

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10107

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670186

研究課題名(和文)鉄過剰投与による肝細胞特異的傷害 胆管上皮細胞・肝幹細胞分離への応用

研究課題名(英文)Hepaocyte injury induced by iron overload and its application for isolation of bile duct cells and stem cells

研究代表者

西川 祐司(NISHIKAWA, Yuji)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90208166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：クエン酸第一鉄の過剰摂取による劇症型肝障害の剖検病理所見に着想を得て、非トランスフェリン結合鉄負荷による選択的肝細胞傷害のメカニズムをマウスを用いた動物実験で検討するとともに、鉄傷害を利用した胆管上皮細胞の高純度分離法の開発を試みた。マウスにクエン酸第一鉄を経口投与すると、JNKやc-Junのリン酸化を伴う肝細胞傷害が誘導された。鉄を大量に投与した後すぐに肝細胞をコラゲナーゼ灌流法で分離するとすべての肝細胞が死滅していることが確認された。この状態でグリソン鞘を採取し、肝細胞の混入のない胆管上皮細胞を単離することが可能であった。この方法は今後の胆管上皮細胞の基礎研究に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously experienced an autopsy case of fulminant liver failure due to acute excessive consumption of sodium ferrous citrate. The liver damage was characterized by complete sparing of bile duct cells despite the loss of almost all hepatocytes. In the present study, we investigated the mechanism of hepatocyte-specific injury induced by nontransferrin-bound iron using a mice model and tried to apply this iron-induced hepatocyte injury to the development of a highly specific isolation method of bile duct cells. In mice, oral administration of sodium ferrous citrate induced hepatocyte-specific injury associated with marked phosphorylation of JNK and c-Jun. Hepatocytes were found to be completely nonviable when they were isolated from mice treated with lethal doses of iron. However, bile duct cells within the Glisson's sheath were intact and perfectly suited for culturing. This new method of pure isolation of bile duct cells may be useful in the studies of the biliary system.

研究分野：実験病理学

キーワード：鉄 肝傷害 肝細胞 胆管上皮細胞 肝幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 2011年に我々は鉄製剤(クエン酸第一鉄)を過剰量摂取した後、意識障害および劇症型の肝障害をきたし、約1か月で死亡した患者の剖検例を経験した。この患者では肝組織が著明に萎縮し、肝細胞がほぼ完全に脱落しているのにもかかわらず、肝内胆管は保たれ、一部ではむしろ増殖していた。これは肝上皮性細胞に対する鉄毒性の感受性の違いを示しているが、肝細胞特異的傷害メカニズムおよび傷害肝の組織像について十分に研究されていない状況であった。

(2) 急性鉄傷害のモデルを作製するため、我々は、C57BL/6Jマウスを用い、上記症例で使用されたのと同程度の鉄剤を経口投与する実験を行った。その結果、数時間後に肝細胞壊死が起こること、胆管上皮細胞はまったく影響を受けないことが確認された。肝傷害は肝細胞におけるc-Junの高度のリン酸化を伴っていた。

2. 研究の目的

非トランスフェリン結合鉄(NTBI)による肝傷害は酸化ストレスによるものと推測されるが、メカニズムの詳細はほとんど明らかになっていない^①。本研究の第一の目的は、鉄による肝細胞特異的傷害の細胞病理学的、分子病理学的メカニズムを検討することである。また、本研究の第二の目的は、過剰鉄の肝細胞特異的傷害という性質を利用して、胆管上皮細胞を純粋に分離し、培養する新しい方法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) マウス鉄過剰投与モデルの確立

成熟C57BL/6Jマウスに対し、クエン酸第一鉄を経口投与する実験を行い、肝傷害の程度および経時的变化を調べた。

(2) 傷害肝におけるストレス応答の検討

傷害肝から組織標本を作製し、各種ストレス応答シグナルの変化を調べた。特にリン酸化c-Junの変化をwestern blottingや免疫組織化学で検討した。

(3) MKK7ノックアウト(KO)マウスの鉄傷害に対する反応性の変化の検討

c-Junのリン酸化に関わるJNKの上流キナーゼとしてMKK7が重要であることが知られている^②。MKK7(fl/fl)マウス(東京医科歯科大学難治疾患研究所 発生再生生物学仁科博史先生により提供)とMx1-Creマウス(米国Jackson Laboratory)を掛け合わせ、poly(I:C)を投与することで成熟肝で肝細胞特異的にMKK7をKOをし、鉄に対する反応を対照肝と比較した。

(4) 肝細胞と胆管上皮細胞における鉄代謝関連蛋白の発現の検討

鉄傷害の肝細胞特異性の原因を明らかにするため、肝細胞によるNTBI取り込み能に関わるトランスポーター、トランスフェリン受容体、hepcidin、ferroportinなどの鉄関連蛋白のmRNA発現を定量RT-PCRで調べ、肝細胞、胆管上皮細胞で比較した。

(5) 胆管上皮細胞の高純度分離法の確立

鉄を過剰投与することで肝細胞死を誘導した後にコラゲナーゼで肝を灌流し、胆管を含むグリソン鞘を採取した。また、これらをさらにコラゲナーゼ・プロナーゼで処理し、胆管上皮を含む細胞懸濁液を作製し、胆管上皮表面に発現する接着分子であるEpCAMに対する抗体が付着した磁気ビーズ(Dynabeads)で胆管上皮を純粋に分離した。

(6) 肝幹細胞の選択的採取

Diethoxycarbonyl dihydrocollidine (DDC) dietをマウスに与えると、ポルフィリン代謝に障害が起こり、門脈周囲性の細胆管反応が引き起こされる。増生する細胆管は肝幹細胞の性質を持つとされるが、不明の点も多い。上記と同様な方法でこれらの細胞を分離できるかを検討した。

(7) 胆管上皮細胞の表現型の可塑性の検討

我々はこれまで成熟ラット肝細胞を分離し、スフェロイド(凝集)培養した後、コラーゲンゲルに包埋する方法で、胆管上皮細胞への分化転換が起こるが、培養条件を変えることで肝細胞への再分化を促すことが可能であることを報告している^③。本研究では、成熟胆管上皮細胞が肝細胞への分化転換をきたしうるかについても検討した。実験にはアルブミンを発現するとDsRed2蛍光を発するAlb-DsRed2トランスジェニックラットから採取した胆管上皮細胞を用い、肝細胞への分化誘導はマトリゲルを塗布したディッシュ上で行った。

4. 研究成果

(1) マウス鉄過剰投与モデル

クエン酸第一鉄を経口投与する実験では、鉄換算で250 mg/kg投与により広範な肝傷害を誘導できた。グリソン鞘周囲の肝細胞が特に強い傷害が認められた。一方、個体差および性差が大きく、鉄溶液の濃度、投与前の絶食など条件を工夫したが、個体ごとのばらつきは十分には解消できなかった。また、150 mg/kg以上投与すると数時間以内に死亡するマウスが出現し、解剖して脳を含む組織を検索し、死因の解明を試みたが、明らかな責任病変を見出せなかった。

(2) 鉄過剰投与後のストレス反応

クエン酸第一鉄投与後、継時的に肝組織を採取し、western blottingでJNKおよびc-Junのリン酸化を検討したところ、3から6時間をピークとして著明なリン酸化が起こって

いることが確認された。免疫組織化学では小葉内の肝細胞にリン酸化 c-Jun の陽性所見が認められたが、特にグリソン鞘周囲肝細胞でのリン酸化が高度であった。

(3) MKK7 KO マウス肝での鉄による肝傷害

KO マウスおよび対照マウスに対し、クエン酸第一鉄を 250 mg/kg または 150 mg/kg を投与し、6 時間から 24 時間で肝組織を観察した。KO マウスでは対照マウスに比較し、肝傷害の程度が軽度である傾向が認められた。また、免疫組織化学的に KO マウスでも肝細胞の c-Jun リン酸化がみられたが、その程度は弱かった。個体差が大きいため、今後さらに検討する必要があるが、JNK-c-Jun 経路の活性化が鉄による肝傷害の成立に関連する可能性が示唆された (図 1)

