

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18144

研究課題名（和文）脱細胞化技術を用いた新たなヒト肝硬変モデルの開発とそれを用いた肝硬変治療法の探索

研究課題名（英文）Development of a novel human cirrhotic liver model using decellularization technique

研究代表者

宮内 雄也（Yuya, Miyauchi）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：30839064

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）：脱細胞化肝臓を用いて肝硬変モデルおよび正常肝モデルを作成した。肝硬変にモデルでは増加した細胞外基質によりIntegrin-FAKシグナルが増幅され、上皮間葉転換が引き起こされ、それにより肝細胞における肝特異的機能が低下することが示唆された。また肝硬変モデルにFAK阻害剤を投与することにより肝特異的機能が増加することが示され、肝硬変治療につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス性肝炎、アルコール性肝や炎脂肪肝により肝線維化が誘導され、肝硬変が引き起こされる。ウイルス治療や減量、断酒など原疾患の治療以外に低下した肝機能を改善する有効な方法は現在ない。当研究では肝硬変において変性、増加した細胞外基質が直接肝細胞にシグナルを与えることで、肝細胞の肝特異的機能が低下しているのではないかと予想を立てた。肝細胞が変性した細胞外基質で構成される微小環境から受けるシグナルを阻害することにより肝特異的機能を改善させ、肝硬変に伴う肝不全の治療へと繋げることを目的とした。

研究成果の概要（英文）：Liver cirrhosis model and normal liver model were made using decellularized technique. In liver cirrhosis model, the increased extracellular matrix amplifies the Integrin-FAK signal, which causes epithelial mesenchymal transition and diminished the liver-specific function in hepatocytes. In addition, it was shown that the liver-specific function increased by administering FAK inhibitor to the liver cirrhosis model, and it was indicated that it might lead to the liver cirrhosis treatment.

研究分野：肝硬変

キーワード：脱細胞化肝臓 肝硬変 微小環境 細胞外基質

### 1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、脂肪肝などに起因する慢性炎症の結果細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) が変性・蓄積し、最終的に肝機能が廃絶した『肝硬変』と呼ばれる治療困難な状態に至る。ウイルスに対する治療や禁酒、体重減量などにより慢性炎症が改善することで肝機能はある程度改善されることが知られているが、完全に改善することは現状では望めない。肝硬変に対する肝機能改善を目的とした治療は確立されておらず、根本的治療が望まれている。

### 2. 研究の目的

近年、細胞の足場となる ECM 自身が細胞機能に与える影響について注目されている。硬変肝における変性した ECM が肝細胞に何らかの影響をあたえることで、肝特異的機能が低下していることが予想される。本研究では硬変肝を脱細胞化することで、変性した ECM (硬変肝 ECM) を抽出し、それを足場として正常肝由来肝細胞を 3 次元培養する。同様に正常肝より正常肝 ECM を抽出し、それを足場として正常肝由来肝細胞を 3 次元培養する。これらの培養された肝細胞を解析することにより、硬変肝 ECM が肝細胞に与える影響を評価すること、またその機序を明らかにすることにより治療候補を見出してくることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト由来硬変肝および正常肝を用いて研究の予定であったが肝硬変組織、正常肝組織が安定して採取できないためラットを用いて研究を行った。

ラットに四塩化炭素を腹腔内投与することにより肝硬変モデルを作成した。対照となる正常肝モデルは同月齢のラットを使用した。それぞれの肝臓を摘出し、Tryton-X、Trypsin、EGTA などの薬剤を経門脈的に投与することにより細胞成分を除去した脱細胞化肝臓を作成した。それぞれのモデルに正常肝モデルより採取してきた正常肝細胞を経胆管的に投与し、3 次元培養を行った。それぞれを 4 日間培養し、肝機能やシグナル活性を評価した。

### 4. 研究成果

まず肝硬変モデルおよび正常肝モデルを作成した (Fig.1)。それぞれのモデルを免疫染色や構成成分の定量測定を行ない、硬変肝モデルではコラーゲンなどの細胞外基質が非規則的に増生していることを確認した。

続いてそれぞれのモデルで 3 次元培養を行った (Fig.2)。正常肝細胞はコラーゲン還流法を用いて採取してきた。採取した肝細胞は低速遠心を行うことで肝細胞の純度を確保し、生存率を確認し 90% 以上のもののみを使用した。正常肝細胞を脱細胞化組織に注入する方法としては胆管経路を用いた。肝細胞をそれぞれのモデルに投与すると肝実質内へ移行し、両組織間で生着率に有意差ないことを確認できた。作成した正常肝モデルおよび肝硬変モデルを 4 日間培養し、生存率の評価を行った。両モデル間で培地中の LDH の測定を行い有意差がないこと、また培養 4 日目の残存 DNA 量にて両モデル間に有意差がないことを確認した。

それぞれのモデルで 4 日目の遺伝子発現を検討したところ、alb・cyp3a1 といった肝特異的遺伝子は肝硬変モデルでは有意に発現が抑制されていた (Fig.3)。免疫染色にて Albumin・CYP3a1 を評価したところ、肝硬変モデルでは Albumin・CYP3a1 のタンパク発現が有意に抑制されていることが確認できた (Fig.4)。

ECM から細胞へのシグナル伝達の一つである Integrin- FAK シグナルを検討したところ、肝硬変モデルでは Integrin やリン酸化 FAK の発現が有意に増加していた (Fig.5)。さらに肝硬変モデルでは肝特異的機能を示す HNF4a の遺伝子発現は低下し、上皮間葉転換を示す snail の遺伝子発現は増加していた (Fig.6)。続いて FAK 阻害剤を投与し Integrin-FAK シグナルの抑制試験を行った。FAK 阻害剤投与された肝硬変モデルでは HNF4a の遺伝子発現が容量依存性に増加し、免疫染色にて HNF4a 発現が増加していた。一方、FAK 阻害剤投与により上皮間葉転換を示す snail の遺伝子発現は低下することが示された (Fig.7)。これらから肝硬変モデルでは Integrin-FAK シグナルを介して上皮間葉転換が惹起され、それに伴い肝特異的機能が低下することが示唆された。

これらの研究結果から肝硬変では変性増大した ECM が Integrin- FAK シグナルを介して直接肝細胞に上皮間葉転換を引き起こし、その結果として肝特異的機能が低下することが示唆された。これらのシグナルを制御することにより肝機能が改善することが期待できる。

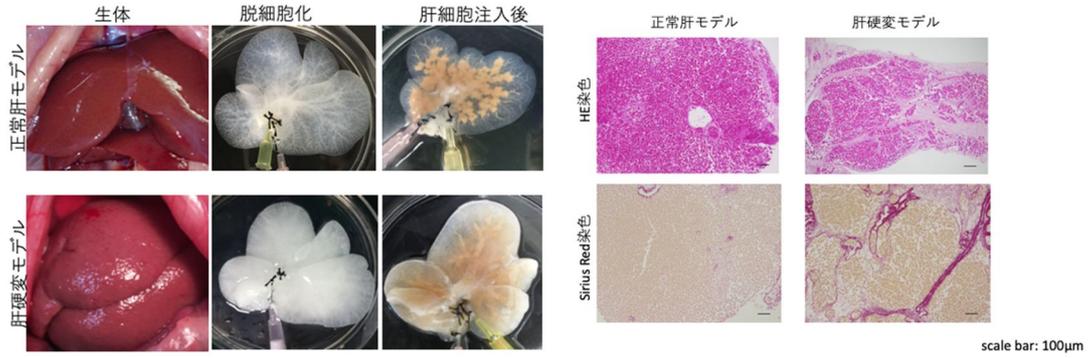


Fig.3

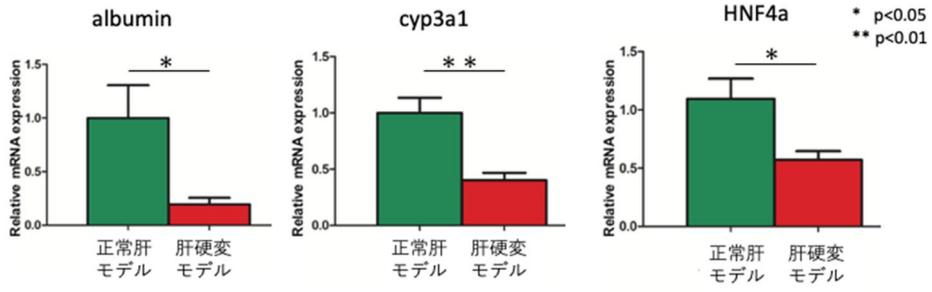


Fig.4

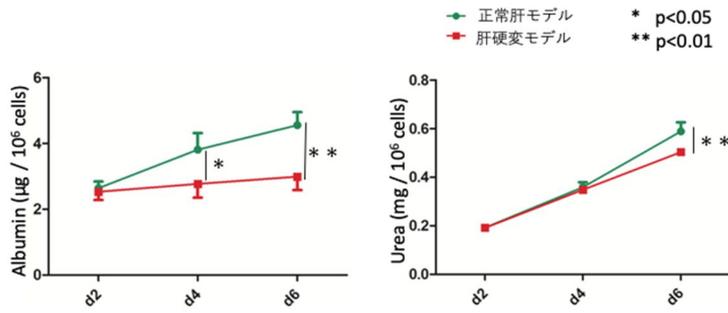


Fig.5

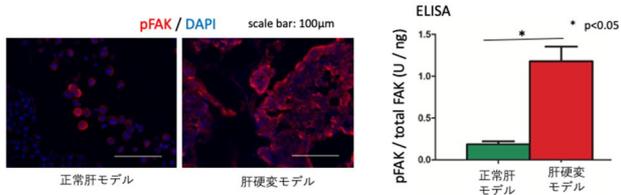


Fig.6

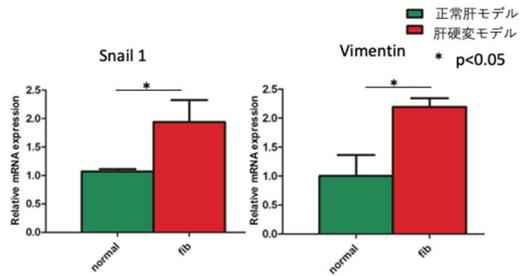
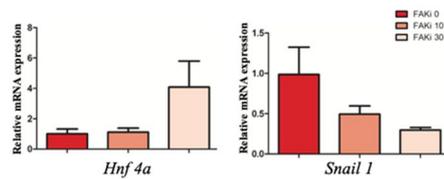


Fig.7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuya Miyauchi
2. 発表標題 A novel culture system using natural ECM of fibrotic livers to investigate new drugs for HCC
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Miyauchi
2. 発表標題 Extracellular Matrix (ECM) in Fibrotic Livers Inhibits Hepatocyte Specific Function
3. 学会等名 American collage of Surgeons, Clinical Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮内雄也
2. 発表標題 脱細胞化技術を用いた新たな肝硬変モデルの作成
3. 学会等名 消化器外科学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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