

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24590954

研究課題名(和文) オーバル細胞増殖を介した肝再生・修復における核内受容体CARの役割

研究課題名(英文) The role of nuclear receptor CAR in the liver regeneration and repair mediated by oval cell proliferation.

研究代表者

山崎 勇一 (Yamazaki, Yuichi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00582404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：オーバル細胞増殖の実験モデルであるエチオニン添加水コリン欠乏(CDE)食を用い、CARのKO、WTマウスで検討し、CDE食により、CARは活性化され、標的遺伝子であるCYP2B10やGADD45を誘導することを見出した。3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine含有食と異なり、KO、WTマウス共に肝障害、オーバル細胞増殖は認められた。肝前駆細胞あるいは胆管上皮細胞のマーカーであるEpCAM抗体を用いた免疫染色による解析の結果、KO、WTマウス間でのEpCAM陽性細胞(胆管上皮細胞+肝前駆細胞増殖)の増加に有意な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that choline-deficient DL-methionine supplemented (CDE) diet activates the nuclear receptor constitutive active/androstane receptor (CAR), resulting in proliferation of oval cells in mouse liver. Activation of CAR by CDE was shown by cytochrome P450 (CYP)2B10 and DNA damage-induced protein 45 family (GADD45) mRNA induction after feeding a CDE diet to Car+/+ mice. Unlike 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine containing diet, the liver damage, and oval cell proliferation were found in both Car+/+ and Car-/- mice after feeding a CDE diet. There was no significant difference of the EpCAM positive cells containing bile duct epithelial cells and liver progenitor cells between the Car+/+ and Car-/- mice as a result of immunostaining analysis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：核内受容体CAR オーバル細胞増殖 肝前駆細胞 肝再生

1. 研究開始当初の背景

肝臓は本来、さまざまなタイプの肝障害に反応して、再生修復する能力を備えている。この間再生能力が障害された時、成熟肝前駆細胞としてオーバル細胞が増殖し、肝再生、修復を促していると考えられている (Mech Dev 2003; 120: 117-30)。オーバル細胞は肝細胞に分化し、障害された肝機能を回復させる。一方で、オーバル細胞は肝癌幹細胞としても考えられている (Hepatology. 2009; 49: 318-29)。化学物質暴露はげっ歯類でオーバル細胞を誘導する肝障害を引き起こし、人において薬物治療で引き起こされる肝障害、肝前駆細胞の増殖の分子メカニズムの解明に利用されている (Gastroenterology. 2009; 137: 466-81。)。 0.1% の 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC)を含有した食餌あるいは 0.165% エチオニン添加水コリン欠乏 (CDE) 食の供与はげっ歯類における肝障害時のオーバル細胞増殖の最も効果的なモデルである。しかし DDC 含有食、CDE 食がオーバル細胞増殖を顕在化させる分子メカニズムは現時点では明らかとなっていない。本研究で我々は DDC 含有食、CDE 食を使用して、オーバル細胞増殖を介した肝再生、修復における核内受容体 CAR (constitutive active/androstane receptor) の役割を明らかにする。CAR は薬物代謝酵素 (CYP、Multidrug resistance relation protein (MRP)、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) など) の発現調節を行う核内レセプターである。我々の留学していたアメリカ国立衛生科学研究所 (NIEHS/NIH) 根岸研究室では CAR による薬物代謝酵素 (CYP2B, UGT1A)の誘導のメカニズムを分子生物学的に解明してきた。薬物 (Phenobarbital, PB) による CYP2B の誘導は、肝臓で細胞

質に存在する CAR が PB 刺激により核内に移動し、核内に存在する Retinoid X receptor (RXR)と heterodimer を形成し、CYP2B 遺伝子の 5' -上流領域に存在する PBREM (PB-responsive enhancer module)と命名したエンハンサーに結合することにより起こる (Mol Pharmacol. 1998; 53: 597-601, Mol Cell Biol. 1998; 18: 5652-8, J Biol Chem. 1999; 274: 6043-6, Mol Cell Biol. 1998; 19: 6318-22)。その後の報告で CAR は phosphoenolpyruvate carboxyltransferase や glucose 6-phosphatase 、 carnitine palmitoyltransferase などの肝遺伝子も制御することが示され、その役割は糖尿病などの肝エネルギー代謝性疾患にまで広がっている (Mol Pharmacol. 2002; 61: 1-6, Mol. Cell. Biol. 2004; 24: 7931-40, Drug Metab Pharmacokinet. 2008; 23: 8-13)。CAR は PB 投与マウスで肝発癌を引き起こすことを報告され (Cancer Res. 2004; 64: 7197-200)、さらに我々は、平成 18-19 年度科学研究費補助金を得て、CAR の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態への関与を解明し報告した (Gut. 2007; 56: 565-74)。オーバル細胞増殖はげっ歯類だけでなく、ウイルス性肝炎、NASH などのヒトの慢性肝疾患でも認められ (Semin Liver Dis. 2003; 23: 385-96.)、また、CAR はヒトの C 型慢性肝炎の障害肝で発現が亢進していると報告されている (Hepatology. 2011 in press)。ヒトにおける肝障害時のオーバル細胞増殖を介した肝再生や肝修復に CAR 活性化の関与が示唆される。我々はすでに、CAR の遺伝子欠損マウス (KO) (C3H/HeN 系および C57BL/6N 系) および PXR の KO マウス (C57BL/6N 系) の供与を受け、オーバル細胞増殖の実験モ