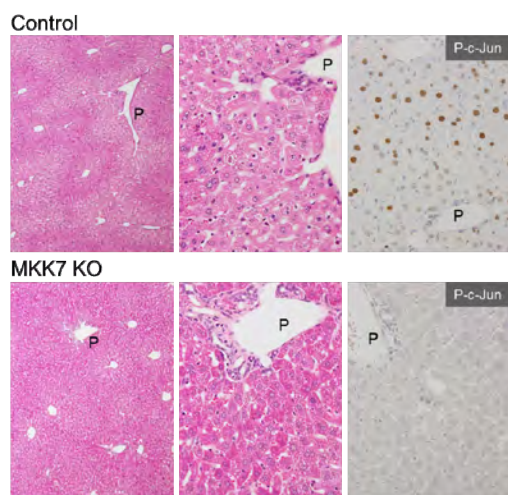


図 1 MKK7 KO の鉄傷害への影響(クエン酸第一鉄 150 mg/kg 投与後 6 時間)

(4) 肝細胞および胆管上皮における鉄代謝関連蛋白の mRNA 発現

分離肝細胞およびグリソン鞘 (胆管上皮、血管を含む) から total RNA を抽出し、トランスフェリン受容体 (Tfr1, Tfr2), NTBI トランスポーター (Dmt1, Zip14), フェリチン (Ferritin), 鉄還元蛋白 (Steap3), ヘプシジン (Hepcidin1, Hepcidin2), 鉄輸送蛋白 (ferroportin) の mRNA 発現を定量 RT-PCR で検討した。なお、reference として *Gapdh* 発現を用いた。その結果、肝細胞ではグリソン鞘に比べ、*Tfr2*, *Hepcidin1*, *Hepcidin2* の発現が有意に高く、*Ferroportin* の発現が低い傾向が認められた (図 2)。一方、*Dmt1* 発現は肝細胞でむしろ低く、*Zip14* 発現は同程度であった (図 2)。*Ferritin* および *Steap3* の発現はグリソン鞘に比べ肝細胞では低かった (図 2)。肝細胞における選択的鉄障害は、NTBI の選択的取り込みによるものではなく、*Hepcidin* 高発現とこれによる鉄輸送蛋白 *Ferroportin* の抑制がもたらす鉄蓄積が重要であることが示唆された。また、鉄負荷の直後および 9 日後において肝細胞における上記遺伝子の発現レベルにはほとんど変化は認め

られなかった。

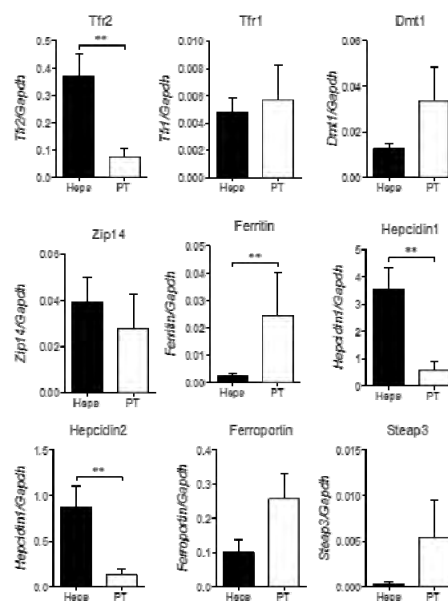


図 2 鉄代謝関連遺伝子の mRNA 発現(肝細胞 [Heps; n = 6] とグリソン鞘 [PT; n = 5] との比較; Mann-Whitney test, **P<0.01)

(5) 鉄負荷後の胆管上皮細胞の分離・培養

肝細胞を完全に壊死に陥らせるため、クエン酸第一鉄を 600 mg/kg 投与し、40 分後に肝をコラゲナーゼ灌流し、肝細胞とグリソン鞘を分離した。肝細胞は完全に nonviable であり、3 日間培養した後、ディッシュに付着する肝細胞はまったく認められなかった (図 3)。一方、細切し、コラーゲンゲル内に包埋培養した胆管は鉄負荷による影響を受けず、活発な樹枝状形態形成を示し、これは interleukin 6 (IL6) や transforming growth factor- α (TNF- α) でさらに促進された (図 3)。

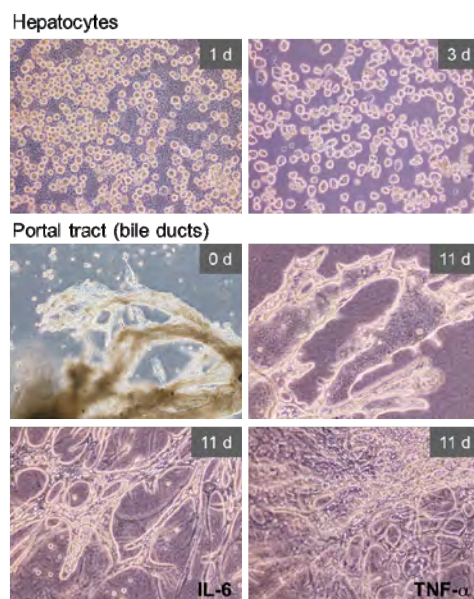


図 3 クエン酸第一鉄大量投与後に分離・培養した肝細胞および胆管上皮細胞 (肝細胞はコラーゲン塗布ディッシュ上の単層培養, 胆管を含むグリソン鞘はコラーゲンゲル内包埋培養)

分離したグリソン鞘をコラゲナーゼ・プロナーゼでさらに消化し、EpCAM 抗体結合磁気ビーズと反応させると胆管上皮細胞のみが結合し、DNase 処理により胆管上皮細胞をビーズから単離することが可能であった。

(6) DDC diet 誘導傷害肝からの肝幹細胞分離

C57BL/6J マウスに1か月間 DDC diet を食べさせた後にクエン酸第一鉄を 600 mg/kg 投与し、40 分後に肝をコラゲナーゼ灌流し、肝細胞とグリソン鞘を分離した。上記の正常肝での実験と異なり、分離肝細胞のほとんどは viable で、ディッシュ上で単層を形成した (U 図 4)。細胆管反応をきたしたグリソン鞘もコラーゲン内で樹枝状形態形成を示した。DDC diet により肝細胞は鉄毒性に対して抵抗性となるため、この実験系は鉄過剰投与による肝幹細胞分離には適さないが、ポルフィリン代謝異常と鉄毒性に関する興味深い知見と思われる。なお、DDC diet 投与後 1 週間の肝細胞において、鉄関連蛋白の mRNA 発現を検討したところ、*Hepcidin1*, *Hepcidin2* の発現が亢進する他、大きな変化は認められなかった。

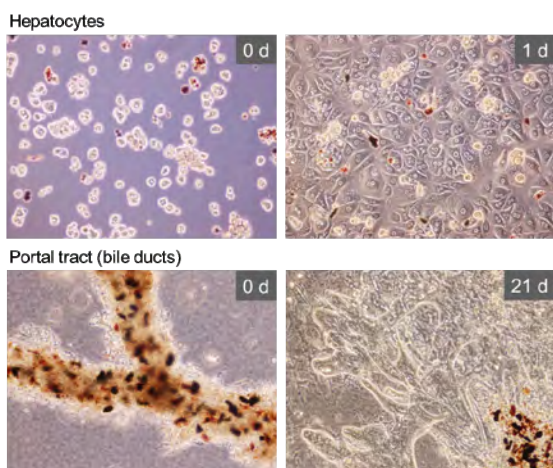


図 4 DDC diet による肝細胞の鉄毒性耐性の獲得。DDC diet で1か月間飼育したマウスからクエン酸第一鉄大量投与後に分離・培養した肝細胞および胆管上皮細胞（肝細胞はコラーゲン塗布ディッシュ上の単層培養、胆管を含むグリソン鞘はコラーゲンゲル内包埋培養）

