

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15974

研究課題名(和文)革新的肝硬変治療法の開発に向けた新規肝再生促進因子の作用機序解明

研究課題名(英文)Underlying mechanisms and therapeutic implications of a novel accelerator of fibrotic liver regeneration

研究代表者

柳川 享世 (YANAGAWA, Takayo)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10760291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者らが独自に見出した新規の線維肝再生促進因子Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1)による線維化改善と再生促進機序を解明し、次世代型肝硬変治療法の開発に向けた分子細胞基盤の確立を目的とした。研究成果として、末梢血においては単球がOGFRL1の主要産生細胞であること、四塩化炭素肝傷害に伴ってエクソソーム内包タンパク質として分泌されること、傷害肝ではOgfr1 mRNAの発現低下とOGFRL1タンパク質が傷害部位周囲の肝細胞に局在が見られるなど、内因性OGFRL1の動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内在性OGFRL1の挙動をはじめとして、OGFRL1による線維化改善と再生促進機序の分子機構の一端を明らかにすることが出来た。肝硬変に対する新規の治療法としては、国内外において細胞移植が試みられているが、細胞の品質管理や移植後の造腫瘍性といった問題点も存在する。今後、線維肝におけるOGFRL1の再生促進機序をより詳細に解明することで、OGFRL1またはその下流因子を発現させて高機能化した少数の自家細胞を移植する方法やエクソソーム内包タンパク質として投与するなど、難治性肝硬変症例に対する新たな再生治療の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We previously identified opioid growth factor receptor like-1 (OGFRL1) as a novel accelerator of fibrotic liver regeneration in mice. In the present study, we have implicated OGFRL1 in regeneration of the injury/fibrotic liver. Among the peripheral blood cells, monocytes were the major source of OGFRL1. Liver tissue contained a small but significant amount of Ogfr1 mRNA, which was decreased following repeated CCl4 injections. OGFRL1 was transiently detected in the serum as an exosome-included protein and localized in hepatocytes surrounding the necrotic areas after CCl4-induced liver injury/fibrosis. Administration of OGFRL1-expressing cells into mice with liver fibrosis enhances mobilization of hepatic progenitor cells and stimulates proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝再生 線維肝 再生医療 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

肝硬変症は、B型ならびにC型肝炎ウイルスの持続感染、アルコールの多飲、さらには近年増加傾向が著しい非アルコール性脂肪肝炎(NASH)などによる慢性炎症によって進展する、肝線維化の終末像である。肝臓は元来高い再生能力をもつ臓器であるが、肝硬変に至ると再生不全に陥るとともに、肝細胞癌が好発する。たとえ早期に発見しても術後の再生不全の懸念から切除困難な肝細胞癌症例も多く、わが国では年間5万人近くが肝硬変ないし肝細胞癌により死亡している。線維化進展を抑制しつつ、残存線維肝の再生を促す新たな治療法が切望される所以である。

肝硬変は、かつては不可逆的な病態と考えられていたが、近年のウイルス性肝炎の治療法の進歩により、可逆的すなわち治療可能な疾患と認識されるようになった(Friedman and Bansal, *Hepatology* 2006)。しかしながら、原因治療が可能となったウイルス性肝炎に因らない、NASHや自己免疫学的機序に基づく肝硬変も多く存在するため、線維化改善と再生促進を主眼とした治療法の開発は、医学的また社会的に急務と言える。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らの所属研究室が独自に見出した新規の線維肝再生促進因子 Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1)について、*in vivo*における発現動態を明らかにするとともに、分子細胞生物学的な手法および CRISPR/Cas9 技術を用いたノックアウトマウス等を用いて、OGFRL1 による線維化改善と再生促進機序を解明し、次世代型肝硬変治療法の開発に向けた分子細胞基盤の確立を目的とした。

所属研究室ではこれまでに、肝線維症からの回復過程において、線維肝組織に浸潤した骨髄由来細胞が肝線維化の改善と再生に寄与することを見出した(Higashiyama et al., *HEPATOLOGY* 2007; 同 *Gastroenterology* 2009)。続いて、この浸潤した骨髄由来細胞の肝線維化の改善と再生における下流因子を探索する中で、候補因子として OGFRL1 を見出した。予備的な実験から、OGFRL1 は線維化を来すような高度の組織傷害によって誘導され、傷害組織の修復(再生)に寄与することが示唆されており、肝再生をコントロールする新たな候補因子の1つとして、肝硬変治療につなげる上で大変有望な分子であることが考えられた。しかしながら、これまでに OGFRL1 の発現動態や機能に関する報告はなく、その作用機序も全く不明であったため、これらを明らかにすることは新たな肝硬変治療法の開発に結び付くものと期待された。

3. 研究の方法

(1) OGFRL1 の生体内における発現動態の解析

個体における *Ogfr11* mRNA の発現分布の検討:

野生型マウスの雌雄それぞれ3個体から全身の諸臓器を採取し、リアルタイム RT-PCR により生理的条件下の生体内における発現分布を検討した。更に、骨髄ならびに末梢血血球細胞をフローサイトメーターによって分画し、リアルタイム RT-PCR によって *Ogfr11* mRNA 産生量の高い細胞集団があるか検討した。

生理的条件下ならびに線維化の進展や線維肝の再生に伴う OGFRL1 の発現動態の検討:

未処置の野生型マウスならびに実験的肝硬変マウスから採材した肝組織および血球細胞から mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を実施した。

抗 OGFRL1 抗体の作製と OGFRL1 タンパク質の発現動態の検討:

マウス OGFRL1 に特異的な抗体を複数種類作製した。これらの抗体を用いて、生理的条件下ならびに四塩化炭素投与による急性および慢性肝傷害時の肝その他組織等における内因性 OGFRL1 タンパク質の発現動態を検討した。

(2) OGFRL1 が線維肝再生に及ぼす影響の検討

四塩化炭素の反復投与により作製した肝硬変症モデルマウスに対し、レンチウイルス感染により OGFRL1 を強制発現させた細胞を経脾臓的に投与した。対照群は、EGFP を強制発現させた細胞を投与し、比較した。更に、このマウスに対して70%部分肝切除の処置を行い、線維肝からの再生モデルとした。一般に、70%部分肝切除を行うとその後一週間程度で肝前駆細胞の動員と細胞増殖を伴う肝再生が起こるため、この検討では線維肝の再生を評価した。

上記マウスの肝臓を採取し、免疫組織染色により組織学的に評価を行った。

同一の肝組織を用いて、マイクロアレイ解析により遺伝子発現変動を網羅的に解析した。

(3) OGFRL1 ノックアウトマウス・レポーターマウスの作製と表現型解析

OGFRL1 ノックアウトマウスの検討

生体内における OGFRL1 の機能解析のため、CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術により OGFRL1 ノックアウトマウスの作製を試みた。作製したノックアウトマウスの発生、特に肝発生において異常がないかなどを検討した。

OGFRL1 レポーターマウスの繁殖効率の検討

生体内の OGFRL1 タンパク質の挙動を可視化するため、同じく CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術により OGFRL1 遺伝子下流に蛍光タンパク質を組み込み、レポーターマウスを作製した。作製したレポーターマウスの発生、繁殖などに異常がないかなどを検討した。

4. 研究成果

(1) OGFRL1 の生体内における発現動態の解析

雌雄各 3 匹の野生型マウスの全身にわたる 16 臓器において *Ogfr11* mRNA の発現量を比較検討したところ、雌雄とも、肝臓における発現を 1.0 とした場合に、骨髄、脾臓、脳（大脳皮質、海馬、小脳に細分した）、肺において高いことが明らかとなった（図 1）。線維肝に浸潤してきた骨髄由来細胞から肝再生促進因子として OGFRL1 を同定した経緯から、脾臓や骨髄といった造血系臓器に着目し、図 1 の結果に基づき骨髄中の造血系の細胞や末梢血血球細胞に対して更なる解析を行ったところ、末梢血中の単球分画で発現が高いことを見出した（図 2）。骨髄細胞はフローサイトメーターにより、表面抗原の CD34、CD45、Ter119 を用いて分画し、末梢血細胞は、CD11b および前方散乱光シグナル(FSC)、側方散乱光シグナル(SSC)によって分画した。

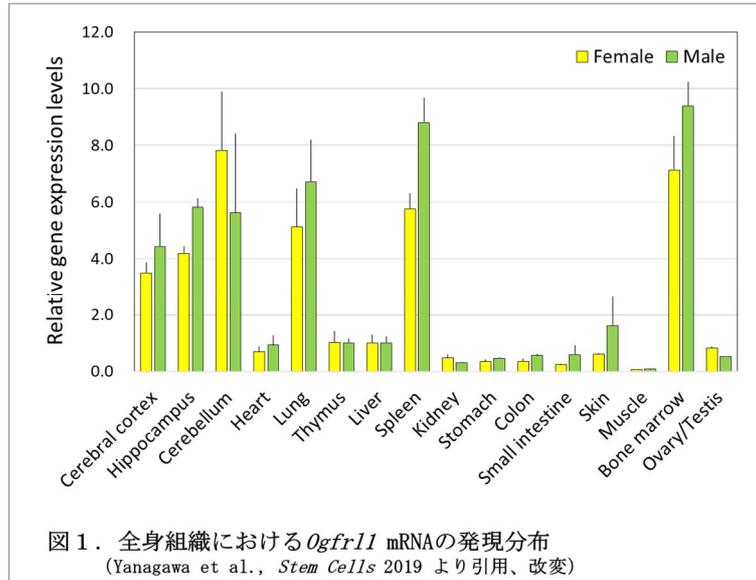


図 1. 全身組織における *Ogfr11* mRNA の発現分布 (Yanagawa et al., *Stem Cells* 2019 より引用、改変)

野生型マウスに対し、部分肝切除や四塩化炭素の単回投与による急性肝障害誘発、同反復投与による慢性肝傷害誘発（肝硬変モデルマウス）それらに対する部分肝切除を行うと、それぞれの肝臓ならびに血球細胞において *Ogfr11* mRNA 発現量が低下することが明らかとなった。

抗 OGFRL1 抗体を作製するにあたり複数個所の抗原部位を選定し、最終的に N 末端側、中間部位、C 末端側と 3 種類の特異的抗体を作製した。これらの抗体を用いた免疫組織染色により、肝組織内においては、傷害に際して傷害部位近傍の肝実質細胞に特徴的な局在を示すことを明らかにした。従って、急性ならびに慢性傷害時には、mRNA 量は減少する一方で、肝実質細胞における OGFRL1 タンパク質が顕著に検出されるという新たな知見が得られた。

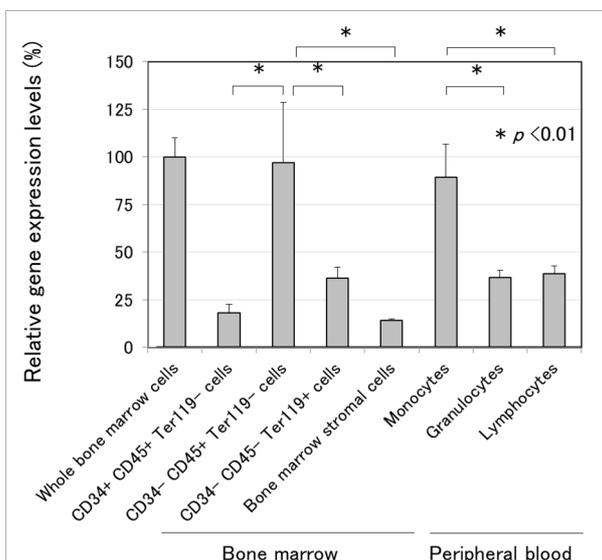


図 2. 骨髄ならびに末梢血血球細胞分画における *Ogfr11* mRNA の発現 (Yanagawa et al, *Stem Cells* 2019より引用、一部改変)

研究開始当初には予期していなかった発見として、OGFRL1 は細胞外分泌小胞（エクソソーム）タンパク質として、四塩化炭素単回投与 24 時間後に一過性に血中に分泌されることを見出した（図 3）。

この知見から検討を重ねた結果、傷害が重度になるとエクソソーム内包 OGFRL1 の分泌がむしろ減少する所見に基づいて、傷害肝の再生を反映するバイオマーカーとしての有用性について産学連携のもとに特許出願を行った。

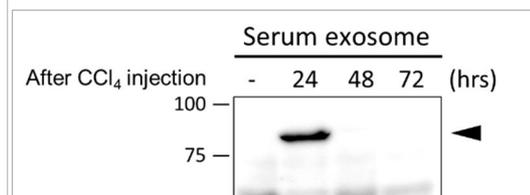


図 3. 四塩化炭素単回投与後の血中エクソソーム分画に検出された OGFRL1 タンパク質

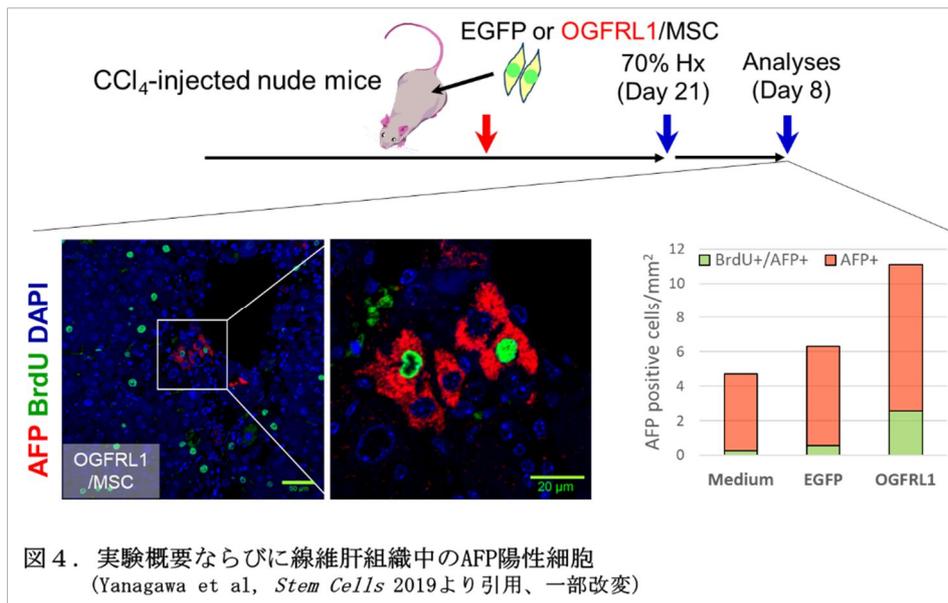
(2) OGFRL1 が線維肝再生に及ぼす影響の検討

OGFRL1 を強制発現させた間葉系幹細胞 (OGFRL1/MSC) ならびに対照群として EGFP を強制発現させた間葉系幹細胞 (EGFP/MSC) を肝硬変マウスへ経脾臓的に投与したのち、70%部分肝切除 (70% Hx) を行い、8日後の組織について解析を行った (概要図: 次ページ、図4 上段)。

採取した肝組織に対する免疫組織染色の結果から、OGFRL1 発現細胞投与群の線維肝組織において、肝前駆細胞のマーカーである alpha fetoprotein (AFP) 陽性の細胞が対照群より増加していることが明らかとなった。さらに、この動員された肝前駆細胞は BrdU 陽性率が高く、増殖性を有することが示唆された (図4 下段)。

また、同じ肝組織を用いたマイクロアレイ解析により遺伝子発現の変化を網羅的に比較検討したところ、対照群に比べ OGFRL1 発現細胞投与群では、AFP 遺伝子発現の上昇ならびに、Cyclin A2 や Cyclin B1、Cyclin E2 といった細胞周期関連遺伝子、その他細胞分裂などに関する遺伝子群の発現が上昇していた。