デルである DDC 含有食を用い、KO、野生型(WT)マウスで検討を行い、CAR の KO マウス以外のすべてのマウスにおいて DDC 添加食による肝障害、オーバル細胞増殖を引き起こすことを見出した。DDC diet により CAR は細胞質から核内へ移動し、標的遺伝子である CYP2B や GADD45 を誘導することを見出した。また、レーザーマイクロダイセクションを用いて WT マウス肝での中心静脈域および / あるいは門脈域で特異的に発現し、CAR により調節される遺伝子の解析を行い、門脈域での CAR の活性化がオーバル細胞増殖に関与することを報告した (Lab Invest. 2011; 91:1624-33)。

2. 研究の目的

オーバル細胞増殖を介した肝再生、修復における核内受容体 CAR の役割を明らかにする

肝細胞と胆管上皮細胞へ分化しうる両能性をもつオーバル細胞は、成熟肝前駆細胞として、肝障害時に活性化され、肝再生、修復を促すと考えられている。しかし、肝障害時のオーバル細胞増殖の機序は不明である。我々は肝障害を誘導する DDC 含有食、エチオニン添加コリン欠乏食がマウス肝で CAR を活性化し、オーバル細胞増殖を誘導することを見出した。

本研究では CAR ノックマウスを用いて、肝障害時のオーバル細胞増殖を介した肝再生、修復における CAR の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス肝障害モデル・培養細胞・臨床検体を用いた研究を合わせ、基礎および臨床の両面からオーバル細胞増殖を介する肝再生、修復における CAR の病態を解明することを目標に、以下の4つの研究計画を立てた。

(1) CDE 食によるオーバル細胞増殖の実験モデルで CAR の KO マウスと WT マウスで比較解析(肝障害、オーバル細胞増殖)する。

(2) ノックアウトマウスを用いて、レーザーマイクロダイセクションで、CAR により調節される遺伝子あるいはオーバル細胞に関連する遺伝子を同定する。

(3) 初代培養オーバル細胞で CAR activator によるオーバル細胞の増殖、遊走能を解析する。

(4) 慢性肝疾患患者 (NASH など) の肝組織におけるオーバル細胞増殖、CAR、EpCAM の発現、CAR の遺伝子多型と発現の関連を検討する。

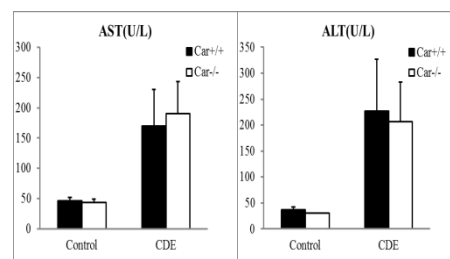
4. 研究成果

(1) CDE 食によるオーバル細胞増殖の実験モデルで CAR の KO マウスと WT マウスで比較解析(肝障害、オーバル細胞増殖)

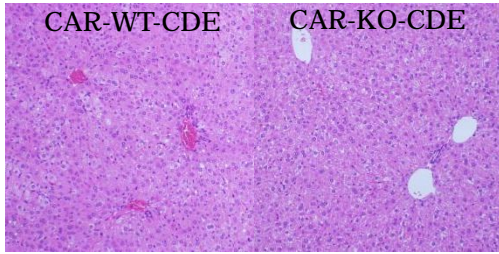
肝障害の比較検討(生化学検査、組織学検査)

CAR の KO マウス、WT マウスを使用して14日間の0.165%エチオニン添加水コリン欠乏(CDE)食での解析を行った。KO マウス、WT マウスともに AST、ALT 上昇を認めたが、有意な差はなく、病理組織所見も差異なかった。

・CDE 食による AST、ALT 上昇



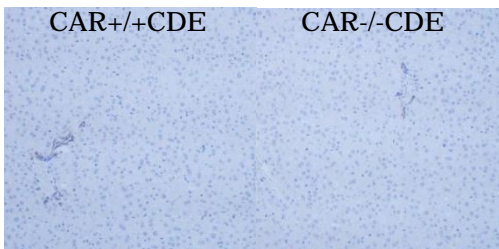
・CDE 食による肝障害組織像



オーバル細胞増殖の比較検討（免疫染色）

肝前駆細胞あるいは胆管上皮細胞のマーカーである EpCAM 抗体を用いた免疫染色による解析の結果、KO、WT マウス間での EpCAM 陽性細胞（胆管上皮細胞 + 肝前駆細胞増殖）の増加に有意な差は認められなかった。

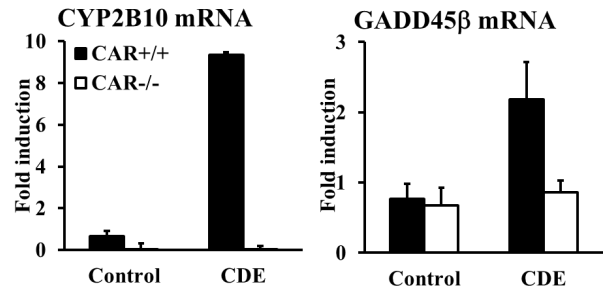
・ EpCAM staining



（ 2 ）ノックアウトマウスを用いて、レーザーマイクロダイセクションで、CAR により調節される遺伝子あるいはオーバル細胞に関連する遺伝子を検索

DDC 含有食と異なり、オーバル細胞が増殖している領域の判別が困難であり、一定の遺伝子発現の傾向は得られなかった。肝組織中の RNA を抽出し、リアルタイム PCR を用いて解析した。CAR の標的遺伝子である CYP2B や GADD45 は WT マウスにおいて CDE 食で誘導され、CAR の活性化を認めた。

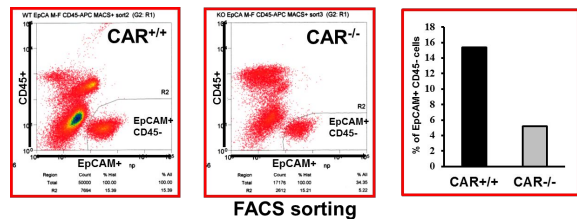
・ CAR 関連遺伝子



（ 3 ）初代培養オーバル細胞で CAR activator によるオーバル細胞の増殖、遊走能の解析

初代培養オーバル細胞の増殖が安定せず、CAR activator による増殖、遊走能については一定の結果は得られなかった。今後の研究課題である。予備実験として行った CAR の KO と WT マウスで EpCAM 抗体によるフローサイトメトリー法により EpCAM 陽性細胞数（胆管上皮細胞 + 肝前駆細胞増殖）を比較解析した結果、対照食において KO マウスでの EpCAM 陽性細胞が減少していた。また、CAR activator を投与した WT マウスでは EpCAM 陽性細胞数の増加は見られなかった。

・ EpCAM による FACS sorting



（ 4 ）慢性肝疾患患者の肝組織におけるオーバル細胞増殖、CAR、EpCAM の発現、CAR の遺伝子多型と発現の関連の検討

本研究期間では、一定の結果が得られず、今後、研究を継続したいと考える。

5 . 主な発表論文など

[雑誌論文] (計 3 件)

Yamazaki Y, Naganuma A, Arai Y, et al.

Clinical and virological features of acute hepatitis E in Gunma prefecture, Japan between 2004 and 2015. Hepatol Res. 2017;47:435-445. doi: 10.1111/hepr.12765. 査読有

Kodama S, **Yamazaki Y**, Negishi M (Co-First Author). Pregnane X Receptor Represses HNF4 Gene to Induce Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein IGFBP1 that Alters Morphology of and Migrates HepG2 Cells. Mol Pharmacol. 2015;88:746-57. doi: 10.1124/mol.115.099341. 査読有

Tojima H, **Kakizaki S**, **Yamazaki Y**, et al. Ligand dependent hepatic gene expression profiles of nuclear receptors CAR and PXR. Toxicol Lett 2012;3:288-97. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.06.001. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

Yamazaki Y, Naganuma A, Arai Y, et al. Clinical and virological features of acute hepatitis E in Gunma prefecture, Japan between 2004 and 2015. APASL2017 (アジア太平洋肝臓病学会) 2017年2月17日 上海(中国)

山崎勇一, 長沼 篤, 岡本宏明. E型急性肝炎30例の臨床的、ウイルス学的特徴 第41回日本肝臓学会東部会(ワークショップ) 2016年12月8日 東京(日本)

柿崎 暁, **山崎勇一**, Masahiko Negishi. 核内レセプターからみた肝疾患「核内レセプター CAR (constitutive androstane receptor) の肝疾患における役割」 第52回日本肝臓学会総会(ワークショップ

プ) 2016年5月19日 千葉市(日本)

Yamazaki Y, Kodama S, **Kakizaki S**, et al. 1. IGFBP 1 mediates PXR-induced morphological changes and migration of HCC cells.

APDW2015(アジア太平洋消化器病学会) 2015年12月4日 台北市(台湾)

山崎勇一, 児玉 進, **柿崎 暁**他. 肝細胞癌株における IGFBP-1 を介した核内受容体 PXR 活性化による形態変化、細胞遊走 第57回日本消化器病学会大会 2015年10月8日 東京(日本)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 勇一 (YAMAZAKI Yuichi)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号: 00582404

(2) 研究分担者

柿崎 暁 (KAKIZAKI Satoru)

群馬大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 80344935

(3) 連携研究者

吉成 浩一 (YOSHINARI Kouichi)

静岡県立大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：60343399

(4)研究協力者

戸島 洋貴 (TOJIMA Hiroki)

群馬大学・大学院医学系研究科・大学院生

田原 博貴 (TAHARA Hiroki)

群馬大学・大学院医学系研究科・大学院生