

## 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25年5月31日現在

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590742  
 研究課題名(和文) 遺伝子改変動物を用いた炎症性肝発癌におけるオステオアクチビンの役割の解析  
 研究課題名(英文) Involvement of osteoactivin in inflammatory hepatocarcinogenesis: analysis of mice lacking osteoactivin expression  
 研究代表者  
 井戸 章雄(IDO AKIO)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
 研究者番号：30291545

研究成果の概要：本研究では障害肝に浸潤するマクロファージに発現するオステオアクチビンの障害肝の再生・修復から発癌に及ぼす影響を検討した。四塩化炭素で誘導した急性肝障害モデルにおいて、オステオアクチビンは肝障害の修復期に浸潤したマクロファージに発現し、オステオアクチビン陽性マクロファージは高い貪食能を有していた。一方、マクロファージを欠損させると肝障害が遷延化した。また、オステオアクチビンの欠損は肝障害の程度には影響しなかったが、線維形成とその吸収を抑制した。以上より、オステオアクチビン陽性マクロファージは障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしていることが推測された。さらに、四塩化炭素を腹腔内投与して急性肝障害を誘導した後に syngeneic な肝癌細胞を脾臓に接種すると、肝癌結節の生着が促進され、肝癌結節数も増加した。以上の結果から、障害肝に浸潤したマクロファージに発現するオステオアクチビンは障害肝の再生・修復および肝障害を背景とした肝癌の発育、進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要：In this study, we investigated an involvement of osteoactivin, which is expressed in infiltrating macrophages, in repair of injured livers and hepatocarcinogenesis. In mice with CCl<sub>4</sub>-induced liver injury, osteoactivin was expressed in macrophages infiltrating in injured livers during repair process, and macrophages positive for osteoactivin exhibited enhanced ability of phagocytosis. When macrophages were depleted, repair of injured livers was suppressed. Additionally, mice lacking osteoactivin expression showed inhibition of both fibrosis and its resolution. When hepatoma cells were inoculated, following induction of liver injury, enhanced development of hepatic tumors was observed. These results suggest that osteoactivin play an important role in repair of injured livers and also in development of hepatocellular carcinoma occurring in the context of liver injury.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：オステオアクチビン，肝障害，肝発癌，肝再生，マクロファージ，炎症性発癌

### 1. 研究開始当初の背景

傷害組織の修復過程では，残存した有害物質や壊死組織の除去および欠損した組織の修復といった二つのメカニズムが存在する．マクロファージは傷害部位周囲に集簇し，サイトカインなどの産生や有害物質および壊死組織の貪食などを介して，傷害組織の修復過程において重要な役割を果たしている．

オステオアクチビンは大理石骨症ラットから単離された膜貫通ドメインを持つ糖タンパクである．我々はコリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット肝において肝発癌よりも早期に発現亢進する遺伝子群からオステオアクチビン遺伝子を単離したが，同遺伝子はヒト肝硬変および肝細胞癌組織においても発現している．最近，オステオアクチビンは急性肝障害モデルの肝マクロファージにおいて発現しており，さらにマクロファージなどの抗原提示細胞で発現されるオステオアクチビンは炎症のフィードバック調節因子として作用していることが報告された．以上の知見から，オステオアクチビンは傷害組織に浸潤した抗原提示細胞に発現し，炎症の持続，傷害組織の再生・修復に関与していることが推測される．

一方，肝細胞癌は慢性肝炎あるいは肝硬変を背景に発生する．すなわち，持続する炎症と組織傷害と繰り返される障害肝の再生・修復，さらに肝線維化の進展が，肝発癌および肝細胞癌の発育，進展に有利な微小環境を提供していることが推測される．しかし，これらの肝発癌および肝細胞癌の進展に関わる微小環境の詳細は明らかになっていない．

### 2. 研究の目的

本研究の目的は，障害肝の再生・修復過程の微小環境で作動している炎症性および抗炎症性サイトカイン，増殖因子，線維化関連分子の動態とその役割を，マクロファージ，特にオステオアクチビン陽性マクロファージに着目して明らかとし，障害肝の再生・修復の微小環境における肝癌の発育，進展を促進する分子メカニズムを明らかにすることである．

### 3. 研究の方法

#### 1. 急性肝障害の修復過程における肝マクロファージの解析

8週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し，下記の検討を行った．

- (1) 血清 ALT 値および組織学的所見
- (2) 肝組織におけるサイトカイン，ケモカインの発現：RT-PCR 法
- (3) F4/80 免疫組織化学染色および FACS による浸潤マクロファージの解析

る浸潤マクロファージの解析

#### 2. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの解析

8週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し，下記を検討した．

- (1) オステオアクチビンの発現：RT-PCR，ウェスタン法，免疫蛍光染色
- (2) 肝障害誘導 4 日目に単離した肝マクロファージの FACS 解析
- (3) 蛍光標識ラテックスビーズを用いた肝障害誘導 4 日目に単離した肝マクロファージの貪食能の解析

#### 3. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復に及ぼす影響

8週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し，その 48 時間後に Clodronate 200  $\mu$ L を腹腔内投与して下記の検討を行った．

- (1) 血清 ALT 値および組織学的所見
- (2) 免疫組織化学染色による CD68 陽性マクロファージの解析

#### 4. オステオアクチビン欠損マウスを用いた検討

オステオアクチビン発現を欠損した DBA/2J (D2) マウスおよび野生型オステオアクチビン遺伝子を持った DBA/2J-gpnb+(D2+) マウスに四塩化炭素肝障害を誘導し，下記について検討した．

- (1) 血清 ALT 値および組織学的所見
- (2) TGF- $\beta$ ，MMP9 および MMP13 の発現：RT-PCR
- (3)  $\alpha$ SMA，Ki-67 の発現：免疫組織化学染色

#### 5. 肝障害/肝癌モデルの解析

(1) 8週齢の C57BL/6J マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し，その 2 日後にマウス肝癌細胞株 Hepa1-6 ( $5 \times 10^5$  cells/匹)を脾注した．脾注 14 日後に犠死させ，腫瘍生着率，肝重量/体重比，腫瘍結節数を検討した．また，肝組織の CD68 免疫染色も行った．

(2) 8週齢の C57BL/6J マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し，経時的に肝マクロファージを単離してサイトカインおよび増殖因子の発現を RT-PCR 法で解析した．

(3) CCl<sub>4</sub> 投与 4 日後の肝組織および肝障害/肝癌モデルの肝組織における CD68 と VEGF の発現を蛍光二重免疫染色で検討した．

### 4. 研究成果

#### 1. 急性肝障害の修復過程における肝マクロ

ファージの解析

- (1) 血清 ALT は四塩化炭素投与 2 日後に 2526 IU/L (range 1190-3690 IU/L) に上昇し, 4 日後には 55 IU/L (range 39-73 IU/L) と低下した. 組織学的には 2 日後に炎症細胞浸潤と, 中心静脈, 門脈周囲に壊死およびアポトーシスが著明に認められたが, 4 日後には改善していた.
- (2) 肝組織における IL-1 $\beta$  および IL-6 の発現は 2 日および 4 日後に低下したが, TNF- $\alpha$  の発現はいずれも増強していた. 一方, IL-10 発現は 2 日および 4 日後に徐々に増強した. また, CCL2 発現は 2 日後に増強したが, 4 日後には低下した.
- (3) F4/80 を用いた免疫染色では, 肝障害誘導 2 日後の肝組織において, マクロファージは障害部位周囲に集積していた (図 1).

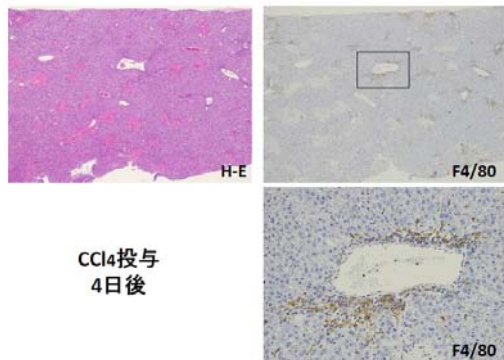


図 1 マクロファージは傷害部位周囲に集積する

また, 肝障害誘導 48 時間後の肝臓から単核球を単離し FACS 解析を行ったところ, 浸潤したマクロファージ (F4/80 陽性) のほぼ全てが CD68 または CD11b 陽性であり, CD68 陽性細胞はその 95% を占めていた.

障害肝にはサイトカイン産生を主たる機能とする CD11b 陽性マクロファージと食食能を主たる機能とする CD68 陽性マクロファージが浸潤する. 以上の結果から, 急性肝障害のピークに遅れて組織傷害周囲に浸潤するマクロファージの 90% 超が食食主体の CD69 陽性マクロファージであることが明らかとなった.

## 2. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの解析

- (1) オステオアクチビンは, 投与 2 日後の血清 ALT 上昇のピークに遅れて発現誘導され, 4 日後以降にも強い発現が持続した. 免疫組織化学染色では, 組織学的に改善を認めた 4 日後に, 門脈域および壊死巣周囲に集積しているマクロファージにオステオアクチビンの発現を認め, オステオアク

チビン陽性マクロファージには食食像が認められた.

また, 蛍光二重染色では, 肝障害部位周囲に浸潤した CD68 陽性マクロファージの一部にオステオアクチビンが発現しており, オステオアクチビン発現細胞はほぼ全てが CD68 陽性であった.

- (2) 傷害肝より単離した単核細胞の FACS 解析では, オステオアクチビン陽性細胞 90% 以上が CD68 陽性/CD11b 陰性であり, CD68 陽性細胞ではその約 50% にオステオアクチビンが発現していた.
- (3) マクロファージの食食能を microsphere-FITC を用いて検討したところ, CD68 陽性マクロファージは CD11b マクロファージよりも高い食食能を有しており, CD68 陽性マクロファージのうち, オステオアクチビン陽性マクロファージは, オステオアクチビン陰性マクロファージに比して有意に高い食食能を有していた.

肝組織におけるオステオアクチビンの発現は肝障害のピークに遅れて発現し, その局在は食食能を有した CD68 陽性マクロファージであることを見出した. さらに単離マクロファージの解析では CD68 陽性マクロファージの中でも CD68 陽性かつオステオアクチビン陽性マクロファージには有意に高い食食能があることが明らかになった.

## 3. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復に及ぼす影響

- (1) 四塩化炭素投与 48 時間後に Clodronate にて浸潤マクロファージを欠損させると, 四塩化炭素投与 96 時間後も ALT が優位に上昇していた. 組織学的にも広範な壊死巣が残存していた (図 2).
- (2) マクロファージ欠損マウスでは CD68 陽性マクロファージの浸潤が欠損していることが確認された (図 2).

障害肝に浸潤するマクロファージの 90% 超が CD68 陽性で, その約半数がオステオアクチビン陽性である. これらのマクロファージを欠損させたところ, 肝障害が遷延化したことから, CD68 およびオステオアクチビン陽性マクロファージは障害肝組織の再生・修復に重要な役割を果たしていることが推測された.

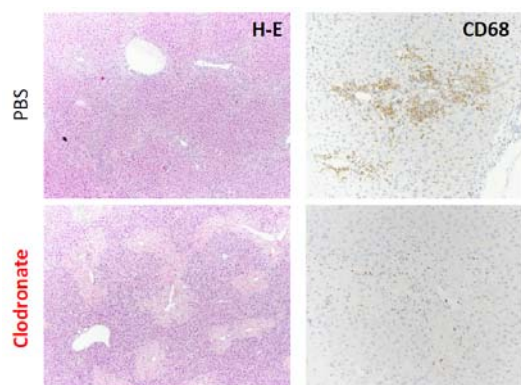


図2 マクロファージの欠損は肝障害を遷延化する

#### 4. オステオアクチビン欠損マウスを用いた検討

- (1) D2 および D2+マウスにおいて、血清 ALT 値および肝組織学的所見に明らかな差異は認めなかった。
- (2) D2 マウスにおいて、四塩化炭素投与 4 日目の TGF- $\beta$  発現、8 日後の MMP9 発現および 6 日後の MMP13 の発現が有意に低下していた。
- (3)  $\alpha$  SMA の免疫組織化学染色では D2 マウスにおいて  $\alpha$  SMA 陽性領域が有意に縮小し、 $\alpha$  SMA および Ki-67 の蛍光二重染色では D2 マウスにおいて  $\alpha$  SMA 陽性の活性化星細胞の増殖が有意に抑制されていた。

オステオアクチビン陽性マクロファージを欠損させると肝障害の程度には影響を及ぼさなかったが、TGF- $\beta$ 、MMP9、MMP13 の発現が低下し、一方、活性化星細胞の増殖が促進されたことから、オステオアクチビン陽性マクロファージは障害肝の修復過程において細胞外マトリックスの産生と吸収の両者に関与していることが示唆された。

#### 5. 肝障害/肝癌モデルの解析

- (1) 肝障害を誘導した後に肝癌細胞を接種すると、肝障害のないマウスに比して、肝臓内への腫瘍の生着率が有意に上昇し (63% vs 10%)、肝重量/体重比および腫瘍結節数も有意に増加した。また、肝障害群の CD68 免疫染色では腫瘍結節周囲に CD68 陽性マクロファージが集簇していた。
- (2) 障害肝に浸潤したマクロファージを経時的に単離して種々のサイトカインおよび増殖因子の発現を解析したところ、四塩化炭素投与 2 日後に単離したマクロファージにおいて VEGF が有意に発現増強し、その強い発現は投与 8 日後まで持続した。
- (3) 蛍光二重染色では、四塩化炭素投与 4 日後の肝組織で、中心静脈周囲の壊死巣に集

簇した CD68 陽性マクロファージに VEGF 発現が認められた。また肝障害/肝癌モデルでは、肝臓内の腫瘍結節近傍に集簇した CD68 陽性マクロファージに VEGF 発現が認められた。

障害肝の再生・修復時に肝癌細胞を接種するとその生着および肝癌結節の発育が促進され、結節周囲にはマクロファージが浸潤し VEGF を発現していた。これらの結果から、障害肝の再生・修復に必要な役割を果たしているマクロファージが肝癌結節の発育、進展にも関与していることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件)

1. Oketani M, Ido A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, Mochida S, Onishi S, Tsubouchi H; Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatol Res*, 査読あり, 2013; 43: 97-105, doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01105.x
2. Nasu Y, Ido A, Tanoue S, Hashimoto S, Sasaki F, Kanmura S, Setoyama H, Numata M, Funakawa K, Moriuchi A, Fujita H, Sakiyama T, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor stimulates the migration of gastric epithelial cells by altering the subcellular localization of the tight junction protein ZO-1. *J Gastroenterol*, 査読あり, 2013; 48: 193-202, doi: 10.1007/s00535-012-0615-y
3. Oketani M, Ido A, Uto H, Tsubouchi H. Prevention of hepatitis B virus reactivation in patients receiving immunosuppressive therapy or chemotherapy. *Hepatol Res*, 査読あり, 2012; 42: 627-636, doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.00998.x
4. Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, Saishoji A, Kure T, Ohno K, Toyokura E, Imanaka D, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Hashiguchi T, Tsubouchi H. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma

- in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep*, 査読あり, 2011; 26: 1227-1233, doi: 10.3892/or.2011.1425
5. Setoyama H, Ido A, Numata M, Moriuchi A, Yamaji N, Tamai T, Funakawa K, Fujita H, Sakiyama T, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Repeated enemas with hepatocyte growth factor selectively stimulate epithelial cell proliferation of injured mucosa in rats with experimental colitis. *Life Sci*, 査読あり, 2011; 89: 269-275, doi: 10.3892/or.2011.1294
  6. Yamaji N, Ido A, Moriuchi A, Numata M, Setoyama H, Tamai T, Funakawa K, Fujita H, Sakiyama T, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor ameliorates mucosal injuries, leading to inhibition of colon cancer development in mice. *Oncol Rep*, 査読あり, 2011; 26:335-341, doi: 10.3892/or.2011.1294
  7. Ido A, Moriuchi A, Numata M, Murayama T, Teramukai S, Marusawa H, Yamaji N, Setoyama H, Kim ID, Chiba t, Higuchi S, Yokode M, Fukushima M, Shimizu A, Tsubouchi H. Safety and
  8. pharmacokinetics of recombinant human hepatocyte growth factor in patients with fulminant hepatitis: a phase I/II clinical trial, following preclinical studies to ensure safety. *J Transl Med*, 査読あり, 2011; 9: 55, doi:10.1186/1479-5876-9-55
  9. Tanoue S, Uto H, Kumamoto R, Arima S, Hashimoto S, Nasu Y, Takami Y, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Liver regeneration after partial hepatectomy in rat is more impaired in a steatotic liver induced by dietary fructose compared to dietary fat. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 2011; 407: 163-168, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.131
  10. Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Changing etiologies and outcomes of acute liver failure: a perspective from Japan. *J Gastroenterology Hepatol*, 査読あり, 2011; 26: 65-71, doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06574.x
  11. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates
  12. cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*, 査読あり, 2010; 138: 2487-2498, doi: 10.1053/j.gastro.2010.02.054
  13. Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 査読あり, 2010; 45: 459-467, doi: 10.1007/s00535-009-0160-5
- [学会発表] (計 6 件)
1. Tabu, K, Ido A, Kumagai K, Oda Kohei, Mawatari S, Tamai T, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Tsubouchi H. Microenvironment in the repair process of injured livers accelerates development of hepatocellular carcinoma. 第 19 回 Charles Heidelberger 国際がん研究シンポジウム. 2013 年 2 月. 鹿児島
  2. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 榑 一晃, 大野香織, 小田耕平, 大重彰彦, 今中 大, 馬渡誠一, 玉井 努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 障害肝の修復期に浸潤するマクロファージは間葉系細胞の組織再構築に関与する 第 49 回日本消化器免疫学会総会. 2012 年 7 月. 鹿児島
  3. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 榑 一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中 大, 馬渡誠一, 呉 建, 玉井 努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝障害の修復期に浸潤する肝マクロファージの欠損は肝障害を遷延化させる 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012 年 6 月. 金沢
  4. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 榑 一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎進展に伴い発現するオステオアクチピンは肝マクロファージの食食に関与する 第 15 回 JDDW2011. 2011 年 10 月. 福岡
  5. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉 建, 榑 一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中 大, 馬渡誠一, 玉井 努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 障害肝において発現するオステオアクチピンは肝マクロファージの食食に関与する 第 48 回日本消化器免疫学会総会. 2011 年 7 月. 金沢

6. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 吳建, 高見陽一郎, 佐々木文郷, 小田耕平, 最勝寺晶子, 橋口正史, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割 第47回日本肝臓学会総会. 2011年6月. 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井戸 章雄 (IDO AKIO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：30291545

(2) 研究協力者

桶谷 眞 (OKETANI MAKOTO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
講師  
研究者番号：50274816

宇都 浩文 (UTO HIROFUMI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
講師  
研究者番号：20347058

森内 昭博 (MORIUCHI AKIHIRO)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
助教  
研究者番号：40359823

玉井 努 (TAMAI TSUTOMU)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
特任講師  
研究者番号：10343336

熊谷 公太郎 (KUMAGAI KOUTAROU)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
特任助教  
研究者番号：80626664

榑 一晃 (TABU KAZUAKI)  
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・  
医員