

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670575

研究課題名(和文) 膵線維化における線維産生細胞の起源探求

研究課題名(英文) The Origin of Collagen-producing Myofibroblasts in Pancreatic Fibrosis

研究代表者

田浦 康二郎 (Taura, Kojiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80378629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：膵線維化における線維産生細胞の起源を探求することを目的とした。コラーゲン産生細胞がGFPを発現するマウスに膵線維化を誘導すると、線維隔壁に沿ってGFP陽性細胞が出現するが、膵星細胞のマーカーであるGFAPが共陽性となる細胞は一部であった。膵より分離した細胞のFACS解析でも、線維化の誘導に伴い増加したGFP陽性細胞中のGFAP陽性細胞の割合は約20%であった。また、肝星細胞と比し、膵星細胞のLrat発現は低く、そのためretinyl palmitate含有量も極僅かであることが判った。膵星細胞以外のコラーゲン産生細胞の存在が示唆され、膵星細胞の、肝星細胞とは異なる特徴が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to pursue the origin of collagen-producing cells in pancreatic fibrosis by using transgenic mice expressing GFP under collagen 1(I) promoter. Pancreatic fibrosis was induced by cerulein. GFP-positive cells were seen along fibrotic septa but only a small minority of the cells were positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP), a specific marker of PSCs. The flowcytometry of isolated pancreatic cells from cerulein-treated mice showed GFAP-positive cells accounted for only 20% of GFP-positive cells. PSCs had lipid droplets, however, unlike HSCs, they lacked vitamin A autofluorescence. Liquid chromatography mass spectrometry analysis of the cell extract revealed PSCs contained only trace amounts of retinyl palmitate. The mRNA expression of Lrat, an enzyme necessary to esterify retinol, was much lower than that of HSCs. In conclusion, our study suggested the presence of collagen-producing cells other than PSCs and showed different characteristics between PSCs and HSCs.

研究分野：肝胆膵外科 移植外科

キーワード：慢性膵炎 膵線維化 膵星細胞 肝星細胞 ビタミンA コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

慢性膵炎は、炎症細胞の浸潤、膵実質細胞の脱落及び線維化が生じることにより膵内外分泌機能が破綻し糖尿病や消化吸収障害を引き起こす疾患である。持続する炎症、線維化は膵臓癌発症とも関わっており、本邦での有病者数は年々増加傾向にある。

慢性膵炎の成因は様々であるが、その進展の病態生理は実質の脱落、間質の線維化という点で共通している。膵線維化において線維を産生する細胞が何であるかは未だ議論がある。

肝星細胞 (HSC) の膵カウンターパートである膵星細胞 (PSC) が、膵線維化における筋線維芽細胞の起源とされることが多い。しかし近年、膵線維化より知見が先行する肝線維化領域において HSC 以外の筋線維芽細胞の起源となる細胞の報告が相次いでおり、膵臓においても同様に PSC 以外のコラーゲン産生細胞が存在する可能性がある。

2. 研究の目的

膵臓における線維産生細胞の起源を探求し、膵線維化に対する治療戦略を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

