

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590282

研究課題名 (和文)

BMP受容体欠損マウスにおける肝細胞の損傷修復機構

研究課題名 (英文)

Repair mechanism of liver injury in BMP receptor deficient mouse.

研究代表者

佐藤建三 ( SATO KENZO )

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：40113196

研究成果の概要 (和文)：

肝障害初期過程で一過性に発現誘導される BMP-2/4 が、肝細胞損傷の修復過程でどのような役割を果たしているかを解析した。アデノウイルスベクターにより肝臓特異的に BMP 受容体をノックアウトしたマウスでは、CC14 肝障害に対する修復の遅延が見られた。また細胞増殖マーカー PCNA の発現レベルは低下していた。以上のことから、BMP シグナルが肝臓障害の細胞増殖の誘導を介して、損傷修復過程に関与することが示された。

研究成果の概要 (英文)：

We have found a transient expression of BMP-2/4 (bone morphogenetic protein) in early stage of CCl4-injured liver, and attempted to disclose the role of BMPs in repair process of injured liver in this study. As the results, we observed delay in recover of hepatic gene expression such as albumin, and decrease in expression of cell proliferation marker PCNA in liver injured by CCl4. These results suggested the important role of BMP signal in repair process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：遺伝子、再生医療、肝障害、BMP 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、C型肝炎ウイルスの活性化や薬物摂取による肝炎、肝硬変、肝癌による死亡者数が増加傾向にあり、その発症メカニズムの解明や治療法の開発は社会的急務となっている。

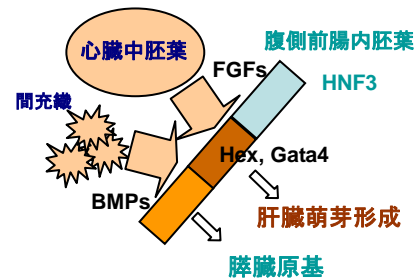
肝臓は自己再生能力の強い臓器であるため、肝臓移植においては残存の肝臓細胞の同調的な増殖と分化によって急速な修復が引き起こされる。しかし、肝炎ウイルスや薬物摂取などにより繰り返される肝細胞の損傷と修復は、結果的に肝炎を肝硬変へと至らしめる。現在この修復のメカニズムに関し、大きく分けて2つのモデルが提唱され、検証が進められている (Thorgeirsson S. *Hepatology* 43, 2-8, 2006)。一つは残存する未分化肝細胞（肝幹細胞）の増殖分化であり、もう一つは造血系細胞に由来する幹細胞の肝細胞への分化または細胞融合による肝細胞形成である。しかし、肝障害に伴い侵入し、肝細胞に分化する造血系細胞は極めてわずか(0.025%以下)であり (Lagasse E. *Nature Med.* 6:1229-1234, 2000)、広範な肝臓の修復には、内在する未分化肝幹細胞の増殖、分化誘導は必須であると考えられるが、現在、何がこの分化誘導に関っているのかは十分理解されていない。

一方、初期胚における肝臓形成の過程で、腹側前腸内胚葉が心臓中胚葉や間充織細胞からの骨形成因子 (BMP-4) や FGF-2 刺激によって増殖分化し、肝原基の形成に導かれていることが明らかにされている (Duncan SA, *Gene Dev* 15:1879-1884, 2001)。腹側内胚葉は Hex や GATA4 などの転写因子の発現が特徴的であり、この内因性の分化プログラムと中胚葉からの外因性の刺激によって肝臓形成が達成されている(図1)。

肝障害における再生シグナル誘導の研究に関して、我々はこれまでに次の点を明らかにし、この研究における基礎的な知識と技術的な基盤を高めることができた。四塩化炭素肝障害初期過程において、肝再生シグナルが始動していることを NF- $\kappa$ B および Erk シグナルの一過性の活性化によって明らかにした (*Life Sci.* 75:1539-1549, 2004)。肝障害初期過程で一過性に BMP-2 をはじめ FGF-2、Hex などの発現を観察した(図2、*J. Biochem* 141:113-119, 2007)。これらのサイトカインや転写因子は動物初期胚における肝臓の形態形成過程で重要な役割を果たすものである。すなわち、肝障害におけるマクロファ

