

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580364

研究課題名（和文） 肝臓におけるコラーゲン線維網構築機構の解明と肝星細胞の機能評価

研究課題名（英文） The relationship of collagen fiber content and hepatic stellate cell function in the liver.

研究代表者

西村 正太郎（NISHIMURA SHOTARO）

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：70237725

研究成果の概要（和文）：

本研究課題はニワトリの肝臓においてコラーゲン線維量と肝星細胞の特徴を雌雄間で比較し、また胚発生ならびに初期成長過程におけるコラーゲン線維の蓄積と肝星細胞の分布特性の変化について検討を行ったものである。その結果、成熟したニワトリの肝臓では雄において雌よりもコラーゲン線維の蓄積が多く、これは肝星細胞の密度と細胞活性が関与していることが示唆された。この雌雄間における違いは胚発生過程においては認められず、孵化後8週齢に至るまでに発現することが明らかとなり、その要因として雄性ホルモンによるコラーゲン合成の促進ではなく雌性ホルモンであるエストラジオールの合成抑制作用が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study was performed to clarify the relationship of the collagen fiber content and the characteristics of hepatic stellate cells (HSCs) in the chicken liver. The collagen fiber content, distribution and activity of HSCs in the liver were larger in cocks than in hens. These differences between the sexes were not observed during the embryonic stage and confirmed at 8 weeks of age of post-hatching stage. It is suggested that estradiol may be affected to inhibit the collagen fiber synthesis in the HSCs in the female chicken liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011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：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：肝臓、肝星細胞、コラーゲン線維、ニワトリ、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者はこれまでに家畜・家禽の骨格筋や内分泌器官におけるコラーゲン

線維網の三次元構築について走査型電子顕微鏡を用いた研究に従事し、同一組織においてもコラーゲン線維網の三次元構築像は品

種間や動物種間で大きく異なることや、成長とともに構造がより複雑になり、支持組織としての機能性を高めていくことを明らかにしてきた。これは動物種ごとに独自のフレーム構築を行うことで組織の強度を確保していることを示唆するものであった。

肝臓は動物の消化器官における最大の付属腺であり、畜産分野においてはビタミンやタンパク質など様々な栄養素に富む有用な畜産副生物として利用される。食品としての主な供給源はウシ、ブタおよびニワトリであるが、これらの動物種間においてその食感に違いがあることは経験的に広く知られており、その要因として肝臓内に分布する結合組織の量およびその発達の程度における違いが考えられる。しかし、生体の肝臓においてどのような仕組みによりそれぞれの動物に特徴的な結合組織の構築がなされるのか、その構築機構についてはほとんど明らかにされていなかった。

肝臓は非常に多くの機能を有する臓器であり、再生医療の分野においても現在のところ完全な人工肝臓を作り出すまでには至っていないことから分かるように、全ての機能が解明されているとは言い難い。本研究により肝臓におけるコラーゲン線維網の構築機構の一端が明らかとなり、また *in vitro* においてそれぞれの動物に特徴的なネットワークの再形成が可能となれば、動物種ごとに望ましい機能的な肝臓細胞の培養系の確立に道を開くことができると考えられ、肝臓の様々な機能を *in vitro* において評価できる有効なツールを開発するための基礎的知見を得られることが期待された。

2. 研究の目的

肝臓における主要なコラーゲン産生細胞は肝星細胞である。本研究では、ニワトリの肝臓においてコラーゲン線維量と肝星細胞の特徴を雌雄間で比較し、肝星細胞の組織内における分布特性、細胞活性ならびにコラーゲン合成能力を明らかにすることでコラーゲン線維網形成のメカニズムの一端を解明することを目的とした。

そのために、以下の項目についての検討を行った。

- (1) ニワトリ肝臓におけるコラーゲン線維量と肝星細胞の雌雄間比較
- (2) 胚発生過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維網の発達と肝星細胞の分布
- (3) 初期成長過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維量の変化と肝星細胞の分布

また、当初の研究計画には含まれていな

かったが、研究の過程でクローン牛の肝臓を入手する機会が得られたため、肝星細胞の機能評価の一環として

(4) 栄養条件の違いがウシの肝臓におけるコラーゲン線維合成に及ぼす影響についての検討も行った。

3. 研究の方法

- (1) ニワトリ肝臓におけるコラーゲン線維量と肝星細胞の雌雄間比較

材料として成熟したロードアイランドレッド種の雌雄各3羽を供試した。摘出した肝臓の重量を測定し、組織ブロックを切り出した。標本の一部にはNaOH溶液を用いたアルカリ浸軟処理を施し、コラーゲン線維標本を得た。また、組織片より凍結切片を作製し、抗デスミン血清を用いた免疫組織化学染色により肝星細胞を検出した。