(7) 胆管上皮細胞の表現型の可塑性

Alb-DsRed2 ラット肝をコラゲナーゼ灌流し、肝細胞およびグリソン鞘を分離した後、後者をさらにコラゲナーゼ・プロナーゼで消化し、EpCAM 結合磁気ビーズで胆管上皮細胞を単離した。胆管上皮細胞をマトリゲルを塗布したディッシュ上で無血清培養する実験を行ったところ、dexamethasone (Dex) の存在下で培養後 5 日で一部の細胞集団に DsRed2 蛍光が出現した (図 5)。また、分離したグリソン鞘内の胆管上皮細胞をコラーゲンゲル内で増殖させた後に、コラゲナーゼ処理により回収し、マトリゲル上培養しても同様の蛍光の出現が確認された。免疫細胞化学的にこれらの細胞はアルブミン陽性で、ご

く一部ではあるが hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α の発現が認められた。形態学的には小型の胆管上皮様細胞であるが、これらの結果は胆管上皮細胞が微小環境の変化に伴い肝細胞方向に分化転換しうることを示唆している。今後、本研究で開発した大量鉄投与を用いた胆管上皮の高純度分離法をラットモデルに応用し、さらに検討していきたい。

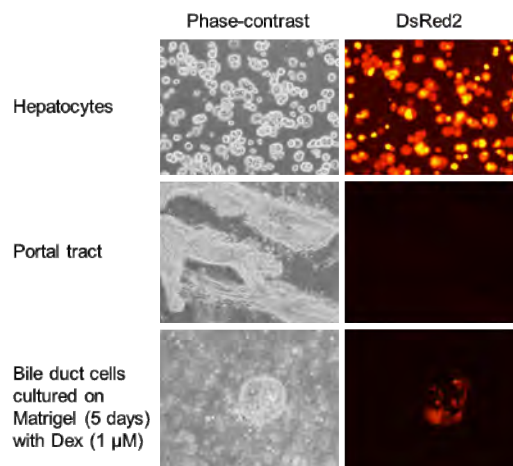


図 5 Alb-DsRed2 ラット肝から分離培養した胆管上皮細胞における DsRed2 蛍光の出現。

<引用文献>

- ① Fleming RE and Ponka P, Iron overload in human disease, N Eng J Med 2012 ; 366 : 348-359
- ② Asaoka Y, Nishina H, J Biochem 2010;148:393-401
- ③ Sone et al., Recovery of mature hepatocytic phenotype following bile ductular transdifferentiation of rat hepatocytes in vitro. Am J Pathol. 2012;181:2094-2104

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 6 件)

- ① Tanimizu N, Nishikawa Y, Ichinohe N, Akiyama H, Mitaka T, Sry HMG box protein 9-positive (Sox9+) epithelial cell adhesion molecule-negative (EpCAM-) biphenotypic cells derived from hepatocytes are involved in mouse liver regeneration, J Biol Chem, 査読有, 289 巻, 2014, 7589-7598, doi: 10.1074/jbc.M113.517243
- ② Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S, Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis, Proc Natl Acad Sci USA., 査読有, 111 巻, 2014, 1090-1095,

doi: 10.1073/pnas.1322731111

③Nagahama Y, Sone M, Chen X, Okada Y, Yamamoto M, Xin B, Matsuo Y, Komatsu M, Suzuki A, Enomoto K, Nishikawa Y, Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injuries, *Am J Pathol*, 査読有, 184 巻, 2014, 3001-3012, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.005

④榎本克彦, 山本洋平, 鈴木麻弥, 吉岡年明, 大森泰文, 曾根正行, 西川祐司, 肝前駆細胞由来胆管上皮と肝外胆管前駆細胞由来胆管上皮の胆道系での接点, *肝胆膵*, 66 巻, 4 号, 2013, 613-621

