

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591150

研究課題名（和文） 造血幹細胞由来細胞から肝星細胞への分化機序の解明：新規肝線維症治療法を目指して

研究課題名（英文） Clarification of the mechanism of differentiation from hematopoietic stem cell-derived cells to hepatic stellate cells

研究代表者

梶屋 正浩 (MASUYA MASAHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30281083

研究成果の概要（和文）：

我々は四塩化炭素による肝傷害時に造血幹細胞由来の細胞が肝星細胞に分化しうることを明らかにしたが、どの細胞系列のどの分化段階の細胞が真の肝星細胞の前駆細胞であるかは不明であった。四塩化炭素により肝傷害を与えたマウスに、EGFP マウスの骨髄や脾臓から分離した好中球、単球、好酸球、B 細胞、T 細胞を輸注するモデルを用いて EGFP 陽性肝星細胞の出現を検討したところ、単球を輸注したマウスの肝臓でのみ EGFP 陽性肝星細胞を検出した。このことから単球が肝星細胞の前駆細胞と考えられる。単球の傷害肝への侵入に関連する分子としてケモカインの MCP-1 がある。CCR2 は単球に発現している MCP-1 の受容体であるが、その antagonist が単球からの肝星細胞への分化に与える効果を検討したところ、傷害肝において EGFP 陽性肝星細胞は減少し、線維化も抑制された。

研究成果の概要（英文）：

We previously clarified that hematopoietic stem cell-derived cells were able to differentiate into hepatic stellate cells (HpSCs) during carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury. Which lineage of cells are true precursors of HpSCs remains unknown. We adoptively transferred neutrophils, monocytes, eosinophils, B cells, or T cells, which were isolated from enhanced green fluorescent protein (EGFP)-transgenic mice, into CCl₄-injured non-transgenic mice. In the livers of mice given monocytes, EGFP⁺ HpSCs were detected. This suggests that a proportion of monocytes are precursors of HpSCs. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is thought to be associated with the invasion of monocytes into injured liver. CCR2, a receptor for MCP-1, is expressed on monocytes. We examined the effect of CCR2 antagonist against the differentiation of monocytes into HpSCs and found that the antagonist suppressed the number of EGFP⁺ HpSCs and the area of fibrosis in injured liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：単球、分化、肝星細胞、MCP-1、CCR2

1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は肝線維化の進展において重要な役割を演ずることが知られている。我々はEGFP マウスから分離した単一造血幹細胞を移植して骨髄をEGFP 細胞で再構築したキメラマウスを作成後、四塩化炭素による肝傷害を与えた。このマウスの肝臓の解析から造血幹細胞に由来する細胞が肝星細胞に分化することを確認した。しかし、造血幹細胞自身が骨髄から末梢血に動員後、傷害肝に侵入して肝星細胞に分化するのか、それとも成熟分化したどれかの系列の細胞が肝星細胞に分化するのかは不明であった。

2. 研究の目的

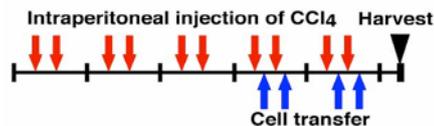
本研究において、(1) その系列のその分化段階の細胞が肝星細胞の真の前駆細胞であるのかを明らかにするとともに、(2) その前駆細胞はどのような機序で傷害肝に侵入し肝星細胞に分化するのかその機序を明らかにすることである。この機序解明により、肝線維症に対する新規治療法の開発が期待される。

3. 研究の方法

(1) 各種分化段階の細胞の分離

まず、造血幹細胞からの分化段階に沿って、common myeloid precursor (CMP), common lymphoid precursor (CLP), granulocyte-macrophage precursor (GMP) をフローサイトメーターを用いて分離を試みたが、十分量の細胞の分離が難しかった。そこで、成熟細胞に着目して、好中球、単球、好酸球、B細胞、T細胞をEGFP マウスの骨髄や脾臓から分離し、それぞれを四塩化炭素(週2回腹腔内投与)により傷害を与えたC57BL/6J-Ly5.1 マウス(Ly5.1 マウス)に計4回輸注する実験系を計画した(図1)。

図1



(2) 肝臓内のEGFP 陽性細胞の同定

Ly5.1 マウスから摘出した肝臓は4% PFAにて固定後、OCT compound に包埋し薄片を作成。蛍光免疫組織染色を行い、confocal microscopeにてEGFP 陽性細胞に着眼して、肝星細胞の各種抗原の発現を観察する。

(3) CCR2 antagonist を混じた餌の投与 MCP1/CCR2 pathway は単球が炎症部位に移動する際に重要であることが知られている。そこで、EGFP マウスからの全骨髄細胞を移植したLy5.1 マウスに、CCR2 antagonist を混じた餌と通常の餌を与え、末梢血中の血液細胞数、肝臓内のEGFP 陽性細胞数・EGFP 陽性肝星細胞数・線維化の面積を検索する。

4. 研究成果

(1) 各系列細胞からの肝星細胞への分化

EGFP マウスから分離した好中球、単球、好酸球、B細胞、T細胞を肝傷害マウスに輸注後、肝臓を摘出してEGFP 陽性細胞の存在を検出したところ、全ての系列の細胞が肝臓内に検出された。しかし、単位投与細胞数当たりの肝臓内のEGFP 陽性細胞数は、好中球を輸注したマウスで少なかった(図2)。肝星細胞は血液細胞の特異的マーカーであるCD45 が陰性であるので、EGFP⁺CD45⁻細胞(☆)の存在を検討したところ(図3)、単球を輸注したマウスでのみ、肝星細胞が検出された(図4)。

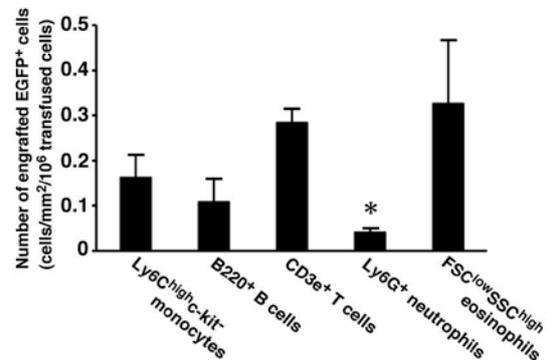


図3

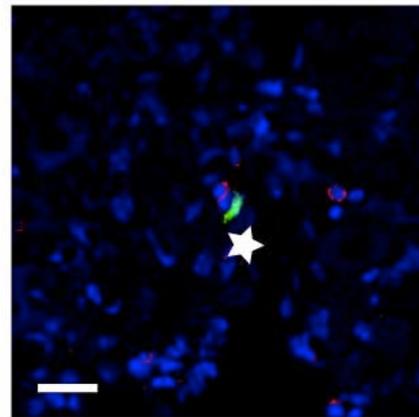
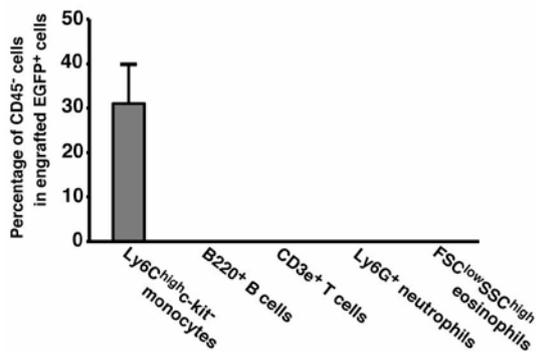


図4



(2) 単球は肝星細胞の前駆細胞か？

肝星細胞は glial fibrillary acidic protein (GFAP), desmin, CD146, vimentin, ADAMTS13, procollagen type I, α -smooth muscle actin (SMA) を発現することが知られているので、単球を輸注したマウスの肝臓内に EGFP 陽性の肝星細胞が存在するかを、上記抗原に対する抗体を用いて検討した。

EGFP 陽性細胞の内、30%の細胞が GFAP, desmin, CD146, vimentin, ADAMTS13, α -SMA 陽性であることが判明した (図5、図6)。

