝移植ドナーの血清マーカーを測定し、急性肝不全で見られるような前駆細胞動員の指標が発現しているかを比較検討した。さらに、肝細胞合成

能の指標であるプロトロンビン時間 (PT) の変動を比較し, 前駆細胞動員が 予後に与える影響を検討した。

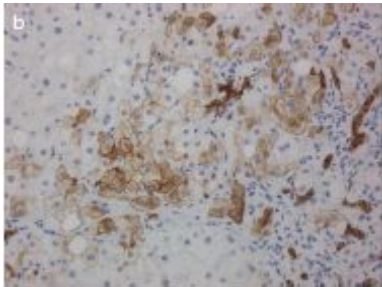
### 3) 肝前駆細胞増殖の因子と細胞内シグナル

マウス由来の肝前駆細胞を急性肝不全血清, 存在下に培養し, 細胞増殖を評価するとともに, 細胞内シグナルをウエスタンブロッティングにより解析した。

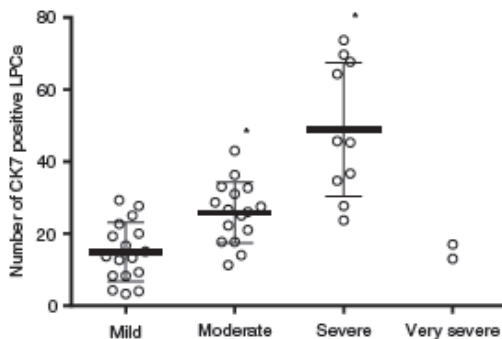
## 4. 研究成果

### 1) 急性肝障害における肝前駆細胞の動員

急性肝障害重症例の急性期肝組織を, 胆管上皮あるいは前駆細胞の指標である CK7 抗体を用いて染色したところ, 下図のように分化肝細胞の形態をとる細胞にも発現が認められ, 肝組織修復に前駆細胞が動員されていることが確認された。

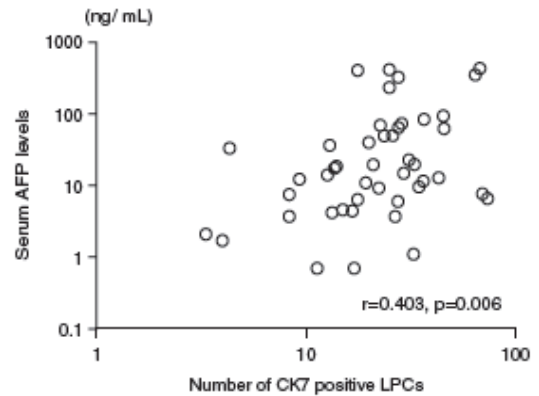


CK7 陽性細胞を肝前駆細胞として, その陽性率を肝障害の重症度と比較したところ, 下図のように肝障害の重症度に応じて陽性率が上昇した。このことから, 急性肝障害の重症例では, 肝前駆細胞が再生に動員されていることが確認された。

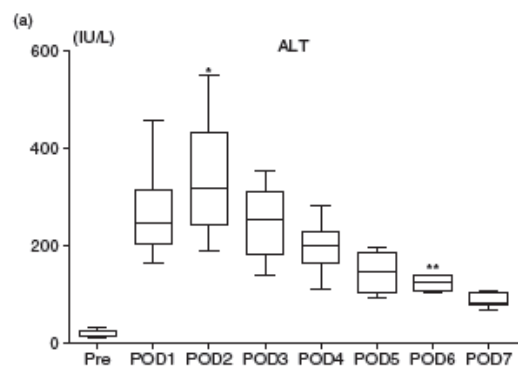


### 2) 急性肝障害における前駆細胞動員のマーカーとしての血清 AFP の意義

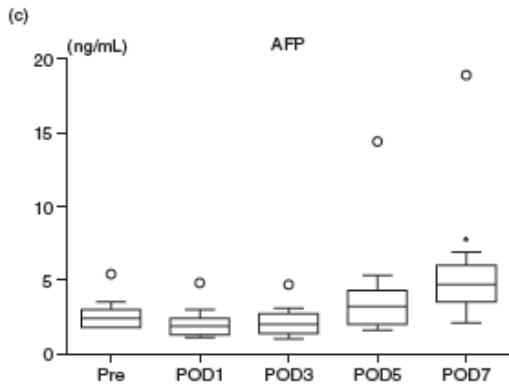
肝組織中で肝再生に肝前駆細胞が動員されていることを示す血清指標として AFP に注目し, 上記肝前駆細胞の動員比率と血清 AFP の相関を検討した。下図のように, 両者の間に明瞭な正の相関が認められた。このことから, 急性肝障害における血清 AFP は肝組織中の前駆細胞動員の血清マーカーになりうることを示された。



正常肝臓の再生モデルである生体肝移植ドナーの血清において, 血清 AFP のレベルを検討した。肝移植ドナーにおいても下図のように, 急性肝障害同様の肝酵素の上昇が認められるにもかかわらず, 血清 AFP が正常値を超えて上昇する例はほとんど見られなかった。



以上のことから, 肝再生 (肝組織修復) への肝前駆細胞動員は, 単なる肝細胞数減少に対する反応ではなく, 肝細胞の壊死炎症すなわち病的肝臓における肝組織修復機構であると想定された。