Collagen type alpha1 プロモーター下に GFP を発現するトランスジェニックマウス (Col1 GFP マウス) を用い実験を行った。

コレシストキニンアナログであるセルレインの腹腔内注射により膵線維化を誘導した。

Col1 GFP マウスの膵臓にコラゲナーゼ、プロテアーゼ処理を行い、密度勾配遠心法により PSC を含む非実質細胞 (NPC) の分離を行った。

4. 研究成果

(1) Col1 GFP マウスに膵線維化を誘導した。

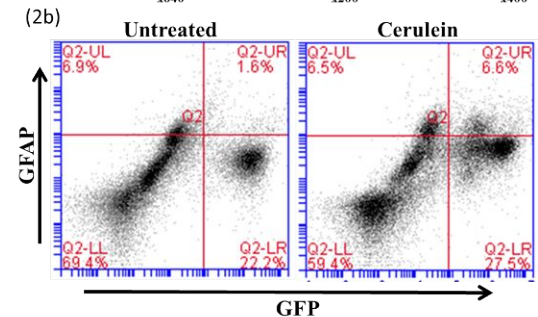
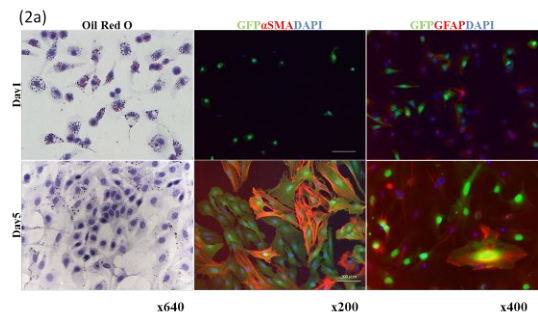
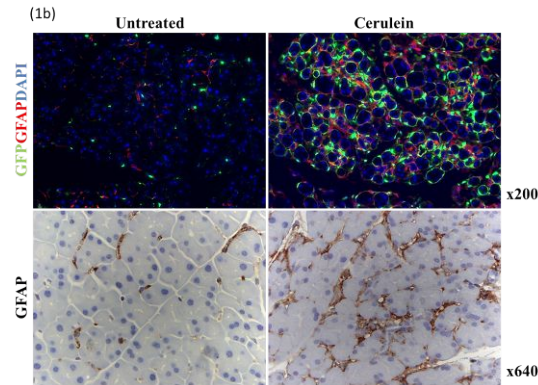
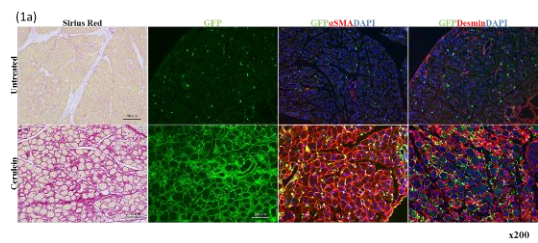
Sirius Red 染色にて著明な線維化が観察され、蛍光顕微鏡にて、この線維隔壁に沿った多数の GFP 陽性細胞が認められた。これらの GFP 陽性細胞は alpha-smooth muscle actin (SMA) 及び Desmin にも陽性となることから、筋線維芽細胞であると考えられた (図 1a)。

一方 PSC のマーカーである Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性細胞は、線維化の誘導に伴い著明に増加することが判ったが、GFP 陽性細胞の一部のみでしか GFAP は陽性とはならなかった (図 1b)。

(2) PSC を分離した。

分離した PSC は Oil Red O 陽性となる脂肪滴を細胞質内に持ち、数日間の培養でその脂肪滴を失い、形態を筋線維芽細胞様に変える。さらに GFP 及び SMA が陽性となる。しかしこれらの分離した PSC においては一部のみでしか GFAP は陽性とはならなかった (図 2a)。

この分離した PSC を Fluorescence activated cell sorting (FACS) で解析すると、線維化の誘導に伴い GFP 陽性細胞は増加するが、その GFP 陽性細胞中に占める GFAP 陽性細胞の割合は約 20%であった (図 2b)。



(3) ビタミン A の自家蛍光を観察できなかった。

星細胞は細胞質中にビタミン A の脂肪滴を持つとされる。蛍光顕微鏡で観察を行うと、分離した NPC 及び組織切片にて肝臓でははっきりとビタミン A の自家蛍光を観察できるのに対し、膵臓では自家蛍光を観察することができなかった (図 3a)。

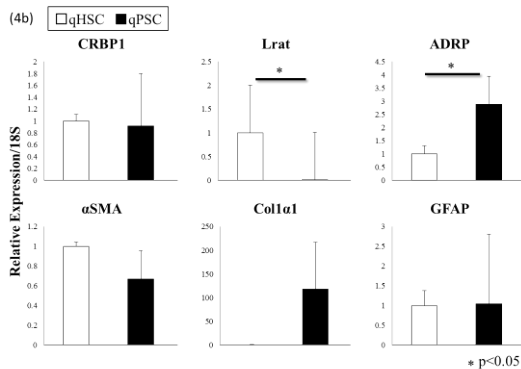
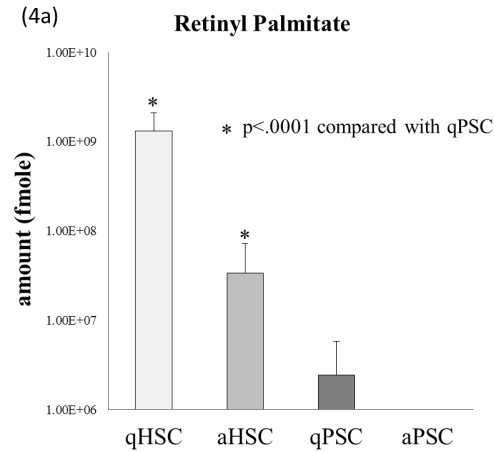
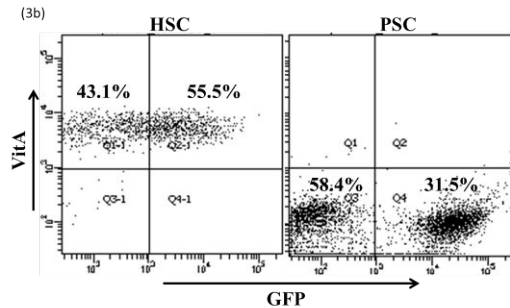
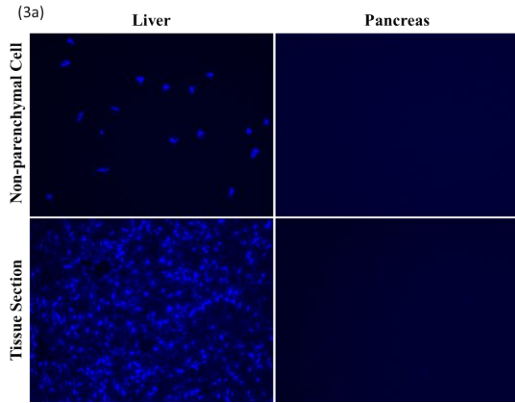
そこで UV レーザーを用いた FACS にてビタミン A の自家蛍光を持つ細胞の分離を試みたが、HSC においては GFP 陽性陰性に関わらずほぼすべての細胞が自家蛍光陽性となるのに対し、PSC においては自家蛍光はすべて陰性であるとの結果を得た (図 3b)。

(4) retinyl palmitate の定量を行った。

質量分析により、分離した直後の quiescent PSC/HSC (qPSC/qHSC) 5 日間プラスティックディッシュ上で培養した activated PSC/HSC (aPSC/aHSC) における、

細胞質内でのビタミン A 貯蔵の主たる形態である retinyl palmitate の定量を行うと、PSC における含有量は HSC に比べ非常に少ないことが判った (図 4a)。