これらの知見から、肝硬変マウスへの OGFRL1 発現細胞の投与は、線維肝再生促進効果を有することが示唆された。



(3) OGFRL1 ノックアウトマウス・レポーターマウスの作製と表現型解析

東海大学医学部内での共同研究により、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた東海大学初の遺伝子改変マウスとして OGFRL1 ノックアウトマウスの作出に成功した。これまで得た 8 系統のうち、比較的長い遺伝子領域を欠損した 3 系統について主として解析を行ってきたが、これらの系統は発生および発育に外見上顕著な表現型が確認できなかった。ゲノム上では OGFRL1 遺伝子の一部を欠損しているが、残存するエクソンにより変則的な OGFRL1 タンパク質が産生され、これが機能を代償する可能性も考えられたことから、OGFRL1 のプロモーター領域から第一エクソン途中までを欠損する 1 つの統に対し、C 末端側も欠損するような遺伝子編集を行ったマウスを作製中である。

OGFRL1 レポーターマウスについては、Ogfr11 遺伝子の下流に蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだレポーターマウスを、同じく本学医学部内での共同研究により作製した。この OGFRL1 レポーターマウスの作製は 2 回行っており、初回は生後 3 週齢程度で全て死亡してしまった。2 回目で成体となったレポーターマウス個体が 1 匹だけ得られたが、この個体の出産回数並びに 1 回あたりの産子数が極端に少なく、レポーター遺伝子を受け継ぐ次世代以降を得られなかった。OGFRL1 タンパク質にレポータータンパク質が融合したことでその機能に支障が生じ、発生・発育に何らかの問題が生じている可能性が示唆された。また、この個体は雌であったため人工授精による繁殖が出来ず、骨髄移植を行うことで血球細胞にのみレポータータンパク質を持つマウスを作出し、現在も解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 柳川享世、稲垣 豊	4. 巻 5
2. 論文標題 肝線維化治療薬開発の現状と課題	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 肝胆臓	6. 最初と最後の頁 897～904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Sumiyoshi Hideaki, Nakao Sachie, Endo Hitoshi, Yanagawa Takayo, Nakano Yasuhiro, Okamura Yosuke, Kawaguchi Akira T., Inagaki Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 A Novel Composite Biomaterial Made of Jellyfish and Porcine Collagens Accelerates Dermal Wound Healing by Enhancing Reepithelization and Granulation Tissue Formation in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Wound Care	6. 最初と最後の頁 295～311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/wound.2019.1014	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 Yanagawa T, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Higashiyama R, Fukumitsu H, Minakawa K, Chiba Y, Suzuki Y, Sumida K, Saito K, Kamiya A, Inagaki Y	4. 巻 37
2. 論文標題 Identification of a Novel Bone Marrow Cell-Derived Accelerator of Fibrotic Liver Regeneration Through Mobilization of Hepatic Progenitor Cells in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 89-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.2916	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、松木勇樹、近田裕美、紙谷聡英、三浦浩美、大塚正人、高木孝士、横森弘昭、稲垣 豊
2. 発表標題 造血系細胞が分泌するエクソソームを介した肝発生と傷害肝修復の制御機構
3. 学会等名 第26回 肝細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川享世、紙谷聡英、稲垣 豊
2. 発表標題 肝実質細胞と造血系細胞とのクロストークを介した肝発生と傷害肝修復の制御機構
3. 学会等名 第55回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayo Yanagawa, Hideaki Sumiyoshi, Sachie Nakao, Hiromi Miura, Masato Otsuka, Hiromi Chikada, Akihide Kamiya, Hiroaki Yokomori, Takashi Takaki, Yutaka Inagaki
2. 発表標題 Opioid growth factor receptor-like 1; a common mediator of regeneration of fibrotic liver and fetal development of hepatic progenitor cells
3. 学会等名 20th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayo Yanagawa, Sachie Nakao, Akihide Kamiya, Hideaki Sumiyoshi, Yuki Matsuki, Kota Tsuruya, Tatehiro Kagawa, Isao Okazaki, Yutaka Inagaki
2. 発表標題 Clinical significance of a novel exosomal protein, opioid growth factor receptor-like 1, in the repair from liver injury/fibrosis
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川享世、中尾祥絵、住吉秀明、松木勇樹、岡崎 勲、横森弘昭、稲垣 豊
2. 発表標題 エクソソーム内包タンパク質Opioid growth factor receptor like-1を介した肝発生と再生の制御機構
3. 学会等名 第33回 肝類洞壁細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川享世、中尾祥絵、住吉秀明、松木勇樹、紙谷聡英、鶴谷康太、加川建弘、岡崎 勲、稲垣 豊
2. 発表標題 エクソソーム内包肝再生促進因子OGFRL1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、稲垣豊
2. 発表標題 線維肝再生促進因子Opioid growth factor receptor-like 1に着目した肝硬変に対するエクソソーム医療の創出
3. 学会等名 第54回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、笠原大瑚、近田裕美、紙谷聡英、横森弘昭、稲垣豊
2. 発表標題 エクソソーム内包タンパク質としての新規再生促進因子Opioid growth factor receptor-like 1の解析
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、松木勇樹、近田裕美、紙谷聡英、横森弘昭、稲垣豊
2. 発表標題 エクソソーム内包肝再生促進因子を用いた肝不全治療の展望
3. 学会等名 第25回 肝細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、笠原大瑚、近田裕美、紙谷聡英、横森弘昭、稲垣豊
2. 発表標題 エクソソーム内包タンパク質Opioid growth factor receptor-like 1を介した傷害肝再生機構の解明
3. 学会等名 第50回 日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayo Yanagawa, Hideaki Sumiyoshi, Sachie Nakao, Daigo Kasahara, Hiromi Miura, Masato Otsuka, Hiromi Chikada, Akihide Kamiya, Hiroaki Yokomori, Yutaka Inagaki
2. 発表標題 Opioid growth factor receptor-like 1; an extracellular vesicle-mediated crosstalk between hematopoietic cells and hepatocytes that accelerates regeneration of murine fibrotic liver
3. 学会等名 米国肝臓病学会 Single Topic Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、笠原大瑚、近田裕美、紙谷聡英、三浦浩美、大塚正人、横森弘昭、稲垣 豊
2. 発表標題 血球由来エクソソーム内包タンパク質を介した胎仔肝芽細胞の分化制御
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、紙谷聡英、稲垣豊
2. 発表標題 線維肝の再生と胎仔肝の発生を制御する Opioid growth factor receptor-like 1 の作用機構
3. 学会等名 第53回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、千葉陽介、鈴木悠平、中尾祥絵、近田裕美、紙谷聡英、稲垣豊
2. 発表標題 線維肝の修復と再生を司る分子機構
3. 学会等名 第49回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、近田裕美、紙谷聡英、稲垣豊
2. 発表標題 線維肝の再生における肝前駆細胞の動員に寄与するOpioid growth factor receptor-like 1の機能解析
3. 学会等名 第24回 肝細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、笠原大瑚、近田裕美、紙谷聡英、稲垣豊
2. 発表標題 Opioid growth factor receptor-like 1; an extracellular vesicle-mediated signal between hematopoietic cells and hepatic parenchymal cells that regulates repair and embryonic development of the liver
3. 学会等名 The Liver Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳川享世、住吉秀明、中尾祥絵、笠原大瑚、近田裕美、紙谷聡英、横森昭弘、稲垣豊
2. 発表標題 エクソソーム内包タンパク質Opioid growth factor receptor-like 1を介した肝再生機構の解明
3. 学会等名 第17回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 Method for determining tissue regeneration state of living body organs	発明者 稲垣豊、柳川享世、 角中ちひろ、小田健 太、鈴木誓吾	権利者 学校法人東海大 学、シスメック ス株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2018229466	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 生体の組織再生状態の判定方法	発明者 稲垣豊、柳川享世、 角中ちひろ、小田健 太、鈴木誓吾	権利者 学校法人東海大 学、シスメック ス株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-176103	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東海大学大学院医学研究科 マトリックス医学生物学センター http://matrix.med.u-tokai.ac.jp

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
---------------------------	-----------------------	----