図5

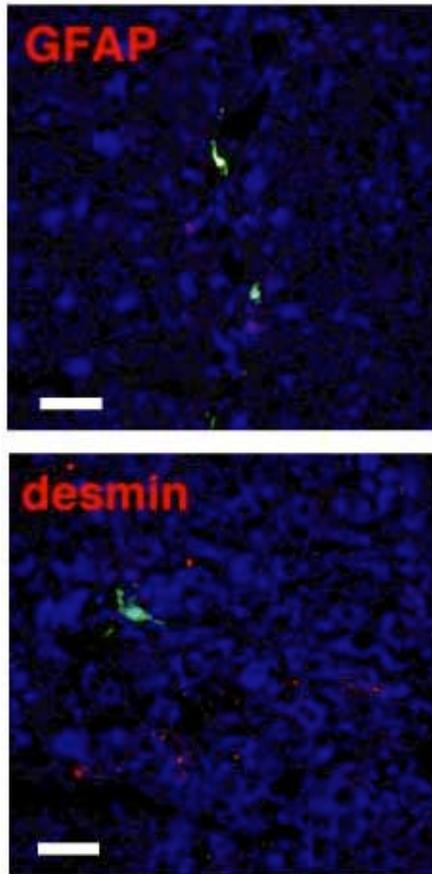
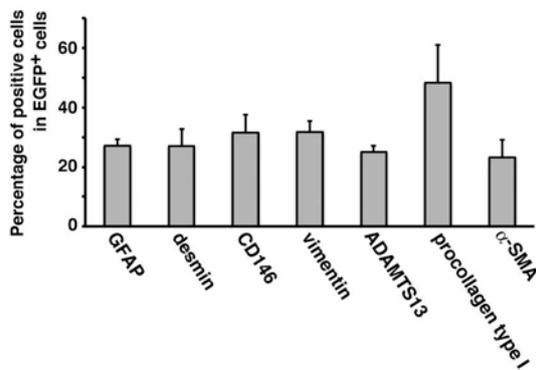
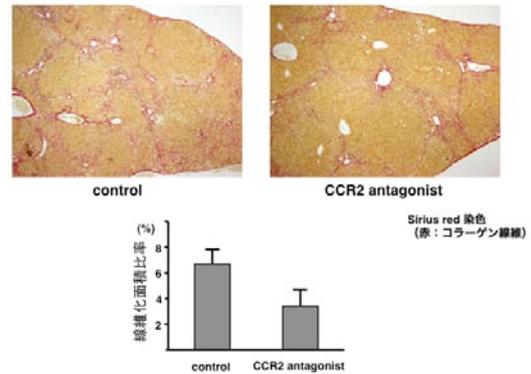


図6



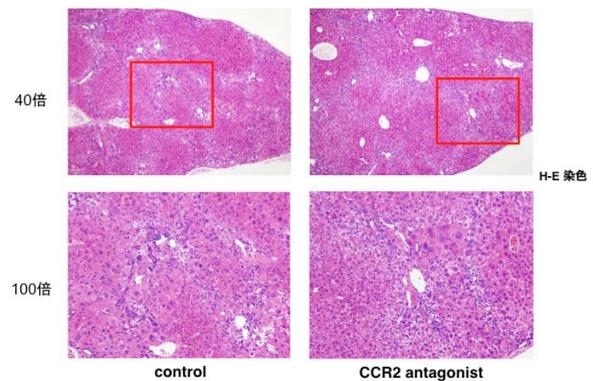
また、これらの抗原と CD45 の同時染色を行ったところ、EGFP 陽性 CD45 陰性がこれらの抗原を発現していることが判明した。

(3) MCP1/CCR2 経路と肝星細胞への分化
CCR2 antagonist を混じた餌を食べさせたマウスではコントロールに比して図7のように、肝臓の線維化が減少することが判明した。
図7



しかし、図8のように肝臓内への細胞浸潤の程度には差はなかった。

図8



蛍光免疫組織染色法を用いて肝臓内に浸潤した細胞の種類を検討したところ、EGFP 陽性 vimentin 陽性の肝星細胞の数は CCR2 antagonist を混じた餌を食べたマウスとコントロール餌を食べたマウスではそれぞれ 2.6 cells/HPF、5.1 cells/HPF 検出された。肝星細胞の総 EGFP 陽性細胞に占める割合もそれぞれ 10%と 23%であり、CCR2 antagonist により肝星細胞が減少することが判明した。このような造血細胞由来の肝星細胞の減少が肝線維化の軽減と関連していることが推測された。

以上のことから、四塩化炭素による肝傷害時には、(1) 単球の一部の細胞が肝星細胞に分化しうることを、(2) 四塩化炭素により傷害された肝臓から産生された MCP-1 に反応し、単球は MCP-1/CCR2 経路を通して骨髄から末梢血に動員され、さらに傷害肝に侵入して肝星細胞に分化すると考えられることが判明した。また、この経路をブロックしうる CCR2 antagonist は肝線維症の軽減に有用であると考えられた。

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 12 件)

- (1) Moussa O, LaRue AC, Abangan RS Jr, Williams CR, Zhang XK, Masuya M, Gong YZ, Spyropoulos DD, Ogawa M, Gilkeson G, Watson DK, Thrombocytopenia in mice lacking the carboxy-terminal regulatory domain of the Ets transcription factor Fli1、Mol Cell Biol、査読有、Vol.30、No.21、2010、5194-5206
- (2) Abe T, Masuya M, Ogawa M, An efficient method for single hematopoietic stem cell engraftment in mice based on cell-cycle dormancy of hematopoietic stem cells、Exp Hematol、査読有、Vol.38、No.7、2010、603-608
- (3) Iwamoto T, Ishibashi M, Fujieda A, Masuya M, Katayama N, Okuda M, Drug interaction between itraconazole and bortezomib: exacerbation of peripheral neuropathy and thrombocytopenia induced by bortezomib、Pharmacotherapy、査読有、Vol.30、No.7、2010、661-665
- (4) Nakamura A, Sugimoto Y, Ohishi K, Sugawara Y, Fujieda A, Monma F, Suzuki K, Masuya M, Nakase K, Matsushima Y, Wada H, Katayama N, Nobori T, Diagnostic value of PCR analysis of bacteria and fungi from blood in empiric-therapy-resistant febrile neutropenia、J Clin Microbiol、査読有、Vol.48、No.6、2010、2030-2036
- (5) Liu B, Ohishi K, Yamamura K, Suzuki K, Monma F, Ino K, Nishii K, Masuya M, Sekine T, Heike Y, Takaue Y, Katayama N, A potential activity of valproic acid in the stimulation of interleukin-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis、Exp Hematol、査読有、Vol.38、No.8、2010、685-695
- (6) Tanaka Y, Ohishi K, Yonekawa T, Yodoya N, Iwamoto S, Nishioka Y, Tatara Y, Matsumoto T, Masuya M, Effect of washing solution on platelet counts following transfusion with twice-washed platelets: a single-patient experience、Transfusion Med、査読有、Vol.20、No.5、2010、358-360
- (7) Suzuki K, Masuya M, Matsumoto T, Ito N, Ohishi K, Maeda M, Katayama N, High-intensity signals in the basal ganglia from gadolinium-enhanced T1-weighted MRI as an early change in toxoplasma encephalitis in an AIDS patient、J Infect Chemother、査読有、Vol.16、No.2、2010、135-138
- (8) 伊野和子、榎屋正浩、中森良樹、鈴木圭、水谷実、関根隆夫、山口素子、中瀬一則、海田勝二、小川啓恭、片山直之、同種末梢血幹細胞移植後長期間無再発生存中のアグレッシブ NK 細胞白血病、臨床血液、査読有、51 巻、4 号、2010、258-263
- (9) Abe Y, Wada H, Yamada E, Noda M, Ikejiri M, Nishioka J, Kobayashi T, Matsumoto T, Masuya M, Isaji S, Usui M, Uemoto S, Katayama N, Nobori T, The effectiveness of measuring for fragmented red cells using an automated hematology analyzer in patients with thrombotic microangiopathy、Clin Appl Thromb Hemost、査読有、Vol.15、No.2、2009、257-262
- (10) Yoneda K, Sugimoto K, Shiraki K, Tanaka J, Beppu T, Fuke H, Yamamoto N, Masuya M, Horie R, Uchida K, Takei Y, Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-kappaB activation and apoptosis、査読有、Vol.33、No.5、2008、929-936
- (11) Fujieda A, Masuya M, Kitano S, Miyazaki K, Yazaki A, Sugimoto Y, Usui E, Miyata E, Shibasaki T, Yamamura K, Ohishi K, Nishii K, Nakase K, Takeuchi T, Katayama N, Deletion of chromosome arm 15q in a case of minimally differentiated hypoplastic AML-M0、Cancer Genet Cytogenet、査読有、Vol.184、No.1、2008、57-61
- (12) Kobayashi T, Wada H, Nishioka J, Yamamoto M, Matsumoto T, Tamaru T, Nomura S, Masuya M, Mori Y, Nakatani K, Nishikawa M, Katayama N, Nobori T, ADAMTS13 related markers and von Willebrand factor in plasma from patients with thrombotic microangiopathy (TMA)、Thromb Res、査読有、Vol.121、No.6、2008、849-854