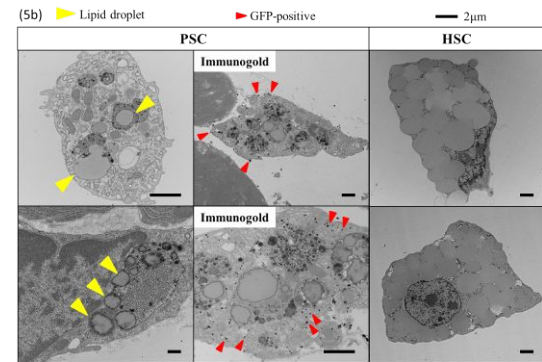
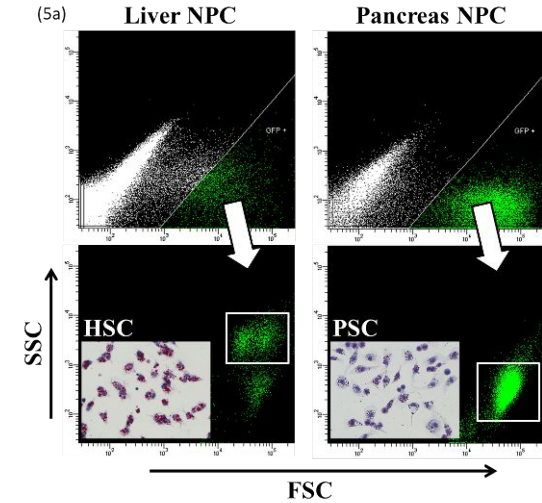
また retinol のエステル化に必須の酵素である Lecithin retinol acyltransferase (Lrat) の mRNA 発現が PSC において非常に低いことも明らかとなった (図 4b)。



(5) PSC と HSC の構造を比較した。

FACS での解析では、HSC は内部構造の複雑さを表す側方散乱光 (SSC) が高いのに対し、PSC では SSC が低い (図 5a)。

透過型電子顕微鏡を用い観察すると、PSC における脂肪滴は、HSC のそれに比し、非常に小さく、少ないということが判った。金コロイド法により、GFP 陽性かつ脂肪滴を持つ細胞を同定したが、同様に脂肪滴は少なく小さいものであった (図 5b)。



(6) まとめ

これまでに PSC と線維化の関係について論じた報告はあるが、PSC 以外の線維産生細胞について言及した報告はほとんどない。我々は、線維化研究において非常に有用な Col1 GFP マウス (線維産生細胞が GFP でラベルされる) を用い実験を行った。

我々の研究において、線維化を誘導した膵臓では GFAP 陽性細胞、即ち PSC は著明に増加する。さらに GFAP 陰性の線維産生細胞 (GFP 陽性細胞) が多数出現することより、PSC 以外のコラーゲン産生細胞の存在が示唆された。さらに、invitro の実験でも線維化の誘導により増加した GFP 陽性細胞中の GFAP 陽性細胞の占める割合は約 20% であり、PSC 以外の線維産生細胞の存在が確かめられた。

我々の実験では蛍光顕微鏡、FACS 共に PSC においてビタミン A の自家蛍光を観察できず、PSC 中の retinyl palmitate 含有量も HSC に比べ非常に少ないことが明らかとなった。PSC は細胞質内に脂肪滴を形成することはできるが、Lrat の発現が低いため retinol をエステル化できず、そのため脂肪滴内のビタミン

ン A 貯蔵量は極少量であると考えられた。Lrat ノックアウトマウスを用いた報告では、肝組織中の retinyl palmitate 含有量はノックアウト動物において著明に減少するのに対し、膵組織中の retinyl palmitate の含有量は野生型、ノックアウト動物共にほとんど認められない。これらの結果から、膵臓には Lrat がほとんど発現しておらず、そのためビタミン A はほとんど貯蔵することができないと考えられる。

これまで膵線維化の研究では、肝線維化及び HSC の研究を追従する形で、PSC を中心に研究が進められてきた。本研究では、PSC 以外のコラーゲン産生細胞の存在を示したのみならず、HSC の膵カウターパートとされる PSC の、HSC とは大きく異なる特徴、即ちビタミン A をほとんど持たないということを示した点で、非常に意義深い結果が得られたものと考えられる。

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 25 件)

