

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008 年度
課題番号：19790478
研究課題名（和文）慢性肝障害におけるスフィンゴ脂質シグナルの肝細胞の生死決定機序に関する研究
研究課題名（英文）Role of sphingolipids on hepatocyte apoptosis of chronic liver injury

研究代表者
大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60447787

研究成果の概要：胆管結紮により誘導される慢性肝障害では、クッパー細胞の活性化により障害肝に残存する肝細胞が AKT 活性化を介した抗アポトーシス状態を獲得する。クッパー細胞は、肝障害に対し抑制的に作用する役割を有する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

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：慢性肝障害、アポトーシス、クッパー細胞

1. 研究開始当初の背景

未だ予後不良の疾患である劇症肝炎や肝硬変の中心的な病態は肝細胞死による肝機能不全であるが、肝細胞死のメカニズムとして腫瘍壊死因子(TNF)等の液性因子によって誘導されるアポトーシスが関与することが報告されている。アポトーシス誘導シグナルについては多くの研究がなされているが、細胞にはそれに拮抗する種々の抗アポトーシスシグナル機構も存在しており、それ

らのシグナルのバランスによって細胞の生死が決定されている。抗アポトーシスシグナルの増強は、劇症肝炎時に認められる急激で広範な肝細胞死の抑制に有用であると考えられるが、その一方で肝細胞が抗アポトーシス状態となることは、ウイルス感染細胞や遺伝子異常をきたした細胞が死滅しないことによる肝炎の遷延化や発癌の原因となることが考えられる。近年、スフィンゴ脂質が種々の細胞機能の調節に重要であることが

明らかにされている。スフィンゴ脂質は、その構成因子にアポトーシス誘導因子と抗アポトーシス因子の両方が含まれるユニークな脂質であるが、肝細胞の生死決定のメカニズムにおいて、どのような役割をはたすかは、いまだ不明である。

2. 研究の目的

慢性肝炎あるいは肝硬変状態の肝細胞では、アポトーシスシグナルと抗アポトーシスシグナルが同時に活性化していることが考えられるが、どのようなメカニズムで抗アポトーシス状態を獲得しているのかは未だ不明である。また、スフィンゴ脂質シグナルの鍵酵素であるスフィンゴミエリナーゼはマクロファージの活性化に関与するとの報告がある。本研究ではクッパー細胞のスフィンゴ脂質が上述の作用に重要であるとの申請者の仮説にもとづき、動物実験モデルを用いて慢性肝障害におけるクッパー細胞のスフィンゴ脂質の役割を明らかにし、慢性肝障害における肝細胞の抗アポトーシス獲得機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウスに部分的胆管結紮術を施すことによって慢性肝障害を肝左葉にのみ誘導した。アレンドロネートの投与によりクッパー細胞を消去したマウスを作製し、胆管結紮による肝障害、肝再生、および肝線維化についてクッパー細胞消去による影響を検討した。また、結紮術後のマウスに腫瘍壊死因子 (TNF) を投与することにより、クッパー細胞消去によるアポトーシス抵抗性への影響を検討した。次に、クッパー細胞消去と肝細胞 AKT の関連を検討するため、Kupffer 細胞消去による肝 AKT 活性を、さらに非活性化型 AKT を発現するアデノウイルスをマウスに投

与し、肝再生と抗アポトーシス状態獲得に及ぼす影響を検討した。また、クッパー細胞の酸性スフィンゴミエリナーゼ (ASM) の役割を検討するため、ASM 欠損マウス由来の骨髄を野生型マウスに移植することにより、ASM 欠損クッパー細胞に置き換えたマウスを作製を試みた。

4. 研究成果

(1) マウスの左肝管を手術的に結紮させることにより、肝左葉にのみ慢性肝障害・線維化を誘導することができる。このマウスに少

量のガラクトサミンを併用して TNF を投与すると、健康肝では広範な壊死が誘導される



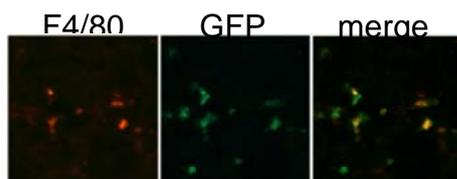
が、胆管が結紮された肝左葉には誘導されない。このことから慢性肝障害の状態にある肝細胞では抗アポトーシス状態を獲得していると考えられる。

(2) 次に、アレンドロネートをマウスに複数回投与することによりクッパー細胞を消去したマウスの作成し、同様の実験を行ったところ、慢性肝障害による抗アポトーシス状態は解除された。

(3) 抗アポトーシス状態を獲得について生存シグナルを中心に網羅的に解析した結果、障害肝では AKT 活性化が認められた。また、クッパー細胞の消去により AKT 活性化は抑制された。アデノウイルスベクターを用いた不活性化型 AKT の過剰発現は胆管結紮による保護

的作用を解除することから、慢性障害肝でのクッパー細胞を介した AKT 活性化が抗アポトーシス獲得に重要であると考えられた。

(4) スフィンゴミエリナーゼ欠損マウスでは野生型と比較し肝障害や肝線維化に差を認めた。しかし、どの細胞のスフィンゴミエリナーゼがどのような役割を持つのかは不明である。クッパー細胞のスフィンゴ脂質の役割を明らかにするため、スフィンゴミエリナーゼのクッパー細胞でのみのノックアウトを試みた。アレンドロネート投与と骨髄移植を組み合わせ、骨髄由来細胞のみがノックアウトされたキメラマウスの作成を試みたが GFP 発現マウスを用いた試行実験ではキメラマウスの作製に成功した。



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 7 件)

1. Nemoto, S., Nakamura, M., Osawa, Y., Kono, S., Itoh, Y., Okano, Y., Murate, T., Hara, A., Ueda, H., Nozawa, Y. and Banno, Y. Sphingosine kinase isoforms regulate oxaliplatin sensitivity of human colon cancer cells through ceramide accumulation and AKT activation. *J Biol Chem*, in print. 2009. 査読あり
2. Kodama, Y., Taura, K., Miura, K., Schnabl, B., Osawa, Y. and Brenner, D. A. Antiapoptotic effect of c-Jun N-terminal Kinase-1 through Mcl-1 stabilization in TNF-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*, 136, 1423-34. 2009. 査読あり
3. Osawa, Y. and Nagaki, M. Cyclooxygenase-2: its paradoxical roles in liver inflammation and fibrosis. *Hepatol Res*, 38, 772-4. 2008. 査読あり
4. Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C. H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D. A. and Schwabe, R. F. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*, 13, 1324-32. 2007. 査読あり
5. Miura, K., Yoshino, R., Hirai, Y., Goto, T., Ohshima, S., Mikami, K., Yoneyama, K., Watanabe, D., Sato, M., Senoo, H., Kodama, Y., Osawa, Y., Brenner, D. A. and Watanabe, S. Epimorphin, a morphogenic protein, induces proteases in rodent hepatocytes through NF-kappaB. *J Hepatol*, 47, 834-43. 2007. 査読あり
6. Mencin, A., Seki, E., Osawa, Y., Kodama, Y., De Minicis, S., Knowles, M. and Brenner, D. A. Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. *Hepatology*, 46, 1443-1452. 2007. 査読あり
7. Adachi, M., Osawa, Y., Uchinami, H., Kitamura, T., Accili, D. and Brenner, D. A. The Forkhead Transcription Factor FoxO1 Regulates Proliferation and Transdifferentiation of Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*, 132, 1434-46. 2007. 査読あり

[学会発表] (計4件)

1. Osawa Y Digestive Disease Week (DDW)
2008 Anti-apoptotic effects against
TNF-alpha treatment in bile duct
ligated mouse liver 2008年5月22日 サ
ンディエゴ
2. 大澤 陽介 第11回日本肝臓学会大会
肝星細胞におけるコラーゲン産生にかか
わる focal および systemic factor の検
討 2007年10月18日 神戸
3. 大澤 陽介 第18回 The Meeting of
Liver and Immunology 胆管結紮により
誘導された慢性肝障害マウスモデルにお
ける抗アポトーシス獲得機序 2007年9月
1日 京都
4. Osawa Y Digestive Disease Week (DDW)
2007 Systemic Mediators Induce
Fibrogenic Effects in Normal Liver
after Partial Bile Duct Ligation. 2007
年5月22日ワシントンDC

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 陽介 (OSAWA YOSUKE)
岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60447787

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

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 10 件)
- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年 (西暦)、査読の有無
 - ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年 (西暦)、査読の有無
 - ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年 (西暦)、査読の有無

- [学会発表] (計 5 件)
- ①
 - ②
 - ③

- [図書] (計 2 件)
- ①
 - ②

〔産業財産権〕

○出願状況（計□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

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

6. 研究組織

(1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：

(3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)
○○大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：