

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16971

研究課題名（和文）新規エクソソーム内包タンパク質が司る肝発生と線維肝再生の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of liver development and fibrogenic liver regeneration regulated by a novel exosomal protein

研究代表者

柳川 享世（Yanagawa, Takayo）

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10760291

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）：本研究では、所属研究室において同時に見出した新規の線維肝再生促進因子である Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1) について解析を実施した。肝再生時のシグナル伝達および作用機序として、肝前駆細胞の動員や細胞増殖の亢進であることが示唆された。研究期間全体を通じて、OGFRL1 ノックアウトマウスの表現型、OGFRL1 のシグナル伝達経路、これらを踏まえた OGFRL1 の作用機序という 3 つの主要項目を解析したことで、線維肝の再生と胎仔肝の発生に共通する OGFRL1 の分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、日本国民の約 3 人に 1 人が主に生活習慣に由来する非アルコール性脂肪肝であると推定されており、その 10～20% が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）に進行すると言われている。炎症状態が持続すると、細胞外基質が組織に蓄積する線維化が進行する。肝臓の線維化の最終形態は肝硬変であり、肝細胞癌も好発する。

本研究により、OGFRL1 による線維肝の再生と胎仔肝の発生に共通する分子機構の一端を明らかにした。線維肝の再生機構を解明することは、学術的意義のみならず、100～200 万人にも上ると推定される NASH 患者、その他の原因による肝線維症患者に対する治療薬や治療法の開発につながり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed a novel regeneration factor, Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1). We demonstrated overexpression of OGFRL1 in mice followed by partial hepatectomy and comparison of mRNA expression in liver tissue after resection and regeneration. We found that the expression of hepatic progenitor cells and cell cycle-related genes was increased. These results suggest that OGFRL1 mobilizes hepatic progenitor cells and cell proliferation as a signal transduction and action mechanism during liver regeneration. Throughout the study period, we analyzed three main items: the phenotype of OGFRL1 knockout mice, the signaling pathway of OGFRL1, and the mechanism of action of OGFRL1 based on these. We have elucidated a part of the molecular mechanism of OGFRL1.

研究分野：再生医療

キーワード：肝再生 線維肝 肝発生 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

肝硬変症は、種々の原因によって惹起された慢性炎症によって進展する肝線維化の終末像である。肝臓は、元来は再生能力に長けた臓器であるが、肝硬変に至ると生理的再生が損なわれるとともに肝細胞癌が好発する。近年のウイルス性肝炎治療の進歩により、肝線維症は可逆的すなわち治療可能な疾患として認識されるようになった。しかしながら、高度な線維化病変が存在する場合には必ずしも組織学的改善が得られず、また近年増加が著しい非アルコール性脂肪肝炎に対しては未だ効果的な抗線維化薬が見出されてないなど、これまでとは全く異なる視点に立脚した線維化改善と再生促進を目指す新たな治療法の開発が求められている。そのような医学的また社会的背景のもとで、本研究代表者は線維肝の再生と胎仔肝の発生における共通の分子機構の解明とその応用に着目した。

本研究代表者の所属研究室では、新規肝硬変治療法の開発を目指した研究を進める中で、マウスに四塩化炭素を反復投与して作製した実験的肝線維症からの回復過程において、肝組織中の発現が上昇する遺伝子を網羅的に探索した結果、新たな線維肝再生促進因子として Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1) を同定した (特願 2010-122501、PCT/JP2011/062556)。本研究代表者はこれまでに、OGFRL1 発現細胞を肝硬変マウスへ投与すると肝前駆細胞の動員と増殖を介して部分切除後の再生を促進することを見出した (Yanagawa T, et al. *Stem Cells* 37: 89-101, 2019)。また、四塩化炭素投与による肝傷害に際して、OGFRL1 はエクソソーム内包タンパク質として一過性に末梢血中に分泌されること、発生期の造血臓器である胎仔肝において血球細胞に高発現して肝前駆細胞の成熟・分化を促進することを明らかにした。これらの結果は、肝前駆細胞の動員に關与する OGFRL1 を介した肝再生と肝発生に共通した分子機構の存在を示している。エクソソームは、核酸やタンパク質などを内包した脂質二重膜を有する構造体で、細胞外分泌小胞として体液中を循環し、生体内の細胞間情報伝達手段の一つであるとされている。特に、癌の領域でバイオマーカーや転移阻害の標的として世界的な関心が高まっているが、現在のエクソソーム研究の対象は miRNA の解析が主流である。本研究では、エクソソーム内包タンパク質に着目し、新たな肝硬変治療 (再生促進) に応用するための分子機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、エクソソーム内包タンパク質としての OGFRL1 が線維肝の再生と胎仔期の肝発生においてどのように共通の役割を果たすか、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

具体的には、線維肝の再生と胎仔肝の発生に共通する OGFRL1 の分子機構を明らかにするため、3年間の研究期間内に次の項目を実施した。

- (1) OGFRL1 ノックアウトマウスの作製と表現型解析
- (2) OGFRL1 のシグナル伝達経路の解析
- (3) OGFRL1 の作用経路の解析

3. 研究の方法

- (1) OGFRL1 ノックアウトマウスの作製と表現型解析

2種類の OGFRL1 ノックアウトマウスを作製した。一方は、Ogfrl1 の中央部に位置する保存領域の直後に終止コドンが出現するようゲノム編集を行って作製した。他方は、Ogfrl1 遺伝子内を大規に欠損させたノックアウトマウスを作製した。

繁殖および胎仔の発生における OGFRL1 欠損の影響について、胎生致死や生後の発育異常の有無を注意深く観察した。

肝傷害時における OGFRL1 欠損の影響として、ノックアウトマウスおよび野生型マウスの成獣を用いて、四塩化炭素投与時の肝傷害の程度やその後の修復に及ぼす影響を、組織学的変化から検討した。

(2) OGFRL1 のシグナル伝達経路の解析

予めアデノ随伴ウイルス・セロタイプ 8 (AAV8) を用いて肝実質細胞に OGFRL1 を過剰発現させた野生型マウスに対し、部分肝切除術を実施した。切除時と再生後の肝組織中 mRNA の発現変動をマイクロアレイ解析により比較し、肝再生に中心的役割を果たす候補遺伝子を抽出した。

Ogfrl1 遺伝子は、データベース上では全長型と短縮型の 2 種類が登録されている。生理的条件下ならびに肝傷害時において、これら 2 種類の Ogfrl1 遺伝子発現がどのように変化するかをデジタル PCR により検討した。プライマーセットは、全長型のみを検出するよう部位と、全長型ならびに短縮型の両方を検出する部位の 2 か所に設定し、その比率から発現パターンを推察した。

(3) OGFRL1 の作用機序の解明

OGFRL1 タンパク質の細胞内局在を確認するため、OGFRL1 の N 末端および C 末端それぞれに異なるタグタンパク質を融合させたコンストラクトを作製した。培養細胞に発現させた後にタグタンパク質に対する抗体を用いて免疫蛍光染色を実施し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

エクソソーム内包性 OGFRL1 タンパク質のプロセッシングの有無を確認するため、自ら作製した抗原部位の異なる複数の抗 OGFRL1 抗体を用いてウェスタンブロットにより検証した。

OGFRL1 自体の調節機構について、翻訳後修飾として糖鎖付加に着目し、エクソソーム内包性 OGFRL1 に対して糖鎖切断処理を実施した。切断後の分子量の変化はウェスタンブロットにより確認した。

4 . 研究成果

(1) OGFRL1 ノックアウトマウスの作製と表現型解析

Ogfrl1 の中央部に位置する保存領域の直後に終止コドンが出現するようゲノム編集を行った系統と、Ogfrl1 遺伝子内を大規に欠損させたノックアウトマウスを樹立した。

繁殖および胎子の発生における OGFRL1 欠損の影響について、胎生致死や生後の発育異常の有無を注意深く観察したところ、2 年度目までは OGFRL1 ノックアウトマウスの繁殖において異常を認めなかったが、最終年度になって繁殖率が低下してきた。生後数日で死亡する事例が頻発したことから、今後は出生前の胎仔肝および全身組織を採材して、OGFRL1 欠損による影響を検証する。

OGFRL1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスの成獣を用いて、四塩化炭素投与時の肝傷害の程度を組織学的に比較したところ、両者に差は認められなかった。続いて、四塩化炭素による傷害からの組織修復に及ぼす影響を組織学的に検討したが、OGFRL1 ノックアウトマウスおよび野生型マウスの間に差は認められず、急性肝傷害からの回復時には OGFRL1 の影響は限定的であることが推察された。

(2) OGFRL1 のシグナル伝達経路の解析

肝実質細胞に OGFRL1 を過剰発現させた野生型マウスに対し、70%部分肝切除術を実施した。切除時と再生後の肝組織中 mRNA の発現変動をマイクロアレイ解析により比較した結果、肝前駆細胞のマーカー遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現が上昇する一方で、アポトーシス関連遺伝子の発現が低下していることが示された。したがって、70%部分肝切除術からの OGFRL1 による肝再生時のシグナル伝達および作用機序としては、肝前駆細胞の動員と肝細胞の保護であることが示唆された。

Ogfrl1 遺伝子は、データベース上では全長型と短縮型の 2 種類が登録されている。生理的条件下では、肝臓、末梢血球それぞれにおいて全長型の Ogfrl1 が発現していた。一方で、脳内

の海馬や脈絡叢膜では、生理的条件下においても全長型のみを検出するプライマーセットよりも全長型および短縮型の Ogfrl1 をともに検出するプライマーセットのシグナルが増加しており、短縮型の Ogfrl1 が発現していることが示唆された。さらに、四塩化炭素単回投与の急性肝傷害時には、肝臓、末梢白血球それぞれにおいて短縮型の Ogfrl1 が発現することが示された。

(3) OGFRL1 の作用機序の解明

免疫蛍光染色後の細胞を観察したところ、OGFRL1 タンパク質に付加した N 末端および C 末端それぞれのタグタンパク質は細胞質に共局在していた。したがって、培養細胞に全長 OGFRL1 を発現させた場合には切断を受けないことが示唆された。

エクソソーム内包性 OGFRL1 タンパク質は、N 末端側に抗原部位を持つ抗体では肝傷害の有無に関わらず一定の分子量のバンドが検出された。一方、C 末端側に抗原部位を持つ抗体では、急性肝傷害後に一過性に検出され、N 末端側の抗体で検出された分子量とことなることが明らかとなった。したがって、肝傷害時に分泌されるエクソソーム内包性 OGFRL1 タンパク質は、何らかの翻訳後修飾を受ける可能性が示唆された。

エクソソーム内包性 OGFRL1 タンパク質に対して糖鎖切断処理を実施したところ、切断後には未処理よりも小さな分子量の位置にバンドが検出された。今後は切断酵素の種類を変えることと、レクチンアレイなどにより糖鎖の解析を実施することにより、OGFRL1 自体の調節機構を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsuki Yuki, Yanagawa Takayo, Sumiyoshi Hideaki, Yasuda Junpei, Nakao Sachie, Goto Mitsuki, Shibata-Seki Teiko, Akaike Toshihiro, Inagaki Yutaka	4. 巻 583
2. 論文標題 Modification of exosomes with carbonate apatite and a glycan polymer improves transduction efficiency and target cell selectivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.10.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sumiyoshi Hideaki, Okamura Yosuke, Kawaguchi Akira T., Kubota Tomoko, Endo Hitoshi, Yanagawa Takayo, Yasuda Junpei, Matsuki Yuki, Nakao Sachie, Inagaki Yutaka	4. 巻 18
2. 論文標題 External administration of moon jellyfish collagen solution accelerates physiological wound healing and improves delayed wound closure in diabetic model mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 223 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 柳川享世、稲垣豊	4. 巻 82
2. 論文標題 エクソソームからみた肝類洞壁細胞間のクロストーク	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 511 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 稲垣 豊、中野泰博、柳川享世	4. 巻 279
2. 論文標題 線維化改善機序からみた肝線維症の治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 782 ~ 785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳川享世、稲垣豊	4. 巻 36
2. 論文標題 線維肝再生の細胞分子基盤	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨牀 消化器内科	6. 最初と最後の頁 1607 ~ 1615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasahara Daigo, Sumiyoshi Hideaki, Endo Hitoshi, Yanagawa Takayo, Nakano Yasuhiro, Matsuki Yuki, Nakao Sachie, Kamiya Akihide, Kimura Hiroshi, Inagaki Yutaka	4. 巻 528
2. 論文標題 Visualization and isolation of zone-specific murine hepatocytes that maintain distinct cytochrome P450 oxidase expression in primary culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 420 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okazaki Isao, Shibata Shinsuke, Ando Wataru, Yanagawa Takayo, Yokomori Hiroaki, Sonoda Akira, Suzuki Norihiko, Yamanouchi Eigo, Okada Shinya, Kamikura Shinichi, Hachimura Kazuaki, Takaki Takashi, Otori Katsuya, Suzuki Yutaka, Okano Hideyuki, Inagaki Yutaka	4. 巻 Volume 7
2. 論文標題 <p>Sequential Matrix Metalloproteinase-1 Expression Triggered by Infiltrating Monocytic Lineage Cells Modulates Pathophysiological Aspects of Human Nonalcoholic Steatohepatitis</p>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metalloproteinases In Medicine	6. 最初と最後の頁 1 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/MNM.S252991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 柳川享世	4. 巻 275
2. 論文標題 エクソソーム 生体内第3の情報伝達手段が開く未来	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1099-1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳川享世、加川建弘、稲垣 豊
2. 発表標題 エクソソーム内包因子Opioid growth factor receptor-like 1を用いた新規肝硬変治療の創出と課題
3. 学会等名 第57回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川享世、稲垣 豊
2. 発表標題 造血細胞と肝実質細胞のクロストークからみた傷害・線維肝修復と肝発生の制御機構
3. 学会等名 第53回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住吉秀明、岡村 陽介、遠藤 整、中尾祥絵、安田純平、松木勇樹、柳川享世、稲垣 豊
2. 発表標題 宿主細胞の生着により理想的な自己組織化を果たす新型人工真皮の開発
3. 学会等名 第53回 日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松木勇樹、柳川享世、住吉秀明、安田純平、中尾祥絵、後藤光昭、関 禎子、赤池敏宏、稲垣 豊
2. 発表標題 新規修飾型エクソソームの開発に基づく取り込み効率と肝細胞選択性の向上
3. 学会等名 第28回 肝細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松木勇樹、柳川享世、住吉秀明、安田純平、稲垣 豊
2. 発表標題 標的細胞内のサイトゾル移行性と肝細胞指向性の向上を目的とした新規修飾型エクソソームの開発
3. 学会等名 第35回 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川享世、中野 泰博、住吉秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 肝星細胞の脱活性化を介した新たな肝線維症治療薬の開発
3. 学会等名 第35回 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣 豊、松木勇樹、柳川享世
2. 発表標題 エクソソーム工学に基づく線維肝に対する再生治療戦略
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 住吉秀明、岡村陽介、喜多理王、中尾祥絵、松木勇樹、柳川享世、花井 潮、今川 孝太郎、赤松 正、稲垣 豊
2. 発表標題 健常および糖尿病モデルマウスにおける新規開発人工真皮の実証実験
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川享世、平山令明、中野泰博、稲垣 豊
2. 発表標題 肝星細胞の脱活性化機構に基づく肝線維症の新規治療戦略
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川享世、中尾祥絵、住吉秀明、松木勇樹、紙谷聡英、加川健弘、鶴谷康太、岡崎 勲、横森昭弘、稲垣 豊
2. 発表標題 急性ならびに慢性肝傷害におけるエクソソーム内包因子Opioid growth factor receptor-like 1の発現意義
3. 学会等名 第27回 肝細胞研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳川享世、岡崎 勲、松木勇樹、住吉秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 エクソソーム内包肝再生促進因子OGFRL1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第34回 肝類洞壁細胞研究会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳川享世、中尾祥絵、岡崎 勲、小川はる美、住吉秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 新規肝再生促進因子OGFRL1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第1回 劇症肝炎研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川享世、中尾祥絵、鶴谷康太、加川建弘、松木勇樹、住吉秀明、稲垣 豊
2. 発表標題 新規肝再生促進因子OGFRL1発現の臨床的意義
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東海大学大学院医学研究科 マトリックス医学生物学センター http://matrix.med.u-tokai.ac.jp/ 東海大学大学院医学研究科 マトリックス医学生物学センター http://matrix.med.u-tokai.ac.jp/index.html
--

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