

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 5 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591744

研究課題名（和文） 類洞再生を制御するシグナル分子の解明及び血管内皮前駆細胞を用いた肝再生促進の試み

研究課題名（英文） Evaluation of the signal transduction that controls hepatic sinusoidal regeneration and attempt to promote liver regeneration using endothelial progenitor cells.

研究代表者

清水 宏明（SHIMIZU HIROAKI）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80272318

研究成果の概要（和文）：再生肝では主に増殖した肝細胞から VEGF の産生がおこり、類洞内皮細胞膜上のレセプター に作用し、類洞内皮細胞の増殖を誘導、それにより増殖肝細胞の群塊のなかに類洞内皮細胞が侵入、正常な肝細胞と類洞の関係が回復する。さらに、肝再生後期に星細胞から Ang-1 の産生が亢進し、類洞の安定化、その後、さらに VEGF 非存在下の Ang-2 の発現により、アポトーシスが誘導され、不要な血管の退縮がおき、再生肝組織での類洞リモデリングが完成すると考えられた。

研究成果の概要（英文）： VEGF secreted by hepatocytes may play a key role in SEC proliferation, followed by increased Ang-1, presumably promoting sinusoidal maturation. Thereafter, Ang-2 mainly released from HSCs in the absence of VEGF may contribute to apoptosis of superfluous SECs for cessation of the regenerative process. In conclusion, Ang-Tie system, together with VEGF plays a critical role in regulating balance between SEC proliferation and apoptosis during sinusoidal regeneration after hepatectomy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝再生、類洞内皮細胞、血管内皮前駆細胞、肝切除

1. 研究開始当初の背景

肝臓という臓器の再生現象を解き明かすうえで、肝実質細胞のみならず肝再生時に起こる類洞壁細胞の増殖・再生機序を解き明かすこと、とくに分裂、増殖した肝実質細胞への血液供給のための類洞の再構築、つまり類洞内皮細胞の増殖過程の究明

は必要不可欠と考える。その一方、新生血管には、造血幹細胞、血液内皮前駆細胞の関与が示されている。1997 年に見いだされた血管内皮前駆細胞（EPC）は骨髄由来で内皮細胞に分化する細胞であるが、この細胞は、骨髄から動員されて末梢血液中存在し、新しく血管が形成されつつある局

所に特異的に取り込まれ、分化・増殖し、新規血管の形成に参与することが証明されている。しかしながら、類洞の再生促進が肝再生の促進につながるかは検討されておらず、また、血管内皮前駆細胞 (EPC) が肝類洞再生に関わっているかも不明である。

2. 研究の目的

類洞再生を制御するシグナル分子の解明するとともに、硬変肝・黄疸肝などの障害肝において、肝切除後の類洞の再生状態を評価する。類洞の再生の遅延が認められたなら、その遅延を促進することにより、残肝の再生の促進、さらには、再生 volume に変化があるのかの評価する。さらに、血管内皮前駆細胞の有するさまざまな増殖因子により、その門脈内投与により、類洞新生のみならず、肝構成細胞にバランスのとれた肝「再生がえられるかどうか検討する。

3. 研究の方法

(1) 黄疸肝、硬変肝の肝切除後の類洞内皮細胞増殖因子の発現・類洞内皮細胞の PCNA labeling index の検討と肝再生促進の試み： Wistar 系ラットを用い、総胆管結紮による黄疸肝モデル、さらに四塩化炭素を投与した肝硬変モデルを作成し、それぞれに 70% 肝切除を行い、再生肝組織より凍結切片を作製し、抗 VEGF 抗体、抗 Ang1 抗体、Ang2 抗体、及び、TIE2 抗体、さらには、抗 HGF 抗体を用い、それぞれの蛋白の発現を経時的に評価、また同時に再生肝組織より mRNA を分離し、RT-PCR 法を用いて、VEGF、Ang1、Ang2、及び TIE2、HGF の mRNA の発現の推移を検討し、正常肝ラットのその発現の推移と比較検討する。この実験結果の data を解析し、これまでの肝切除後の肝細胞、類洞内皮細胞のそれぞれの PCNA labeling index の data を加え、黄疸肝、硬変肝の肝切除後類洞再生状態、さらには遅延の原因となる因子を解明する。

(2) 血管内皮前駆細胞の分離と門脈内投与による効果-肝再生促進の試み：

① 骨髄由来で内皮細胞に分化することができる血管内皮前駆細胞 (EPC) は、骨髄から末梢血中に動員されて、新しく血管が新生されつつある局所に特異的に取り込まれると報告されているが、まず、ラット末梢血中の単核球を比重遠沈法で分離する。この単核球分画に存在する EPC は、

Thy-1 (CD90)、CD31 (PECAM-1)、Flt-1 (VEGF-2) を発現するとされるが、まず、CD34 の発現した細胞を FACSscan により解析し、EPC と推測される細胞集団を分離する。

Wistar 系ラットを用い、総胆管結紮による黄疸肝モデル、さらに四塩化炭素を投与した肝硬変モデルを作成し、それぞれに 70% 肝切除を行い、血管内皮前駆細胞

(EPC) を門脈内に投与してみる。その再生過程を類洞内皮細胞、肝細胞の PCNA labeling index、さらには、残肝重量から評価し、コントロール群の肝再生と比較・検討し、治療効果があるのか評価したい。

② EPC を蛍光標識し、門脈内投与後、その局在を経時的に観察する。門脈内に投与された EPC は本当に肝類洞にとどまり、内皮細胞に分化していくのか、追跡したい。また、その増殖の有無についても検討したい。

最終的に、硬変肝、黄疸肝などの障害肝において、肝切除後の類洞の再生を促進することにより、残肝の再生の促進、さらには、再生 volume に変化があるのかの評価する。さらには、血管内皮前駆細胞の有するさまざまな増殖因子により、類洞新生のみならず、肝構成細胞にバランスのとれた肝再生がえられるかどうか

評価する。

4. 研究成果

(1) 類洞再生を制御するシグナル分子の解明：ラット70%肝切除モデルを用い、類洞内皮細胞の再生に必須で唯一の増殖因子とされる VEGF、及びその受容体の発現を再生肝組織において mRNA、さらに蛋白レベルで経時的に評価した。結果より再生肝では、主に増殖した肝細胞から VEGF の産生がおこり、類洞内皮細胞膜上の発現の亢進した Flt-1, KDR/Flk-1 receptor に paracrine に作用し、肝細胞増殖に遅れて類洞内皮細胞の増殖を誘導し、それにより増殖肝細胞の群塊のなかに類洞内皮細胞が侵入、正常な肝細胞と類洞の関係が回復することが強く示唆され、さらには血管内皮細胞の発芽、成熟、安定を TIE-2 受容体を介して調節する Angiopoietin-Tie system は、肝再生後期に Ito 細胞にて、Ang-1 の産生が亢進し、類洞の安定化を導き、さらには、VEGF 非存在下の ang-2 の発現により、アポトーシスが誘導、血管の退縮、類洞のリモデリングが完成することが結論づけられた。

閉塞性ラット胆管結紮(BDL)モデルを用いた実験の結果より、閉塞性黄疸時には、HSCs の数の増加と活性化に伴い、繊維化/増殖抑制因子としての TGF- β 1 が強発現しており、また肝組織中の HGF もすでに誘導されており、肝切除後には活性化 HSCs からの HGF の産生低下がおこっており、TGF- β 1 の発現の亢進と相まって肝再生は抑制・遅延される状態にあることが考えられた。類洞の再生も肝細胞の増殖同様、遅延していた。

(2) 血管内皮前駆細胞を用いた肝再生促進の試み：ラット末梢血中の単核球を比重遠沈法で分離する。この単核球分画中の CD 34 の発現した細胞を FACSscan により、分離を試

みているが収量と viability などの問題があり、困難を要している。

研究課題は 2 つからなっており、(1)「類洞再生を制御するシグナル分子の解明」に関しては順調に進展し、その実験結果より、ある程度の結論を得ている (2)「血管内皮前駆細胞を用いた肝再生促進の試み」に関しては、その細胞分離に困難を要し、実験自体が遅れていると言わざるを得ない。

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 4 件)

① Miura S, Mitsuhashi N, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Shida T, Okamura D, Miyazaki M. (2012) Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 12, 56-70. (査読あり)

② Kusashio K, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H., Ohtsuka M, Kato, A., Yoshitomi, H., Furukawa, K., Fukada, T, Miyazaki M. (2009) Effect of excessive acute-phase response on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. Hepatogastroenterology. 56, 824-828. (査読あり)

③ Shimizu H, Kataoka M, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. (2009) Role of Kupffer cells in tolerance induction after portal venous administration of alloantigen. Hepatogastroenterology. 56, 783-787. (査読あり)

④ Shimizu H, Nukui Y, Mitsuhashi N, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. (2009) Induction of antitumor response by in vivo allogeneic major

histocompatibility complex gene transfer
using electroporation. J Surg Res. 154,
60-67. (査読あり)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2008.05.035>.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 宏明 (SHIMIZU HIROAKI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80272318

(2) 研究分担者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

木村 文夫 (KIMURA FUMIO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70334208

大塚 將之 (OHTSUKA MASAYUKI)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90334185

(3) 連携研究者

なし