⑤Nishikawa Y, Sone M, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Yamamoto Y, Ito A, Sugiyama T, Enomoto K, Tumor necrosis factor- α promotes bile ductular transdifferentiation of mature rat hepatocytes in vitro, *J Cell Biochem*, 査読有, 114 巻, 2013, 831-843, doi: 10.1002/jcb.24424

⑥西川 祐司, 肝細胞と胆管上皮細胞の相互可塑性とその病態生理学的意義, *肝胆膵*, 66 巻, 4 号, 2013, 633-643

[学会発表] (計 12 件)

①陳錫, 山本雅大, 藤井清永, 永濱康晴, 大塩貴子, 岡田陽子, 辛氷, 西川祐司, マウス肝硬変一肝腫瘍モデルにおける insulin-like growth factor 2 関連遺伝子の選択的発現亢進, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 神奈川県

②山本雅大, 辛氷, 陳錫, 藤井清永, 大塩貴子, 西川祐司, マウス肝腫瘍モデルによる肝癌・胆管癌形質を決定する発癌経路の検討, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 神奈川県

③西尾美希, 王嘉, 西川祐司, 三森功士, 鈴木聡, MOB1A/1B による肝・胆管細胞制御, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 神奈川県

④辛氷, 山本雅大, 陳錫, 藤井清永, 大塩貴子, 西川祐司, 活性化型 Akt 導入によるマウス肝発癌: 変異型 Hras 同時導入の前癌細胞増殖促進効果, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 神奈川県

⑤藤井清永, 陳錫, 大塩貴子, 辛氷, 岡田陽子, 山本雅大, 西川祐司, マウス肝腫瘍モデルにおける代謝状態の変化: プロテオーム解析による肝硬変モデルと非硬変モデルの比較, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 神奈川県

⑥大塩貴子, 山本雅大, 藤井清永, 陳錫, 辛氷, 岡田陽子, 西川祐司, 肝傷害後の組織修復における肝細胞 MKK7 の意義, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25-27 日, 神奈川県

⑦西川祐司, 永濱康晴, 曾根正行, 陳錫, 岡田陽子, 山本雅大, 辛氷, 松尾康博, 小松美貴子, 鈴木明, 榎本克彦, "Reversed lobulation

of the liver" following chronic centrilobular liver injuries: contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system, FASEB Science Research Conference, 2014 年 7 月 6-11 日, Keystone, CO, USA

⑧大塩貴子, 山本雅大, 藤井清永, 陳錫, 辛氷, 岡田陽子, 西川祐司, 肝細胞増殖および傷害における MKK7 の機能解析, 第 21 回肝細胞研究会, 2014 年 6 月 27-28 日, 東京都

⑨藤井清永, 三上紗弥香, 大塩貴子, 陳錫, 辛氷, 岡田陽子, 碓井史彦, 山本雅大, 西川祐司, マウス初代培養肝細胞のタンパク質発現変動の解析, 第 21 回肝細胞研究会, 2014 年 6 月 27-28 日, 東京都

⑩西川祐司, 永濱康晴, 曾根正行, 陳錫, 岡田陽子, 山本雅大, 辛氷, 榎本克彦, 慢性肝傷害に伴う細胆管反応の細胞起源, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島県

⑪辛氷, 山本雅大, 陳錫, 藤井清永, 大塩貴子, 西川祐司, 活性化型 Akt と活性化変異型 Hras による肝発癌過程の検討, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島県

⑫山本雅大, 辛氷, 藤井清永, 陳錫, 大塩貴子, 西川祐司, ジエチルニトロサミン誘発マウス肝腫瘍の四塩化炭素によるプロモーション作用のマイクロアレイを用いた解析, 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島県

[図書] (計 1 件)

① 西川 祐司, 胆道の腫瘍様病変, 中山書店, 癌診療指針のための病理診断プラクティス肝胆膵腫瘍 (青笹, 坂本編), 2014, 201 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/pathol1/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 祐司 (NISHIKAWA, Yuji)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90208166

(2)研究分担者

山本 雅大 (YAMAMOTO, Masahiro)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30431399

藤井 清永 (FUJII, Kiyonaga)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10278327