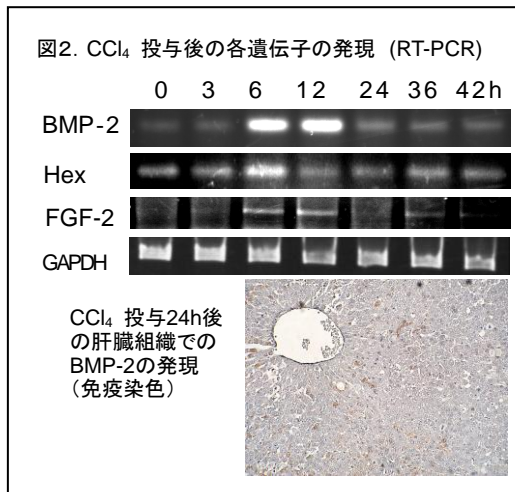
ージや単核球由来細胞などの活性化は肝細胞の損傷の誘導とともに、一方では BMP などのサイトカインを介した肝細胞分化誘導シグナルが未分化型肝細胞の分化・成熟に関与する可能性を示唆するものであった。このような初期胚で活性化された肝細胞増殖分化のシグナルが、成体での薬物肝障害の修復過程においても利用されるという観点から、肝細胞損傷の修復過程の研究を試みた例はこれまでに世界中にない初めての試みである。この肝再生シグナルの制御のメカニズムの解明は、肝障害からの治療をめざして、有益な基礎知識となることが期待される。

図1 初期胚におけるFGF,BMPによる肝細胞分化の誘導



## 2. 研究の目的

我々はこれまでにつぎのことを明らかにし、研究の基盤を作り出した。肝線維症モデルラットに尾静脈よりアデノウイルスベクターを導入すると、線維隔壁内の線維芽細胞を中心に *in vivo* 遺伝子導入が可能である (*J. Hepatol.* 30:101, 1999)。アデノウイルスの線維芽細胞への感染効率の改善はファイバーに変異を入れることによって達成できる (*Hum. Gene Ther.* 13:613, 2002, *J. Virol.* 77:2512, 2003)。肝星細胞の活性化や線維化の進行に関わる TGF- $\beta$  活性を抑制する LAP (latency-associated peptide) 遺伝子をアデノウイルスベクターにより導入することで、筋線維芽細胞を逆分化させることができた (*B.B.R.C.* 311:959-965, 2003)。また、四塩化炭素による成熟肝細胞および肝前駆細胞の増殖分化誘導・損傷修復系のほか、レトロリン/四塩化炭素処理による骨髄性幹細胞や肝幹細胞の活性化の現象が知られている。この2つの肝臓障害・修復系に注目する。本研究においては、肝障害初期過程で一過性に誘導される BMP-2/4 が、肝細胞損傷の修復過程で重要な役割を果たしていると考え、①BMPs が肝臓内のどの細胞種により、どのようなメカニズムで産生され、②未分化型肝細胞の分化・成熟にどのように関与しているのかどうかを、BMP 受容体のコンディショナル・ノックアウト・モデル動物および BMPs

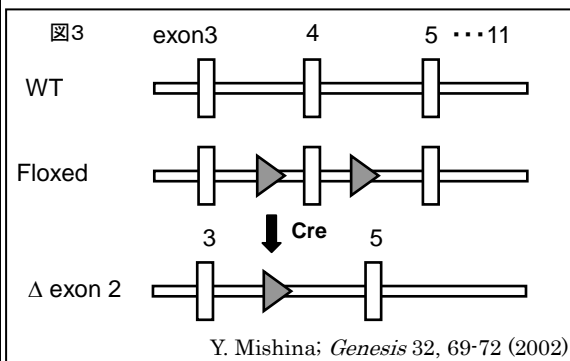


発現レポーター・トランスジェニックマウスを用いて分子生物学的手法により解析する。また試験管内での損傷-修復モデル系を構築しサイトカインなど損傷細胞に由来する再生誘導シグナルを同定し、肝細胞損傷の修復過程を解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

これまでの研究から、肝障害の初期過程において、骨形成因子 (BMPs) 発現が一過性に誘導されることを明らかにしたが、本研究においては、この BMP 発現の生物学的意義、肝細胞損傷と修復過程における役割を解明しようと試みるものである。BMPR-1A (Alk3) ノックアウトマウスは胎生致死となるため、コンディショナル・ノックアウト (Floxed) マウスやドミナントネガティブ変異を使用し、アデノウイルスベクターを介した遺伝子導入により成体での受容体欠損マウスを作成し、障害応答性、損傷修復過程を遺伝子発現レベルや組織構造レベルで解析する。なお、使用する BMPR-1A (Alk3) コンディショナル・ノックアウト (Floxed) マウスは米国 NIEHS の三品裕司博士により分与され、系統を維持した (図3)。

①BMP の肝修復過程へのかかわりを解析するために、BMPR-1A コンディショナル・ノックアウト (Floxed) マウスを用い、Cre 発現アデノウイルスを尾静脈より投与することで肝臓において BMP 受容体発現を抑制し、その後、肝障害を誘導することで、その修復過程を遺伝子発現レベルと組織構造レベルで解析した。さらに、BMPR-1A 受容体の細胞内キナーゼドメインを欠失した蛋白 (ドミナントネガティブ) をアデノウイルスを介して発現させることで、BMP 受容体欠損マウスを作成し、同様な解析を行った。②BMP プロモーターにルシフェラーゼを結合したトランスジェニックマウスを作成し、BMP



の発現を非侵襲的に、リアルタイムで観察する。③また、同定された細胞種を単離・培養し、試験管内における損傷-修復モデルを構築する。その実験系で BMP-2/4 遺伝子発現制御の可能性や、損傷細胞や炎症細胞からの未同定の分泌物による BMP-2/4 遺伝子発現誘導の可能性を追求する。

### 4. 研究成果

①肝障害の修復過程における BMP シグナルの役割を検討するために、BMP 受容体のコンディショナル・ノックアウトマウスを用いて、CCL4 障害の修復を観察した。

まず、Floxed/Floxed マウスを維持し、+/-ヘテロマウスと交配し、Floxed/-マウスを選別した。コントロールとして Floxed/+マウスを使用した。これらのマウスに Cre 組換え酵素を搭載したアデノウイルスを介して尾静脈より導入すると、高い効率で肝臓に遺伝子導入が可能である。ノックアウトが誘導されたことは

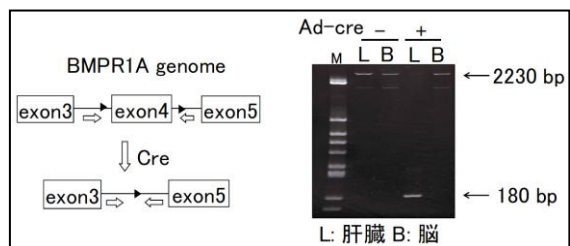


図4. Ad-Creによるノックアウトの誘導

図4に示すように、Exon4が短縮されていることから明らかである。

②さらにこれらのマウスに CCl<sub>4</sub> 肝障害を誘導し、経過を観察した。24時間で肝障害が広がっているが、コントロールとして LacZ 遺伝子をもつアデノウイルスを導入すると72時間後には組織の回復が観察されるが、Ad-Creを導入したマウスでは、白色の壊れた組織の回復は遅延していることが示される (図5)。