[学会発表] (計 12 件)

- (1) Liu B, Ohishi K, Masuya M, Hamada H, Katayama N, Important role for flt3 Ligand in the generation of early B and T cell precursors from human primitive hematopoietic progenitors, revealed by telomerized human stromal cells、52nd American Society of Hematology Meeting, December 5, 2010、Orland, FL, USA (Poster)
- (2) 伊野和子、榎屋正浩、宮田恵里、大石晃嗣、片山直之、Hematopoietic origin of pancreatic stellate cells、第 72 回日

本血液学会学術集会、平成 22 年 9 月 24 日、横浜、口演

- (3) Masuya M, Araki H, Ohishi K, Katayama N, Ly6C⁺ inflammatory monocytes are extrahepatic precursors of hepatic stellate cells in liver injury, 51th Annual Meeting of American Society of Hematology, December 4-8, 2009, New Orleans, USA (Poster)
- (4) Ohishi K, Liu B, Masuya M, Heike Y, Takaue Y, Katayama N, Evaluation of potential role for valproic acid in IL-3-mediated megakaryopoiesis and erythropoiesis in serum-free and serum-containing cultures, 51th Annual Meeting of American Society of Hematology, December 4-8, 2009, New Orleans, LA, USA (Poster)
- (5) Tanaka Y, Kassai C, Abe K, Nishio M, Maruyama M, Kamada N, Matsumoto T, Masuya M, Nishioka Y, Tatara Y, Ohishi K, Transfusion of platelet concentrates washed twice with M-sol provided adequate post-transfusion platelet count increments in an anhapto-globinemic patient with anti-haptoglobin antibody, The XXth Regional Congress of the International Society Blood Transfusion (ISBT) Asia, November 14-18, 2009, Nagoya, Japan (Poster)
- (6) Ryuu H, Ohishi K, Masuya M, Heike Y, Takaue Y, Katayama N, Valproic acid, in combination with IL-3, stimulates human megakaryopoiesis as well as erythropoiesis, 第 71 回日本血液学会、2009 年 10 月 21-23 日、京都、口演
- (7) 榎屋正造、大石晃嗣、片山直之、Ly6C⁺ 単球は肝傷害時の肝星細胞の前駆細胞である、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 1-3 日、横浜、ポスター
- (8) 小笠良一、榎屋正造、宮田恵里、中島秀明、上迫 努、伊藤 守、鈴木 圭、片山直之、北村俊雄、野坂哲哉、MLL-ENL 融合遺伝子による形質転換は造血幹細胞のみを標的として生じる、第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 1-3 日、横浜、口演
- (9) 榎屋正造、大石晃嗣、中村志帆、宮田恵里、杉本由香、藤枝敦史、片山直之、IFN- α は PI3K を介して造血前駆細胞の $\beta 1$ インテグリンによる細胞接着を増強する、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都、ポスター
- (10) 杉本由香、中村明子、大石晃嗣、宮田恵里、門間文彦、田丸智巳、藤枝敦史、山口素子、西井一浩、榎屋正造、中瀬一則、松島佳子、和田英夫、登 勉、

片山直之、血液疾患患者における末梢血細菌・真菌 PCR 検査の有用性の検討、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都、口演

- (11) 大石晃嗣、山村賢太郎、榎屋正造、平家勇司、高上洋一、片山直之、ヒト巨核球系前駆細胞の分化・増殖におけるヒストン脱アセチル化酵素の役割、第 70 回日本血液学会総会、2008 年 10 月 10-12 日、京都、口演
- (12) 阿部久美子、田中由美、今井重美、丸山美津子、葛西千枝子、西尾 緑、信田憲行、森口洋子、和田英夫、大石晃嗣、小島 精、登 勉、榎屋正造、輸血細菌感染症対策 細菌迅速遺伝子診断システムを用いた初流血除去の細菌除去効果の判定、第 56 回輸血・細胞治療学会総会、2008 年 4 月 25-27 日、福岡、口演

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎屋 正造 (MASUYA MASAHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30281083