- (1) Hatano E, Okuno M, Taura K, Uemoto S (25人中6番目) Conversion to complete resection with mFOLFOX6 with bevacizumab or cetuximab based on K-ras status for unresectable colorectal liver metastasis (BECK study). J Hepatobiliary Pancreat Sci, 査読有, epub, 2015. DOI: 10.1002/jhbp.254.
- (2) Chen F, Muranishi Y, Taura K, Date H (8人中4人目) Complete resection of a giant mediastinal leiomyosarcoma. Ann Thorac Surg, 査読有, 99巻, 2015, e69-71. DOI:10.1016/j.athoracsur.2014.12.02.
- (3) Tanabe K, Taura K, Koyama Y, Uemoto S (15人中2人目, 責任著者) Migration of splenic lymphocytes promotes liver fibrosis through modification of T helper cytokine balance in mice. J Gastroenterol, 査読有, epub, 2015.
- (4) Kasai Y, Hatano E, Taura K, Uemoto S (6人中4番目) Hepatocellular carcinoma with bile duct tumor thrombus: surgical outcomes and the prognostic impact of concomitant major vascular invasion. World J Surg, 査読有, 39巻, 2015, 1485-93. DOI: 10.1007/s00268-015-2985-9.
- (5) Kitajima T, Fujimoto Y, Taura K, Uemoto S (8人中6番目) Intraoperative fluorescent cholangiography using indocyanine green for laparoscopic fenestration of nonparasitic huge liver cysts. Asian J Endosc Surg, 査読有, 8巻, 2015, 71-4. DOI: 10.1111/ases.12137.
- (6) Toriguchi K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (6人中5人目) Laparoscopic liver resection in obese patients. World J Surg, 査読有, 39巻, 2015, 1210-5. DOI: 10.1007/s00268-014-2927-y.
- (7) Iwaisako K, Taura K, Koyama Y, Asagiri M (5人中2人目) Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. Curr Pathobiol Rep, Review, 2巻, 2014, 209-215.
- (8) Nishio T, Hatano E, Taura K, Uemoto S (11人中4番目) Impact of Hepatic Steatosis on Disease-Free Survival in Patients with Non-B Non-C Hepatocellular Carcinoma Undergoing Hepatic Resection. Ann Surg Oncol, 査読有, epub, 2014.
- (9) Takemoto K, Hatano E, Taura K, Asagiri M (16人中11番目) Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. FEBS Open Bio, 査読有, 4巻, 2014, 777-87. DOI: 10.1016/j.fob.2014.08.007. eCollection 2014.
- (10) Okuno M, Hatano E, Taura K, Uemoto S (9人中8番目) Regorafenib suppresses sinusoidal obstruction syndrome in rats. J Surg Res, 査読有, 193巻, 2015, 693-703. DOI: 10.1016/j.jss.2014.08.052.
- (11) Okuno M, Hatano E, Taura K, Uemoto S (20人中4番目) Indication for neoadjuvant chemotherapy in patients with colorectal liver metastases based on a nomogram that predicts disease-free survival. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 査読有, 21巻, 2014, 881-8. DOI: 10.1002/jhbp.149.
- (12) Kobayashi S, Nakgano H, Taura K, Ioka T (18人中8番目) Phase I study of adjuvant gemcitabine or S-1 in patients with biliary tract cancers undergoing major hepatectomy: KHB01003 study. Cancer Chemother Pharmacol, 査読有, 74巻, 2014, 699-709. DOI: 10.1007/s00280-014-2543-4.
- (13) Tolba RH, Fet N, Taura K, Yamamoto Y (12人中4番目) Role of preferential cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam in ischemia/reperfusion injury of the rat liver. Eur Surg Res, 査読有, 53巻, 2014, 11-24. DOI: 10.1159/000362411.