- (2) 胚発生過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維網の発達と肝星細胞の分布

材料としてロードアイランドレッド種の孵卵12~20日目の受精卵を用いた。肝臓を摘出し重量を測定した後に、肝臓にアルカリ浸軟処理を施してコラーゲン線維標本を作製した。また、厚さ20 μ mの肝臓の凍結切片を作製し、抗I型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡によりコラーゲン線維網を観察した。さらに8 μ mの凍結切片を作製し、抗デスミン血清を用いた免疫組織化学染色を施して光学顕微鏡で観察した。

- (3) 初期成長過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維量の変化と肝星細胞の分布

材料として1、4および8週齢のロードアイランドレッド種ならびにブロイラーの雌雄各5羽を用いた。屠殺後速やかに肝臓を摘出して重量を測定した。右葉および左葉より組織片を切り出し、アルカリ浸軟処理によりコラーゲン線維標本を作製して凍結乾燥の後に重量を測定した。また、組織片より凍結切片を作製し、抗デスミン血清を用いた免疫組織化学染色により肝星細胞を検出した。

ブロイラーに関しては、4週齢と8週齢時において血中のエストラジオール濃度をELISA法により測定した。

- (4) 栄養条件の違いがウシの肝臓におけるコラーゲン線維合成に及ぼす影響について

大分県畜産試験場にて作出された黒毛和種の体細胞クローン雄子牛2頭を九州大学農学部附属農場高原農業実験実習場に導入し、4ヶ月齢にて去勢処理を行った。4ヶ月齢時より、それぞれ濃厚飼料多給餌(体重比2.5%、粗飼料は自由採食)と粗飼料(一番乾草)のみ飽食給餌にて6ヶ月間飼育した。10ヶ月齢

時に屠殺解体して肝臓を摘出し、組織片を採取した。組織片にアルカリ浸軟処理を行い、得られたコラーゲン線維の重量を測定した。また、組織片より凍結切片を作製し、HE染色とI型コラーゲン、デスミンならびに α 平滑筋アクチン(α SMA)に対する抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

(1) ニワトリ肝臓におけるコラーゲン線維量と肝星細胞の雌雄間比較

肝臓の体重比重量は雌で有意に大きい値を示した。肝湿重量に対するコラーゲン線維重量比、肝星細胞の密度ならびにデスミン免疫陽性領域の割合において、雌雄ともに右葉と左葉で差は認められなかった。しかし、これらのいずれについても雄で雌よりも有意に大きい値を示した。光学顕微鏡観察の結果、雄の肝星細胞の大部分において細胞質突起が良く発達していたのに対し、雌では細胞質突起の発達に乏しい肝星細胞がしばしば観察された。

これらのことより、成熟したニワトリの肝臓は雄の方が雌よりも構造的に強く、コラーゲン線維含量に見られた雌雄差は肝星細胞の密度と細胞活性に関係があることが示唆された。

(2) 胚発生過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維網の発達と肝星細胞の分布

単位湿重量あたりの肝臓コラーゲン線維重量は胚の発達とともに増加した。また、抗I型コラーゲン抗体を用いた免疫組織化学染色により、胚の発達とともにI型コラーゲンが蓄積されていく様子が観察され、コラーゲン線維重量比の増加を裏付けた。一方、観察したすべての発生段階において肝星細胞には良く発達した細胞質突起が認められたものの、胚の発達とともにデスミン免疫陽性部位が占める面積比は減少していった。この結果は、胚発生過程において肝星細胞が常に活発な状態にあることを示しており、このことからデスミン免疫陽性部位の減少は肝星細胞数の減少によるものではなく、肝星細胞以外の組織構成要素の急速な増加による相対的なものであると考えられた。

(3) 初期成長過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維量の変化と肝星細胞の分布

ヒナの体重および肝重量については4週齢までは雌雄差が認められなかったが、8週齢においていずれも雄が雌よりも有意に大きくなった。しかし、肝臓の体重比重量は8週齢でも雌雄間に有意差は認められなかった。アルカリ処理により作製した

コラーゲン線維標本の乾燥重量は、いずれの週齢においても雌雄ともに肝右葉と左葉の間で差は認められなかった。そこで両葉より得られた値を取りまとめて肝臓の単位湿重量あたりのコラーゲン線維重量を比較したところ、8週齢において雄で雌よりも有意に大きい結果となった。免疫組織化学的染色により検出された肝星細胞の免疫陽性領域を画像解析した結果、コラーゲン線維重量における結果と同様に、8週齢において雄で雌よりも有意に大きい陽性領域を示すことが明らかとなった。

これらの結果は、ロードアイランドレッド種ならびにブロイラーのいずれにおいても同様であったことから、肝臓組織内のコラーゲン線維量における雌雄差の出現はいずれの品種においても同じ傾向を示すものと考えられる。

ブロイラーにおいて血中エストラジオール濃度を測定した結果、4週齢で雌雄間に差が見られなかったものの、8週齢では雌で雄よりも有意に大きい値を示した。ニワトリ雄の血中テストステロン濃度は孵化後11週齢でようやく上昇し始めることから(Driot *et al.*, 1979)、8週齢の段階で雄の肝臓内コラーゲン線維量が雌よりも多くなったことは、性ホルモンの影響を想定した場合、テストステロンが雄においてコラーゲン合成を促進したのではなく、エストラジオールが雌において抑制したのではないかと推察された。エストラジオールはラットの肝臓において抗線維形成効果を示すことが報告されている(Shimizu *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004)。

以上のことより、ニワトリ肝臓において孵化後8週齢までに肝臓コラーゲン線維含有量が雄で雌よりも大きくなることが明らかとなり、その要因として肝星細胞の占有密度の影響やエストラジオールの線維形成に対する抑制効果の可能性が示唆された。

(4) 栄養条件の違いがウシの肝臓におけるコラーゲン線維合成に及ぼす影響について

屠殺時における体重は濃厚飼料多給牛では319kg、粗飼料給与牛では278kgであり、肝重量の体重比はそれぞれ1.3%および1.1%であった。肝臓組織に含まれるコラーゲン線維重量の組織重量比は、2頭ともに左葉が右葉よりも大きく、また両葉ともに濃厚飼料多給牛で有意に大きい値を示した。抗I型コラーゲン抗体を用いた蛍光免疫組織化学染色標本の共焦点レーザー顕微鏡観察により、濃厚飼料多給牛において粗飼料給与牛よりも発達したコラーゲン線維網が確認された。中心静脈間の距離は前者が後者よりも有意に大きかった。しかし、抗デスミン血清により検出された肝星細胞の免疫陽性領域の占め

る割合には2頭間で差が認められなかった。一方、 α SMA に対する免疫陽性部位は肝小葉の辺縁部に多く認められた。

以上の結果より、濃厚飼料多給の牛では肝小葉が肥大することにより肝臓重量が増加し、それに伴いコラーゲン線維の蓄積も増加することが示唆された。

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3件)

- 1) Nishimura, S., A.Teshima, V.S.Chowdhury and S.Tabata. Changes in collagen fiber content and hepatic stellate cell distribution in the liver of chick embryos and growing chickens. *Animal Science Journal*, *in press*.
- 2) Nishimura, S., A.Sagara, A.Teshima and S.Tabata. 2011. The comparison of the collagen fiber contents and hepatic stellate cell distribution in male and female chicken livers. *Animal Science Journal*, 82: 759-763.
- 3) Nishimura, S., A.Sagara, I.Oshima, Y.Ono, H.Iwamoto, K.Okano, H.Miyachi and S.Tabata. 2009. Immunohistochemical and scanning electron microscopic comparison of the collagen network constructions between pig, goat and chicken livers. *Animal Science Journal*, 80: 451-459.

[学会発表] (計8件)

- 1) Nishimura, S., A.Teshima, R.Fujimura, T.Etoh, Y.Shiotsuka, F.Ebara, K.Matsuda, T.Fujita, S.Abiru, S.Tabata, and T.Goto. 2011. The Influence of Different Nutritional Feeding on the Histological Properties of the Liver in the Japanese Black Steers. -An Evaluation Using Cloned Animals-. Abstracts of The 8th International AFAS Joint Symposium between Japan and Korea, November, Yonago, Japan, p98.
- 2) 西村正太郎・手島彰文・藤村亮佑・衛藤哲次・塩塚雄二・江原史雄・松田謙一郎・藤田達男・阿比留真吾・田畑正志・後藤貴文. 2011. 異なる栄養条件が黒毛和種クローン去勢雄牛の肝臓の組織特性に及ぼす影響. 第4回日本暖地畜産学会沖縄大会, G1-15.
- 3) 西村正太郎・船津 哲・手島彰文・宮地秀行・田畑正志. 2011. プロイラー肝臓のコラーゲン線維量と肝星細胞分布における雌雄差の出現とその要因について.

日本畜産学会第114回大会, IV 27-10.

- 4) 西村正太郎・手島彰文・田畑正志. 2010. 初期成長過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維量の変化と肝星細胞の分布について. 第3回日本暖地畜産学会大分大会, p261.
- 5) 手島彰文・西村正太郎・田畑正志. 2010. 胚発生過程におけるニワトリ肝臓のコラーゲン線維網の発達と肝星細胞の分布について. 日本家禽学会 2010 年度秋季大会, I-21.
- 6) 西村正太郎・田畑正志. 2009. 肝臓コラーゲン線維網を用いたニワトリ腺性下垂体単離細胞の三次元培養の試み. 第34回鳥類内分泌研究会, III-2.
- 7) 西村正太郎・相良彩乃・手島彰文・宮地秀行・田畑正志. 2009. プロイラーの脂肪肝におけるコラーゲン線維含量および肝星細胞の分布密度. 第2回日本暖地畜産学会長崎大会, II-36.
- 8) 手島彰文・西村正太郎・宮地秀行・田畑正志. 2009. 胚発生期におけるニワトリ肝臓内コラーゲン線維の発達についての検討. 日本畜産学会第111回大会, VI 29-02.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 正太郎 (NISHIMURA SHOTARO)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 70237725

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: