

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09453

研究課題名(和文) 肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、胆管形成、再生における核内受容体CARの役割

研究課題名(英文) The role of nuclear receptor CAR in hepatic progenitor cell-mediated bile duct epithelial cell proliferation, bile duct formation and regeneration

研究代表者

山崎 勇一 (Yamazaki, Yuichi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00582404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、核内レセプターCARの肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、胆管形成、再生における意義を明らかにすることを目的とした。CARのKOマウスと野生型マウスで免疫組織染色、フローサイトメトリー法により胆管上皮細胞数を比較し、肝内胆管の樹状三次元構造を可視化して比較した。CARのKOマウスは野生型マウスと比較して胆管上皮細胞数が減少していたが、肝内胆管の樹状三次元構造の差異を明らかにすることはできなかった。肝障害モデルでは肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖にCARが関与している可能性を報告したが、本研究では胆管形成、再生、肝内胆管の三次元構造へのCARの関与は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖を誘導する肝障害モデルでは、核内レセプターCARの肝障害、胆管上皮細胞増殖への関与が報告されている。肝障害のない状態での肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、胆管形成、再生におけるCARの関与を検討した。免疫組織染色、フローサイトメトリー法、肝内胆管の樹状三次元構造を可視化して検討したが、CARの関与は明らかでなかった。肝障害のない状態でのCARの関与の有無を検討したことは、肝障害モデルを含めた肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、胆管形成、再生及びCARの病態生理を考えるうえで意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the role of nuclear receptor CAR in hepatic progenitor cell-mediated bile duct epithelial cell proliferation. Immunostaining and flow cytometry showed that CAR KO mice had decreased numbers of bile duct epithelial cells compared to wild-type mice, but we were unable to clarify differences in the dendritic three-dimensional structure of intrahepatic bile ducts. We reported that CAR may be involved in bile duct epithelial cell proliferation mediated by hepatic progenitor cells in liver injury model, but in this study, we could not confirm the involvement of CAR in bile duct formation, regeneration, and the three-dimensional structure of intrahepatic bile ducts.

研究分野：消化器内科学

キーワード：核内受容体CAR 肝前駆細胞 胆管上皮細胞増殖 胆管形成 胆管再生

## 1. 研究開始当初の学術的背景

肝臓は本来、さまざまなタイプの肝障害に反応して、再生修復する能力を備えている。この肝再生能力が障害された時、成熟肝前駆細胞/オーバル細胞が増殖し、肝再生、修復を促していると考えられている (Mech Dev 2003; 120: 117-30)。肝前駆細胞は肝細胞、胆管上皮細胞に分化し、障害された肝機能を回復させる。化学物質暴露はげっ歯類で肝前駆細胞を誘導する肝障害を引き起こし、人において薬物治療で引き起こされる肝障害、肝前駆細胞の増殖の分子メカニズムの解明に利用されている (Gastroenterology. 2009; 137: 466-81)。0.1%の 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) を含有した食餌あるいは 0.165% エチオニン添加水コリン欠乏 (CDE) 食の供与はげっ歯類における肝障害時のオーバル細胞増殖の最も効果的なモデルである。

最近の報告では、DDC 含有食餌投与による肝障害を胆管障害性の再生モデル、CDE 食投与による肝障害を肝細胞障害性の再生モデルと大別し、肝前駆細胞ニッチの違いに注目している。また DDC 含有食による肝障害や胆汁うっ滞性肝障害モデルでは Fibroblast growth factor (FGF)7 が主要な肝前駆細胞ニッチシグナルであると同定された (Genes Dev. 2012; 27, 169-181)。

本研究で FGF7 などによる肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、肝内胆管形成、再生における核内受容体 CAR (constitutive active/androstane receptor) の役割を明らかにする (図 1)。

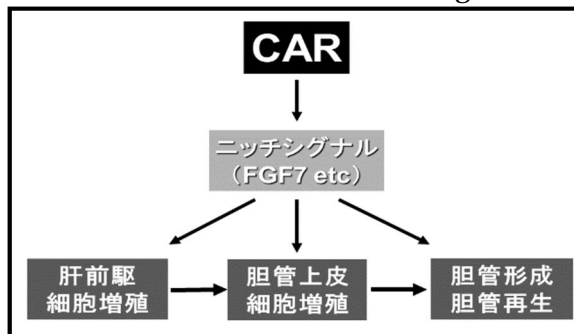


図 1

CAR は薬物代謝酵素 (Cytochrome P450 (CYP)、Multidrug resistance relation protein、UDP- glucuronosyltransferase など) の発現調節を行う核内レセプターである。我々の留学していたアメリカ国立衛生科学研究所 (NIEHS/NIH) 根岸研究室では CAR による薬物代謝酵素 (CYP2B, UGT1A) の誘導のメカニズムを分子生物学的に解明してきた。薬物 (Phenobarbital, PB) による CYP2B の誘導は、肝臓で細胞質に存在する CAR が PB 刺激により核内に移動し、核内に存在する Retinoid X receptor (RXR) と heterodimer を形成し、CYP2B 遺伝子の 5' -上流領域に存在する PBREM (PB-responsive enhancer module) と命名したエンハンサーに結合することにより起こる (Mol Pharmacol. 1998; 53: 597-601 など)。その後の報告で CAR は phosphoenolpyruvate carboxyltransferase や glucose 6-phosphatase、carnitine palmitoyltransferase などの肝遺伝子も制御することが示され、その役割は糖尿病などの肝エネルギー代謝性疾患にまで広がっている (Mol Pharmacol. 2002; 61: 1-6, Mol. Cell. Biol. 2004; 24: 7931-40, Drug Metab Pharmacokinet. 2008; 23: 8-13)。CAR は PB 投与マウスで肝発癌を引き起こすことを報告され (Cancer Res. 2004; 64: 7197-200)、さらに我々は、平成 18-19 年度、20-23 年度科学研究費補助金を得て、CAR の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態への関与を解明し報告した (Gut. 2007; 56:

565-74, Carcinogenesis 2011;32: 576-83 )。

オーバル細胞増殖/肝前駆細胞増殖はげっ歯類だけでなく、ウィルス性肝炎、NASH などのヒトの慢性肝疾患でも認められ(Semin Liver Dis. 2003; 23: 385-96.)、また、CAR はヒトの C 型慢性肝炎の障害肝で発現が亢進していると報告されている(Hepatology. 2011;54:1966-74)。ヒトにおける肝障害時のオーバル細胞増殖/肝前駆細胞増殖を介した肝再生や肝修復に CAR 活性化の関与が示唆される。

我々はすでに、CAR の遺伝子欠損マウス(KO) ( C3H/HeN 系および C57BL/6N 系 ) の供与を受け、オーバル細胞増殖の実験モデルである DDC 含有食を用い、KO、野生型(WT)マウスで検討を行い、CAR の KO マウス以外のすべてのマウスにおいて DDC 含有食による肝障害、オーバル細胞増殖/肝前駆細胞増殖を引き起こすことを見出した。DDC 含有食により CAR は細胞質から核内へ移動し、標的遺伝子である CYP2B や GADD45 を誘導することを見出した。また、レーザーマイクロダイセクションを用いて WT マウス肝での中心静脈域および / あるいは門脈域で特異的に発現し、CAR により調節される遺伝子の解析を行い、門脈域での CAR の活性化がオーバル細胞増殖に関与することを報告した(Lab Invest. 2011; 91:1624-33)。さらに肝細胞障害性のオーバル細胞増殖の実験モデルである CDE 食を用い CAR の KO、WT マウスで検討し、CDE 食により、CAR は活性化され、標的遺伝子である CYP2B や GADD45 を誘導することを見出した。しかし、DDC 含有食と異なり、KO、WT マウス共に肝障害、オーバル細胞/肝前駆細胞増殖は認められた。肝前駆細胞あるいは胆管上皮細胞のマーカーである EpCAM 抗体を用いた免疫染色による解析の結果、KO、WT マウス間での EpCAM 陽性細胞 (胆管上皮細胞 + 肝前駆細胞増殖) の増加に有意な差は認められなかった。しかし、免疫染色およびフローサイトメトリー法による検討の結果、対照食において KO、WT マウス間での EpCAM 陽性細胞数 (胆管上皮細胞) に有意な差があることを見出した。KO マウスで胆管上皮細胞が減少している結果から、CAR が発達期の胆管形成に関与している新たな可能性が示唆された。