- (14) Iguchi K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (12人中9番目) Hepatoprotective effect by pretreatment with olprinone in a swine partial hepatectomy model. *Liver Transpl*, 査読有, 20巻, 2014, 838-49. DOI: 10.1002/lt.23884.
- (15) Takemoto K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (17人中14番目) Assessment of [(18)F]-fluoroacetate PET/CT as a tumor-imaging modality: preclinical study in healthy volunteers and clinical evaluation in patients with liver tumor. *Ann Nucl Med*, 査読有, 28巻, 2014, 371-80. DOI: 10.1007/s12149-014-0823-z.
- (16) Ishii T, Hatano E, Taura K, Uemoto S (7人中4番目) A case of xanthogranulomatous cholecystitis suspected to be adenocarcinoma based on the intraoperative peritoneal washing cytology. *Int J Surg Case Rep*, 査読有, 5巻, 2014, 138-41. DOI: 10.1016/j.ijscr.2014.01.011.
- (17) Nakamura K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (9人中8番目) Soluble thrombomodulin attenuates sinusoidal obstruction syndrome in rat through suppression of high mobility group box 1. *Liver Int*, 査読有, 34巻, 2014, 1473-87. DOI: 10.1111/liv.12420.
- (18) Nakao M, Oda Y, Taura K, Minato K (4人中3番目) Direct volume manipulation for visualizing intraoperative liver resection process. *Comput Methods Programs Biomed*, 査読有, 113巻, 2014, 735-35. DOI: 10.1016/j.cmpb.2013.12.004.
- (19) Toriguchi K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (9人中8番目) Attenuation of steatohepatitis, fibrosis, and carcinogenesis in mice fed a methionine-choline deficient diet by CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein deficiency. *J Gastroenterol Hepatol*, 査読有, 29巻, 2014, 1109-18. DOI: 10.1111/jgh.12481.
- (20) Ishii T, Hatano E, Taura K, Uemoto S (6人中4番目) High risk of lung metastasis after resection of hepatocellular carcinoma more than 7 cm in diameter. *Surg Today*, 査読有, 44巻, 2014, 1900-5. DOI: 10.1007/s00595-013-0792-1.
- (21) Iguchi K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (6人中5番目) The impact of posthepatectomy liver failure on the recurrence of hepatocellular carcinoma. *World J Surg*, 査読有, 38巻, 2014, 150-8. DOI: 10.1007/s00268-013-2247-7.
- (22) Yamanaka K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (11人中10番目) A single-center analysis of the survival benefits of adjuvant gemcitabine chemotherapy for biliary tract cancer. *Int J Clin Oncol*, 査読有, 19巻, 2014, 485-9. DOI: 10.1007/s10147-013-0578-x.
- (23) Koyama Y, Taura K, Hatano E, Uemoto S (15人中2番目, 責任著者) Effects of Oral Intake of Hydrogen Water on Liver Fibrogenesis in Mice. *Hepatology Research*, 査読有, 44巻, 2014, 663-677. DOI: 10.1111/hepr.12165.
- (24) Ishii T, Hatano E, Taura K, Uemoto S (8人中3番目) Sorafenib in a hepatocellular carcinoma patient with end-stage renal failure: A pharmacokinetic study *Hepatology Research*, 査読有, 44巻, 2014, 685-8. DOI: 10.1111/hepr.12156.
- (25) Yamanaka K, Hatano E, Taura K, Uemoto S (14人中13番目) Effect of olprinone on liver microstructure in rat partial liver transplantation. *J Surg Res*, 査読有, 183巻, 2013, 391-6. DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.033.

〔学会発表〕(計3件)

- (1) Pancreatic Stellate Cells Do Not Have Vitamin A In Fat Droplets
Yamamoto G, Taura K, Uemoto S
9th Academic Surgical Congress, Feb 4-6, 2014, San Diego
- (2) 膵星細胞は脂肪滴にビタミン A を持たない
山本玄、田浦康二朗、上本伸二
第114回日本外科学会総会、2014年4月3-5日、京都
- (3) 膵線維芽細胞起源の探求
山本玄、田浦康二朗、上本伸二
第115回日本外科学会総会、2015年4月16-18日、名古屋

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

田浦康二郎 (TAURA KOJIRO)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：80378629

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：