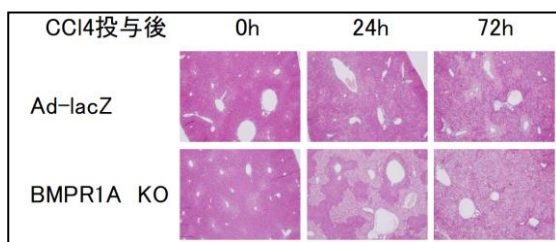


図5. BMPR-1A ノックアウトマウスにおける肝障害の修復

さらに遺伝子発現では図6に示すように

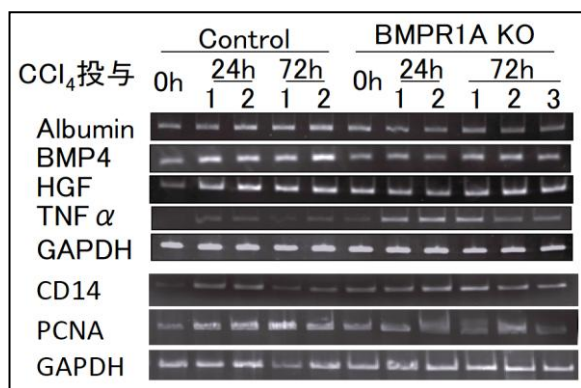


図6. BMPR-1A ノックアウトマウスにおける遺伝子発現

肝臓マーカーであるアルブミンの発現がコントロールマウスでは障害 72 時間後に回復が見られるが、BMPR-1A ノックアウトマウスでは回復のレベルは低いことが示された。

③BMPR-1A ノックアウトマウスにおける増殖マーカーに対する影響を調べたところ、図7に示すように、増殖マーカーKi67の発現細胞の数の減少が観察された。

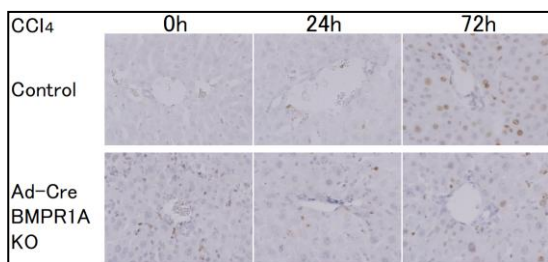


図7. 増殖マーカーKi67の発現

以上の結果から、肝障害の修復過程に BMP シグナルは細胞増殖刺激として、重要な役割を持つことが示された。

## 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 5 件)

1. Yusuke Takahashi, Saori Tsuji, Yasuhiro Kazuki, Makoto Noguchi, Ichiro Arifuku, Yukihiro Umebayashi, Tomoko Nakanishi, Mitsuo Oshimura, and Kenzo Sato: Development of evaluation system for bioactive substances using human artificial chromosome-mediated osteocalcin gene expression. *J Biochem.* 148(1) 29-34, 2010.

2. Yasutaka Yamamoto, Takashi Matsuura, Genta Narazaki, Miyoko Sugitani, Kohei Tanaka, Akihiro Maeda, Goshi Shiota, Kenzo Sato, Akio Yoshida, and Ichiro Hisatome: Synergistic effects of autologous cell and hepatocyte growth factor gene therapy for neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1329-H1336, 2009.

3. Mitsuhi Hirata, Kumiko Amano, Ayumi Miyashita, Mayu Yasunaga, Tomoko Nakanishi and Kenzo Sato: Establishment and characterization of hepatic stem-like cell lines from normal adult rat liver. *J. Biochem.* 145(1)51-58, 2009.

4. Nagahama Y., Ishimaru M., Osaki M., Inoue A., Maeda A., Nakada C., Moriyama M., Sato K., Oshimura M., Ito H.: Apoptotic pathway induced by transduction of RUNX3 in the human gastric carcinoma cell line MKN-1. *Cancer Science* 99 23-30, 2008.

5. M. Hashimoto, M. Taniguchi, S. Yoshino, S. Arai, K. Sato: S phase-preferential Cre-recombination in mammalian cells revealed by HIV-TAT-PTD-mediated protein transduction. *J. Biochem.* 143, 87-95, 2008.

[学会発表] (計 11 件)

近江 奈央, 天野 久美子, 宮下 肖美, 中西 友子, 佐藤 建三: マウス肝障害の回復における BMP シグナルの役割. 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2010 年 12 月 10 日 神戸市ポートアイランド

他 10 件

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.tottori-u.ac.jp/smgkjm/229/2186.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤建三 (SATO KENZO)  
鳥取大学・医学部・教授  
研究者番号：4 0 1 1 3 1 9 6

### (2) 研究分担者

堀 直裕 (HORI NAOHIRO)  
鳥取大学・医学部・准教授  
研究者番号：8 0 2 6 3 4 6 6

中西友子 (NAKANISHI TOMOKO)

鳥取大学・医学部・助教  
研究者番号：1 0 3 4 4 8 6 3  
(H20 → H22.10)