## 2 . 研究の目的

肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、胆管形成、再生メカニズムにおける核内受容体 CAR の役割を明らかにする。肝細胞と胆管上皮細胞へ分化しうる両能性をもつオーバル細胞は、成熟肝前駆細胞として、肝障害時に活性化され、肝再生を促すと考えられている。しかし、肝前駆細胞を介した肝細胞、胆管上皮細胞への分化、増殖の機序は不明である。我々は肝前駆細胞ニッチシグナルの一つである FGF7 などを介した肝前駆細胞増殖、胆管上皮細胞増殖における CAR 活性化の関与を見出した。本研究では CAR ノックアウトマウスを用いて肝前駆細胞を介した胆管上皮細胞増殖、肝内胆管形成、再生における CAR の役割を明らかにする。

## 3 . 研究の方法

CAR の KO マウス、FGF7 の Tg マウス・FACS 分離細胞・臨床検体を用いた研究を合わせ、基礎および臨床の両面から肝前駆細胞を介する胆管上皮細胞増殖・再生における CAR の役割を解明することを目標に、以下の4つの研究計画を立てた。

(1) CAR の KO マウスと WT マウスで EpCAM 抗体による免疫染色、FACS により胆管上皮細胞数を比較解析する。また、肝組織における Thy-1、FGF7 の発現を解析する。

(2) CAR の KO、WT マウスから FACS および MACS により肝、胆管上皮、間葉系細胞を分離同定し、TCPOBOP などの CAR activator による FGF7 など肝前駆細胞ニッチシグナルの誘導を解析する。

(3) CAR の KO および FGF7 の Tg マウスを作製し、FGF7 を介した胆管上皮細胞増殖における CAR の役割について解析する。さらに胆管の三次元構造を可視化する手法により解析する。

(4) 胆汁うっ滞性肝疾患症例(薬物性など)の肝組織における CAR、EpCAM、FGF7 の発現を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) CAR の KO マウスと WT マウスで EpCAM 抗体による免疫染色、FACS により胆管上皮細胞数を比較解析及び肝組織における Thy-1、FGF7 の発現解析

12 週齢雄の CAR の KO マウスは WT マウスと比較しての肝組織において EpCAM 陽性の胆管上皮細胞数が有意に減少していた(図 2)。4 及び 8 週齢雄では肝組織において EpCAM 陽性の胆管上皮細胞数の明らかな差は得られなかった。

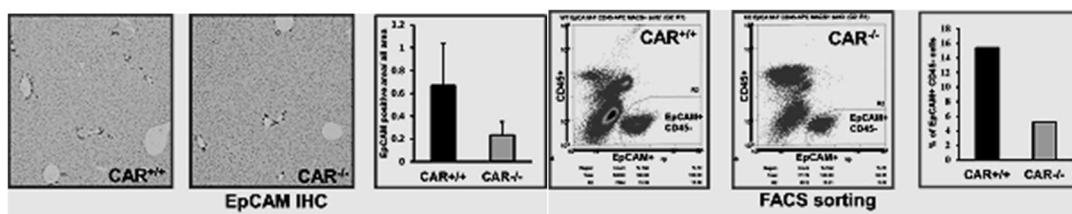


図 2

また、マイクロアレイ解析の結果、KO マウスにおいて FGF7 の発現が低下していた。Thy-1 については KO マウスと WT マウスで明らかな差は得られなかった。

(2) CAR の KO、WT マウスから FACS および MACS により肝、胆管上皮、間葉系細胞を分離同定し、TCPOBOP などの CAR activator による FGF7 など肝前駆細胞ニッチシグナルの誘導を解析

FACS および MACS により肝、胆管上皮、間葉系細胞を分離同定は安定せず、TCPOBOP などの CAR activator による FGF7 など肝前駆細胞ニッチシグナルの誘導については一定の結果は得られなかった。今後の研究課題である。

( 3 ) CAR の KO および FGF7 の Tg マウスを作製し、FGF7 を介した胆管上皮細胞増殖における CAR の役割について解析および胆管の三次元構造を可視化する手法により解析

