

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590770

研究課題名（和文） 転写制御因子HNF-4を応用した肝再生療法の確立と肝不全治療システムの構築

研究課題名（英文） Development of regenerative medicine and therapeutic system for hepatic failure applied by hepatocyte nuclear factor 4

研究代表者

永木 正仁 (NAGAKI MASAHITO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30293559

研究成果の概要（和文）：

肝前駆細胞に、HNF4 遺伝子を強発現させると、肝細胞への分化が促進された。Dimethylnitrosamine (DMN) 誘導肝硬変マウスに、HNF-4 を導入した胎児肝前駆細胞を尾静注すると、生存率と肝特異的機能の有意な改善が認められた。ラット 2-acetylaminofluorene (AAF) 投与後部分肝切除モデルに、HNF-4 遺伝子を尾静脈より投与すると、肝細胞と胆管細胞の前駆細胞と考えられる卵円形細胞 oval cell の肝細胞分化誘導が認められた。HNF4 遺伝子を導入した肝前駆細胞の細胞移植療法や HNF4 遺伝子治療は、肝再生医療に有効である。

（英文）：

We transfected adenovirus-mediated HNF-4 into hepatic progenitor cells, and analyzed the expressions of the liver-specific functions. Adenovirus-mediated HNF-4 gene transfer resulted in increases in the expressions of HNF-4, apolipoprotein (Apo)A1 ApoC3, and pregnane X receptor (PXR) mRNA. HNF-4-overexpressing hepatic progenitor cells were then injected into recipient mice, which were treated with dimethylnitrosamine and 30% partial hepatectomy. The treated mice survived significantly longer than the control mice. The plasma levels of albumin, total cholesterol, and glucose were higher in the mice treated with cells transfected by HNF-4 than in the control mice. Male Wistar rats were administered 2-acetylaminofluorene subcutaneously. Seven days later, they received 70% partial hepatectomy and infected with a recombinant adenovirus carrying the cDNA for HNF-4 or Lac-Z. The total numbers of oval cells significantly decreased in the HNF-4 treated rats. At this point, HNF-4-treated rats experienced an inhibition of liver cell proliferation, while mRNA expressions of HNF-4, apolipoprotein CIII, tyrosine amino transferase and albumin, markers for the differentiation of hepatocytes, increased. In contrast, mRNA expression of cytokeratin-19, a marker for the differentiation of biliary epithelial cells, decreased in the livers of HNF-4 transferred rats. These findings demonstrate that adenovirus-mediated HNF-4 transfection induces the differentiation from hepatic progenitor cells to hepatic parenchymal cells *in vitro* and that these cells may be useful as a source for cell transplantation in liver diseases. The transfer of HNF-4 gene could accelerate the differentiation of hepatic oval cells to hepatocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：(1) 肝不全 (2) 再生医療(3) 遺伝子治療 (4) 肝炎 (5) 転写因子

1. 研究開始当初の背景

急性肝不全(劇症肝炎)や慢性肝不全(肝硬変)の病態は、広範に進展した肝細胞死と肝再生不全によって特徴づけられる。その結果生じた高度の肝細胞機能障害によって、生体のホメオスタシス維持に破綻を来し、肝性昏睡をはじめとした種々の肝不全症状が惹起される。肝疾患の重症度は、肝細胞死の程度と引き続いて生じる肝細胞増殖によって規定されているといっても過言ではなく、肝不全メカニズムの解明は、肝細胞死のメカニズムの解明と肝再生不全のメカニズムの解明に他ならない。しかしながら、肝不全の発症機序には未だ不明な点が多く、内科的集学的治療の発達にも関わらず、劇症肝炎ならびに末期肝硬変は極めて生命予後不良の疾患となっている。欧米においては、また本邦においても最近、肝移植が肝不全の最も有効な治療法として確立しつつあるが、脳死肝移植が施行されるようになったとはいえ、その症例数は未だ少なく、生体肝移植症例と合わせてもそのドナー不足は深刻である。肝臓は本来、非常に迅速で精密な再生能力を有しているため、適切な治療がなされた場合、劇症肝炎患者はまったく正常な状態への回復が見込まれるし、肝移植においてもドナー不足や移植患者が半永久的に免疫抑制剤の投与を余儀なくされることを考えると、劇症肝炎並びに末期肝硬変の治療において肝移植が最も理想的な治療法とは言い難い。

肝再生不全が生じる原因として肝幹細胞や幼若肝細胞から成熟肝細胞への適切な再生、分化が障害されている可能性が想定される。しかしながら成熟肝細胞への増殖、分化機構は未だ不明な点が多い。近年、HNF-1, -3, -4, -6, C/EBP などの一群の転写因子が肝細胞分化や肝細胞特異的遺伝子の発現に重要な役割をはたしていることが明らかにされ、肝臓の発生、分化の分子機構での解明が進んでいる (Schrem H, et al, *Pharmacol Rev* 2002;542:129-158)。これら転写制御因子の中で、HNF-4 が肝細胞の特異的遺伝子の発現制御にマスター因子として最も中心的な役割を果たしていることが報告されている (Odom DT, et al, *Science* 2004;303:1378-1381)。また、我々も HNF-4 をアデノウイルスに組み込んだベクターを作製し、ヒト肝癌細胞株やラット初代肝細胞に HNF-4 を遺伝子導入し、cDNA マイクロアレイを用いて検討した結果、HNF-4 遺伝子導入によって、代謝に関

連した遺伝子を中心に多数の肝特異的遺伝子の発現が増強されることを認め報告した (Naiki T, et al, *J Biol Chem* 2002;277:14011-14019)。一方で細胞外マトリックスの肝細胞分化、増殖への重要性が指摘されている。我々は、細胞外マトリックスによる肝細胞分化制御は、HNF-4 を介した転写段階で調節されていることを世界で初めて証明した (Nagaki M, et al, *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:38-43)。しかしながら、細胞外マトリックスによって制御される肝細胞骨格の変化と HNF-4 の発現誘導の分子機構には不明な点が多い。

2. 研究の目的

転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) の肝細胞死における機構と hepatocyte nuclear factor (HNF)-4 の肝細胞特異的遺伝子発現における機構を明らかにし、動物モデルを用いて HNF-4 遺伝子誘導を応用した肝再生療法を確立し、肝不全治療の臨床応用を目指す。肝再生療法を医療に応用するには肝細胞がどのようなメカニズムで生、死、増殖、分化を選択し進行しているのかを深く理解する必要がある。この肝細胞のライフサイクル制御に中心的役割を果たすのが転写因子である。本研究は、HNF を中心とした転写因子を介した肝細胞分化機構を明らかにし、転写因子を人為的に制御することで、肝再生療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(in vitro での検討)

肝前駆細胞を得るために、胎生 14 日のマウス胎児肝から磁気ビーズ (MACS) にて血球成分及びその前駆細胞 (Lineage+) を除去し、Lineage-細胞と Lineage+細胞を各々培養し、RT-PCR, 免疫染色にて検討した。さらに肝前駆細胞に CAG プロモーター下に HNF4 を組み込んだ非増殖型アデノウイルスを培養 5 日後に添加し、遺伝子導入 2 日後に、RT-PCR, Northern blot, Western blot により肝細胞特異的機能の発現を検討した。

(in vivo での検討)

Dimethylnitrosamine を腹腔内に週 3 回投与することで肝硬変モデルを作成し、2 週間後に LacZ, HNF4 を遺伝子導入した Tg-GFP 由来マウスの胎児肝前駆細胞を尾静注し、その治療効果を検討した。

Wistar ラットに 2-AAF (2-acetyl amino

fluorene)を皮下投与し、1週間後に70%部分肝切除後、AdHNF-4 (2.0×10^9 PFU/body) またはコントロールとしてAdLac-Zを尾静注した。3、7、9、14日後に、HE染色にて門脈周囲 $0.25 \times 0.25 \text{mm}^2$ の oval cell をカウントした。また、PCNA染色を用いて細胞増殖を検討した。さらに、real time PCRを用いて遺伝子発現を検討し、肝細胞分化について検討した。

4. 研究成果

・ 肝前駆細胞分離と HNF-4 遺伝子導入による分化誘導

(in vitro での検討)

MACSにて分離したLineage陰性細胞は胎児肝全体の約10%を占めていた。培養5日後のコロニー数を検討したところ、血球系由来細胞であるLineage陽性細胞と比較するとLineage陰性細胞は高度の増殖能を有し、ラミン上での培養において、より増殖が顕著であり、継代が可能であった。

RT-PCRにて肝細胞、胆管細胞、臍由来の遺伝子発現を解析したところ、分離直後の肝前駆細胞は、肝細胞(albumin (Alb)、 α -antitrypsin(α 1AT)、 α -fetoprotein(α FP))、胆管細胞(cytokeratin19 (CK19)) 臍臓由来遺伝子 (glucose transporter-2 (Glut-2)、insulin、pancreatic duodenal homeobox-1 (Pdx-1)、paired box gene4 (Pax4)、islet factor 1 (Isl-1)、neurogenin3 (Ngn3)) を発現しており、多分化能を示したが、臍由来の遺伝子は培養経過とともに発現が低下した。蛋白レベルにおいて、培養10日後のコロニーの中心部はAlbuminに、コロニー周辺部はCK19に染色され、肝細胞と胆管細胞への分化が進行していた。3ヶ月間の長期培養では、Albuminの染色は維持されていたが、CK19の染色は低下した。以上より、Lineage細胞群には、将来肝細胞となり得る肝前駆細胞が豊富に含まれていることが証明された。

肝前駆細胞にHNF4遺伝子を導入したところ、遺伝子レベル、蛋白レベルにおいてHNF4の発現増強が確認された。RT-PCRの検討では、肝細胞分化マーカーである tyrosine amino transferase (TAT) や薬物代謝を制御する pregnane X receptor (PXR) の発現増強が認められた。また Apolipoprotein A1 (ApoA1)、Apolipoprotein CIII (ApoCIII) などの脂質輸送タンパクを制御する遺伝子や薬物代謝を制御する PXR の増強が認められた。また HNF4 遺伝子導入による経時的変化を Northern blot にて検討したところ、Albumin は導入2日後には軽度発現増強を認め、7日後には発現維持があり、ApoA1 は導入7日後まで発現増強と維持が認められた。

・ HNF-4 遺伝子導入肝前駆細胞の細胞移植の解析

(in vivo での検討)

Dimethylnitrosamine を腹腔内に週3回投与し、2週間後にLacZ、HNF4を導入したGFP-Tg mice 由来の胎児肝前駆細胞を尾静注し、治療効果を検討した。移植後2週間後に宿主側肝切片内を組織学的に検討したところ、GFP抗体で染色される移植胎児肝前駆細胞は、Albumin抗体にも染色された。

細胞移植4週間後の宿主肝にLacZならびにHNF4遺伝子導入したGFP-Tg mice 由来の胎児肝前駆細胞を確認したが、LacZならびにHNF4遺伝子を導入した細胞間数に明らかな差異は認められなかった。

肝組織をNorthern blotにて検討したところ、移植後2週、4週ともにAlbumin mRNAは変化を認めなかったが、HNF4、ApoA1において発現の増強がみられた。血清学的には、T-Chol、TG、BSの改善が認められた。

マウスの生存率をKaplan-Meierにて検討したところ、移植なし群とLacZ群、LacZ群とHNF4群間は、有意差を認めなかったが、移植なし群とHNF4群間は、有意の生存率の改善が認められた。

・ HNF-4 遺伝子導入による oval cell 数、肝細胞増殖、肝機能の解析

HE染色にて門脈周囲 $0.25 \times 0.25 \text{mm}^2$ の oval cell を計測した。oval cell は、7日目をピークに徐々に増加した。肝内の oval cell 数は、Day 4、7では両マウス間に大きな差はなかったが、Day 9、14において、コントロール群と比較してHNF-4マウスで有意に減少していた。oval cell の増殖を評価するために、PCNA染色を行った。Day 9にコントロール群と比較してHNF-4マウスにおいて oval cell の増殖が抑制されていた。

HNF-4マウスにおいて、Day 7にASTとALTは低下し、総コレステロールは増加し、グルコースは減少していた。Albumin はDay 14で有意に増加した。

・ HNF-4 遺伝子導入による肝細胞特異遺伝子および胆管上皮細胞特異遺伝子の mRNA の発現

real time PCR法を用いて肝細胞関連遺伝子および胆管上皮細胞関連遺伝子 mRNA の発現を検討した。HNF-4マウスにおいて肝細胞分化マーカーであるHNF-4、ApoCIII、TAT、Alb遺伝子発現の経時的な増加を認め、胆管細胞マーカーであるCK-19は逆に抑制されていた。これらの結果は、HNF-4遺伝子導入が oval cell の分化を肝細胞へ誘導したことを示している。

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17件)