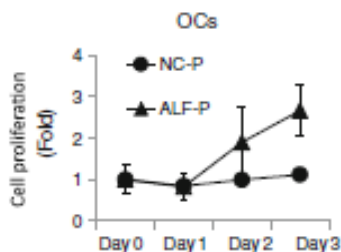


次に、前駆細胞動員の指標である血清AFPと肝細胞合成低下の指標であるPT-INRのピークの時期を比較し、予後との関連を検討した。下表のように、生存例ではAFPピークがPT-INRのピークに先行することではなく、逆に死亡例ではAFPのピーク後にPT-INRのピークを見るものが多かった。以上より、前駆細胞の動員が分化（機能）肝細胞の増殖に結びついていない状態が予後不良に関連しており、臨床的に肝再生不全に相当する病態と推定された。

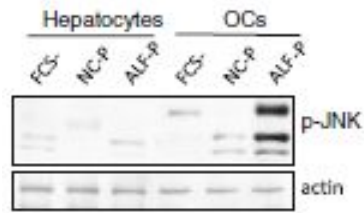
	AFP <sub>peak</sub> after PT-INR <sub>peak</sub>	AFP <sub>peak</sub> before PT-INR <sub>peak</sub>
Deceased	3	8
Survived	62	0

### 3) 急性肝不全患者血中の肝前駆細胞増殖因子とそのシグナル

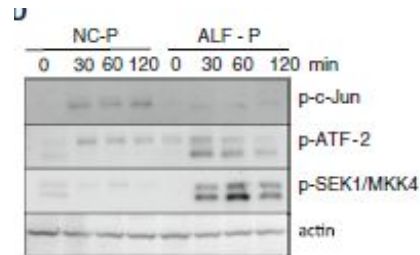
マウス肝前駆細胞(OCs: oval cells)の増殖に対して急性肝不全患者血漿(ALF-P)は増殖を促進させることが判明した(下図)。



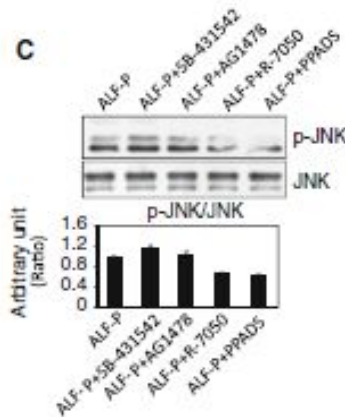
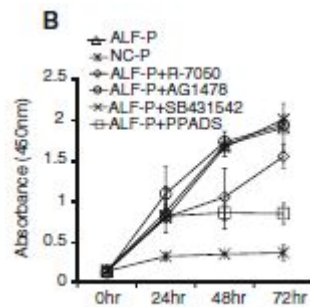
そのシグナルを検討すると JNK リン酸化が関与していることも判明した(下図)。



ALF-PによるOCsのJNK活性化はSEK/MKK-4を介して起こり、転写因子レベルではc-junではなく、ATF-2リン酸化に繋がることも判明した(下図)。



SEK/MKK-4, JNKの活性化を起こすFH-P中の物質を探索するために、種々の受容体を阻害して検討したところ、ATPのP2Y受容体およびTNF受容体がJNKシグナル活性化およびOCs増殖に関与していることが判明した(下図)。



尚, ALF-P を ATPase 処理した後 OCs の増殖実験を行っても, 増殖活性に変化はなく, 血漿中の ATP そのものではなく, P2Y 受容体 Agonist が存在することが想定された.

#### 4) 結論

急性肝障害では肝前駆細胞の増殖が組織修復に関与しており, その動員の血清マーカーは AFP であることが判明した. また, 肝前駆細胞の動員がなされても肝機能 (PT) が改善しない場合には肝再生不全が推定され, 予後不良の兆候であると考えられた. その機序として肝前駆細胞の動員から分化 (機能) 肝細胞の増殖に繋がっていない可能性が想定された.

肝前駆細胞の増殖シグナルは JNK 依存性であり, その刺激因子は患者血漿中に存在する ATP P2Y 受容体アゴニストであると推定された.

#### 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3件)

1. Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. Genes Dev 2013;27:169-181.
2. Wang T, Takikawa Y, Watanabe A, Kakisaka K, Oikawa K, Miyamoto Y, Suzuki K. Proliferation of mouse liver stem/progenitor cells induced by plasma from patients with acute liver failure is modulated by P2Y receptor-mediated JNK activation. J Gastroenterol 2014;49:1557-66.
3. Kakisaka K, Kataoka K, Onodera M,

Suzuki A, Endo K, Tatemichi Y, Kuroda H, Ishida K, Takikawa Y. Alpha fetoprotein: A biomarker for the recruitment of progenitor cells in the liver in patients with acute liver injury or failure. Hepatol Res 2015;45(10):E12-20.

[学会発表](計2件)

1. Kakisaka K, Kataoka K, Suzuki Y, Miyamoto Y, Takikawa Y. Alpha fetoprotein: A biomarker for the recruitment of progenitor cells in the liver of the patients with acute liver injury/acute liver failure. AASLD 2014, Boston.
2. 柿坂啓介, 片岡晃二郎, 小野寺美緒, 館道芳徳, 滝川康裕. 急性肝障害・急性肝不全における血清 AFP の意義: 生体肝移植ドナーとの比較. 日本消化器病学会総会, 2014, 東京

[図書](計2件)

1. Nishizuka S, Katagiri K, Suzuki Y, and Takikawa Y. Chapter 12: Liver regeneration supported by Muse cells. Edited by Mari Dezawa and Gregorio Chazenbalk, Muse cells: A New Era of Pluripotent Stem Cells. Springer. in press.
2. 西塚 哲、片桐弘勝、鈴木悠地、高原武志、新田浩幸、滝川康裕、佐々木章. Muse 細胞による肝切除後細胞補填療法の可能性. Organ Biology, 印刷中

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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・教授  
研究者番号：50254751

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

王 挺 (Wang Ting)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70416171

柿坂啓介 (Kakisaka Keisuke)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号：40583563