FGF7 の Tg マウスは入手できず、CAR の KO マウスのみ胆管の三次元構造の解析を行った。総胆管から逆行性にインクを注入し、その後、肝臓全体を視覚的に透明化することで、肝内胆管の樹状構造を可視化して検討を行ったが、明らかな胆管 3 次元構造の差異は検出できなかった。肝内胆管の樹状三次元構造を可視化して定量する別の手法として、標本の切片面を一眼レフカメラで連続撮影してコンピュータ上で 3D 画像を再構築する 1 つの生物標本から 2D 顕微鏡画像と 3D 画像を同時に得る手法を用いて解析を行ったが( 図 3 )、詳細な肝内胆管の樹状 3 次元構造の差異を検討することは困難であり、CAR の KO マウスと WT マウスでの肝内胆管の樹状 3 次元構造の差異を明らかにすることはできなかった。

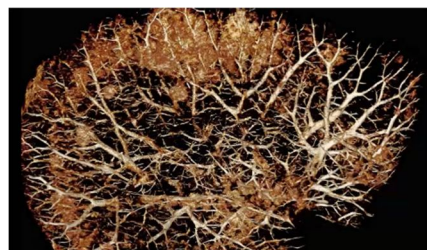


図 3

( 4 ) 胆汁うっ滞性肝疾患症例(薬物性など)の肝組織における CAR、EpCAM、FGF7 の発現の検討

本研究期間では、一定の結果が得られず、今後、研究を継続したいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishii Nobukazu, Tajika Yuki, Murakami Tohru, Galipon Josephine, Shirahata Hiroyoshi, Mukai Ryo, Uehara Daisuke, Kaneko Ryosuke, Yamazaki Yuichi, Yoshimoto Yuhei, Iwasaki Hirohide	4. 巻 11
2. 論文標題 Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI) method for both paraffin-embedded and frozen specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92485-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uehara D, Tojima H, Kakizaki S, Yamazaki Y, Horiguchi N, Takizawa D, Sato K, Yamada M, Uraoka T	4. 巻 51
2. 論文標題 Constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cooperatively ameliorate DSS-induced colitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dig Liver Dis	6. 最初と最後の頁 226-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2018.10.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Yamazaki Y, Uraoka T	4. 巻 27
2. 論文標題 Strategy for the control of drug-induced liver injury due to investigational treatments/drugs for COVID-19.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 8370-8373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3748/wjg.v27.i48.8370.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山崎 勇一, 金山 雄樹, 植原 大介, 須賀 孝慶, 田中 寛人, 戸島 洋貴, 栗林 志行, 佐藤 賢, 柿崎 暁, 浦岡 俊夫	4. 巻 119
2. 論文標題 デキサメタゾン単独療法を行ったCOVID-19中等症II患者の肝障害についての検討	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日消誌	6. 最初と最後の頁 332-341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.119.332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuichi Yamazaki, Yuki Kanayama, Daisuke Uehara, Takayoshi Suga, Hirohito Tanaka, Hiroki Tojima, Shiko Kuribayashi, Ken Sato, Satoru Kakizaki and Toshio Uraoka
2. 発表標題 Liver Injury in Patients with COVID-19 Who Received Dexamethasone Monotherapy
3. 学会等名 APASL2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuichi Yamazaki, Takashi Ueno, Takeshi Hatanaka, Satoshi Takakusagi, Daichi Takizawa, Atsushi Naganuma, Takashi Kosone, Hiroaki Nakajima, Ken Sato, Satoru Kakizaki, Hitoshi Takagi, Toshio Uraoka, Masaharu Takahashi, Shigeo Nagashima and Hiroaki Okamoto
2. 発表標題 Characteristics of cases of hepatitis E in Gunma prefecture: small epidemics caused by the same subgenotype 3a strains.
3. 学会等名 APDW2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柿崎 暁  (Kakizaki Satoru)  (80344935)	群馬大学・大学院医学系研究科・客員教授    (12301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	伊藤 暢  (ITO TOHRU)  (50396917)	東京大学・分子細胞生物学研究所・特任准教授    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------