1. Suetsugu A, Osawa Y, Nagaki M Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM. Imaging the recruitment of cancer-associated fibroblasts by liver-metastatic colon cancer. *J Cell Biochem* 112;2011:949-953.
 2. Osawa Y, Seki E, Kodama Y, Suetsugu A, Miura K, Adachi M, Ito H, Shiratori Y, Banno Y, Olefsky JM, Nagaki M, Moriwaki H, Brenner DA, Seishima M. Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *FASEB J* 2011;25:1133-1144.
 3. Kimura K, Sekiguchi S, Hayashi S, Hayashi Y, Hishima T, Nagaki M Kohara M. Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury. *J Leukocyte Biol* 2011;89:433-442.
 4. Suetsugu A, Osawa Y, Nagaki M, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. Simultaneous color-coded imaging to distinguish cancer "stem-like" and non-stem cells in the same tumor. *J Cell Biochem* 2010;111:1035-1041.
 5. Kimura K, Hayashi S, Nagaki M. Roles of CD44 in chemical-induced liver injury. *Curr Opin Drug Disc* 2010;13:96-103.
 6. Osawa Y, Seki E, Adachi M, Suetsugu A, Ito H, Moriwaki H, Seishima M, Nagaki M. Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* 2010;51:237-245.
 7. Kimura K, Nagaki M, Saio M, Hosoi A, Saeki T, Okuda Y, Kuwata K, Moriwaki H, Kakimi K. Role of CD44 on CTL-induced acute liver injury in hepatitis B virus transgenic mice. *J Gastroentel* 2009;44:218-227.
 8. Kimura K, Nagaki M, Matsuura T, Moriwaki H, Kakimi K. Pathological role of CD44 on NKT cells in carbon tetrachloride-mediated liver injury. *Hepatol Res* 2009;39:93-105.
 9. Tsukada Y, Nagaki M Suetsugu A, Osawa Y, Moriwaki H. Extracellular matrix is required for the survival and differentiation of transplanted hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381:733-737.
 10. Kimura K, Nagaki M, Kakimi K, Saio M, Saeki T, Okuda Y, Kuwata K, Moriwaki H. Critical role of CD44 in hepatotoxin-mediated liver injury. *J Hepatol* 2008;48:952-961.
 11. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Differentiation of mouse hepatic progenitor cells induced by hepatocyte nuclear factor-4 and cell transplantation in mice with liver fibrosis. *Transplantation* 2008;86:1178-1186.
 12. Nagaki M, Moriwaki H. Transcription factor HNF and hepatocyte differentiation. *Hepatol Res* 2008;38: 961-969.
 13. Osawa Y, Nagaki M. Cyclooxygenase-2: its paradoxical roles in liver inflammation and fibrosis. *Hepatol Res* 2008;38:772-774.
 14. 永木正仁, 森脇久隆. 劇症肝炎の発症機序. *臨床消化器内科* 2008年;23巻:1759-1765.
- [学会発表] (計25件)
1. The 18th United European Gastroenterology Week (UEGW) 2010年10月25日 バルセロナ Basic Science Workshop 「Pattern recognition receptor signalling」 Toll-like receptors induce lethal hepatic inflammation in D-galactosamine-sensitized mice. Tsukada Y, Nagaki M Suetsugu A, Osawa Y, Kimura K, Moriwaki H.

2. The 18th United European Gastroenterology Week (UEGW)
2010年10月26日 バルセロナ
Free Paper Session 「Basic aspects of inflammation and fibrosis in the liver and pancreas」 Toll-like receptors induce lethal hepatic inflammation in D-galactosamine-sensitized mice.
Tsukada Y, Nagaki M Suetsugu A, Osawa Y, Kimura K, Moriwaki H.
3. JDDW2010 (第14回日本肝臓学会大会)
2010年10月13日 横浜
パネルディスカッション「肝臓の再生機構を考える：今後の肝再生医療への展望」
肝細胞死と肝再生・肝線維化連携機構における Kupffer 細胞の役割。
大澤陽介、永木正仁、森脇久隆。
4. 第36回日本急性肝不全研究会
2010年5月26日 山形
シンポジウム「急性肝不全新規治療法の開発とその課題」
基調講演「急性肝不全の病態と肝再生療法」
永木正仁、武藤泰敏、森脇久隆
5. 第46回日本肝臓学会総会
2010年5月27日 山形
肝障害誘導における Toll-like receptor の関与
塚田良彦、永木正仁、末次 淳、大澤陽介、木村公則、森脇久隆
6. Digestive Disease Week (DDW)
2010年5月3日 ニューオーリンズ
7. Inhibition of acid sphingomyelinase causes hepatic glucose intolerance and insulin resistance.
Osawa Y, Ito H, Suetsugu A, Nagaki M, Moriwaki H, Seishima M.
8. DDW2009 (第13回日本肝臓学会大会)
2009年10月15日 京都
前駆細胞移植における細胞生存および分化に対する細胞外マトリックスの重要性
塚田良彦、永木正仁、末次淳、大澤陽介、森脇久隆
9. JDDW2009 (第13回日本肝臓学会大会)
2009年10月14日 京都
ワークショップ3「免疫担当細胞異常からみた肝疾患の動態」
胆管結紮誘導性慢性肝障害マウスモデルにおける Kupffer 細胞の役割。
大澤陽介、永木正仁、森脇久隆
10. 第16回肝細胞研究会
2009年6月27日 山形
シンポジウム「肝幹細胞の分化・増殖と再生のメカニズム」
肝幹/前駆細胞の分化誘導と肝再生療法への応用
永木正仁、末次 淳、小木曾富生、森脇久隆
11. 第16回肝細胞研究会
2009年6月26日 山形
シンポジウム「臨床応用をめざした肝細胞研究の展開」
細胞外マトリックスによる肝細胞分化機構の解明と肝再生療法への応用
永木正仁、木全崇之、塚田良彦、森脇久隆
12. 第44回日本肝臓学会総会
2008年6月6日 松山
ワークショップ「肝炎ウイルス感染・複製・排除のメカニズム」
B型肝炎トランスジェニックマウスを用いた急性肝炎モデルにおける CTL と CD44 の相互作用
木村公則、永木正仁、森脇久隆、垣見和宏
13. 第44回日本肝臓学会総会
2008年6月6日 松山
ワークショップ「肝障害と修復に関する研究の展開」
HNF-4 遺伝子導入による肝前駆細胞の分化誘導と細胞療法への応用
末次 淳、永木正仁、森脇久隆
14. 第45回日本肝臓学会総会
2009年6月4日 神戸
胆管結紮誘導性慢性肝障害モデルにおける肝細胞抗アポトーシス獲得機序の検討
大澤陽介、永木正仁、伊藤弘康、清島 満、森脇久隆
15. 第35回日本急性肝不全研究会
2009年6月3日 神戸
シンポジウム「肝炎劇症化と肝再生不全：阻止は可能か？」
G-CSF と肝再生不全：劇症肝炎亜急性モデルの確立
小木曾富生、永木正仁、高井信治、木村公則、森脇久隆
16. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases.
2008年11月3日 サンフランシスコ
Interacion of CTLs and CD44 in acute

hepatitis model using hepatitis B virus transgenic mice.
Kimura K, Nagaki M Moriwaki H, Kakimi K.

17. The 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases.
2008年11月2日 サンフランシスコ
In Parallel Session 「Animal Models of Cell Transplantation and Acute Liver Failure」
Granulocyte colony-stimulating factor induces subacute liver failure that shows impaired liver regeneration and high mortality in mice through the up-regulation of interleukin-1 β .
Nagaki M, Ogiso T, Takai S, Kimura K, Moriwaki H.
18. 第12回日本肝臓学会大会
2008年10月2日 東京
シンポジウム「B型肝炎の今日的標準治療と理想的近未来治療への挑戦」
B型肝炎治療における自然免疫制御の有用性
木村公則、永木正仁、垣見和宏
19. 第12回日本肝臓学会大会
2008年10月2日 東京
ラット2-AAF投与後部分肝切除モデル(modified Solt-Farber model)におけるHNF-4遺伝子導入における肝細胞分化誘導の検討
小木曾富生、永木正仁、塚田良彦、末次淳、大澤陽介、森脇久隆
20. 第12回日本肝臓学会大会
2008年10月1日 東京
シンポジウム「Hepatic stem cellとcancer stem cell」
肝幹細胞におけるHNF-4の役割と癌幹細胞におけるCD133陽性細胞の特徴
末次 淳、永木正仁、森脇久隆

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0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0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永木 正仁 (NAGAKI MASAHITO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30293559

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号: