

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28日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790673

研究課題名（和文）バイオ人工肝臓を用いた肝線維化モデルの作製と星細胞脱活性化の検討

研究課題名（英文）Establishment of hepatic stellate cell de-activation in liver fibrosis model using 3 dimensional bio artificial liver

研究代表者 永妻 啓介（NAGATSUMA KEISUKE）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40543658

研究成果の概要（和文）：

マウス不死化星細胞、内皮細胞、肝細胞をラジアルフロー型バイオリアクターで共培養したバイオ人工肝臓は、通常の2%FBS添加ASF-104N培養液の培養では肝線維化活性を示した。線維化抑制薬剤を添加すると、星細胞にはビタミンA貯留能を反映するLRATの再発現やLAP-D濃度変化から、抗線維化薬の効果判定にも利用できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Bio artificial liver model which is co-cultured with immortal mouse stellate cell, endothelial cell and hepatocyte using radial flow bioreactor showed activity of liver fibrosis in conventional culture fluid(2%FBS+ASF-104N). When an anti-fibrotic agent was added in this bio artificial liver model, LRAT which reflect ability to store vitamin A into stellate cell was re-expressed in mRNA and protein level.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：病態モデル、人工臓器工学、肝線維化、肝星細胞

1. 研究開始当初の背景

肝線維化は肝硬変を特徴づける重要な病態であり、肝線維化の抑制が、病因を問わずに肝不全、肝癌の発症を抑制できる唯一の方法であるが、未だ有望な肝線維化抑制療法はない。*in vitro*肝線維化実験モデルとしては、1980年代に開発された星細胞の分離・単層培養モデルが有用であった。しかし、初代培養でも数日中に活性化されてしまい、TGF- β 産生、その活性化、Smad3などの細胞内シグナルが暴走した状態で、生体内での実際の星細胞の活性化や肝線維化反応とは明らかに異なっている。

そこで、我々は、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた3次元肝線維化モデルを作製し、このモデルを用いて、静止期星細胞マーカーである lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) を用いて、線維化の機構解析、抗線維化薬の開発を試みた。

2. 研究の目的

肝臓星細胞はビタミン A 貯蔵細胞であるとともに、病的肝臓においては myofibroblast 化してコラーゲンを産生し、肝臓の線維化を促進する。本研究の目的は、線維化の機構解析や抗線維化薬の開発に用いるための、バイオ人工肝臓での肝臓線維化モデルを開発することである。

3. 研究の方法

マウス不死化星細胞 A7 細胞、不死化肝細胞 IMH-4、不死化類洞内皮細胞 M1 をラジアルフロー型バイオリアクターで培養し、バイオ人工肝臓モデルを作製した。静止期星細胞のマーカーはビタミン A 貯蔵酵素 lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) と cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) の共発現、線維化活性は TGF- β 活性

化の指標である latency associated protein の断片 (LAP-D) の培養液での濃度変化で評価した。

4. 研究成果

プラスチックディッシュでの単層培養下では、星細胞 A7 は活性化しており、LRAT と CRBP1 の mRNA の発現はほとんど認めなかった。肝細胞 IMH4 では LRAT mRNA のみ、内皮細胞 M1 では CRBP mRNA のみが発現していた。A7, M1, IMH-4 の 3 細胞を小型ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) で、2% FBS 添加 ASF-104 培養液を還流し、共培養すると、約 2 週間の培養後、LRAT mRNA は低下し、CRBP-1 のみ発現を認めた (図 1)。

この時点で肝臓線維化活性を示す培養液中の TGF- β LAP-D は単層培養ヒト肝臓 myofibroblast の培養上清と同程度 (150-200pM) 検出された。3 種の細胞を共培養したのみのバイオ人工肝臓では、線維化活性が強いと考えられた。そこで、線維化活性を抑制することが期待される薬剤 A を加えて、3 種の細胞を共培養したバイオ人工肝臓に投与したところ、LRAT mRNA が検出されるようになり (図 1)、その免疫染色でも内皮細胞と星細胞と思われる非実質細胞に LRAT 陽性細胞を認めた (図 2)。しかし、薬剤 A では LAP 濃度の低下は認めず、TGF- β 活性化は抑制されなかった (図 3)。

図1 LRAT, CRBP mRNA

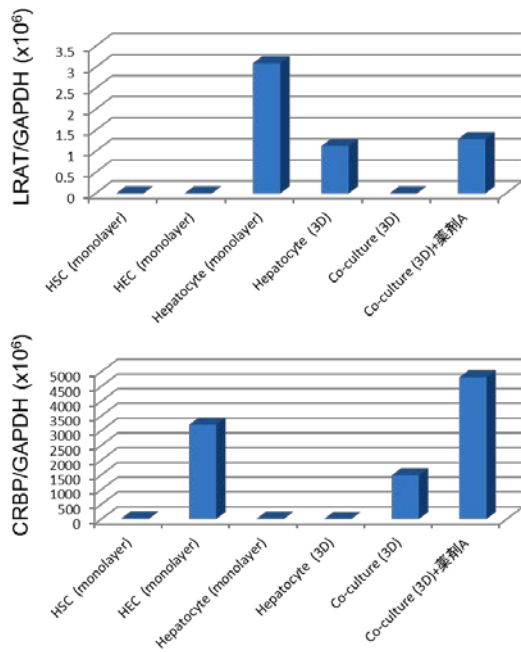
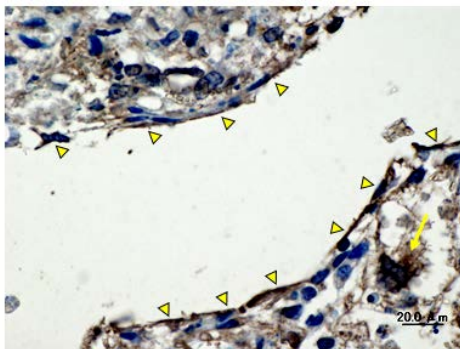
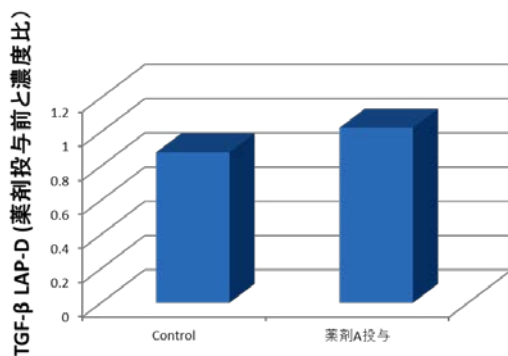


図2 3次元共培養（薬剤A添加）での毛細血管様構造部位のLRAT染色像



矢頭：内皮細胞、矢印：星細胞

図3 TGF-β LAP-D 濃度



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2件)

1. Kuo TF, Tatsukawa H, Nagatsuma K, Matsuura T, Kojima S. Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. **J Cell Physiol** 227: 1130-7, 2012 DOI 10.1002/jcp.22833 (査読有)
2. Saito R, Ishii Y, Ito R, Nagatsuma K, Tanaka K, Saito M, Maehashi H, Nomoto H, Ohkawa K, Mano M, Aizawa M, Hano H, Yanaga K, Matsuura T. Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. **ArtifOrgans**. DOI:10.1111/j.1525-1594.2010.01049.x (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. 永妻啓介、松浦知和、小嶋聡一、羽野寛、TRECK急性肝不全モデルマウスにおける肝組織TGF-β活性化反応の観察、第25回肝類洞壁細胞研究会学術集会、2011年12月18日、東京
2. 永妻啓介、松浦知和、小嶋聡一、TGF-β Activation in the Liver during Acute Hepatic Failure induced in TRECK Mice、16th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid、2011年9月22-24日、イタリア・フィレンツェ

3. 永妻啓介、松浦知和、小嶋聡一、羽野寛、
TRECK急性肝不全モデルマウスにおける肝組織TGF- β 活性化反応の観察、第37回日本急性肝不全研究会、2011年6月1日、東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永妻 啓介 (NAGATSUMA KEISUKE)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40543658

: