

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293288

研究課題名(和文) 肝星細胞による加齢肝の肝再生能不全プロセスの解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Development of multidisciplinary therapy for aged liver insufficiency based on the mechanism of hepatic stellate cell dysfunction.

研究代表者

島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：10216070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会において高齢者ドナー肝移植や高齢者の悪性腫瘍に対する肝切除術後肝不全の克服は重要な課題である。我々は加齢肝再生不全に対し、肝星細胞老化による機能不全に着目し検討を行った。加齢肝再生不全が加齢肝星細胞機能の低下に起因することなど新たな知見が得られ、肝星細胞制御によって、加齢肝機能低下を克服できる可能性がしめされた。今後は臨床応用に対する新規治療法開発に向けた研究を継続する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aged donor of living donor liver transplantation and aged hepatectomy for malignancy is major problem in Japan. We examined the mechanism of aged liver proliferative dysfunction focused of the relationship of hepatic stellate cell (HSC). We obtained several novel findings regarding the mechanisms for aged liver regeneration, by which aged HSC induced liver functional and regenerative insufficiency. Therefore, we must develop some possible therapeutic agents for the target of aged HSC dysfunction, and continue the study toward clinical application for aged liver regeneration.

研究分野：医学薬学

キーワード：肝不全 肝星細胞 加齢肝 肝再生

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎えた現在、高齢者ドナー肝移植や高齢者の肝細胞癌・肝転移に対する大量肝切除後肝不全の克服は重要な課題である。細胞老化は細胞増殖・修復の停止だけでなく、炎症性サイトカイン、細胞外リモデリング因子など種々の有害性物質を分泌し、再生能低下・免疫低下・炎症を促進する負の側面を有する。最近では、肝星細胞(hepatic stellate cell: HSC)の老化が肝再生不全に重大な役割を担うことが報告されている。本研究では加齢肝再生不全についてHSCの老化(機能不全)に着眼して、肝再生不全プロセスの解明と治療法を確立するものである。

2. 研究の目的

本研究で着目したHSCは正常肝構成細胞の5~8%に認め、肝実質細胞と類洞内皮細胞間に存在する。HSCは生体のビタミンA総量の約80%を貯蔵し、全身のビタミンAのホメオスターシスを制御し、肝障害・kupffer細胞活性化・酸化ストレス・炎症性サイトカインなどにより活性化される。HSCの機能は多彩で、肝血流調節、肝再生、免疫系などにも関連し、これらすべての病態不全における統合的治療のターゲットとなる。

また細胞老化はHSCにおいても認められ、加齢により肝星細胞の活性低下・肥大による類洞の狭小化(類洞血流の減少)や、細胞外マトリックス酵素低下による組織修復反応減弱などが報告されている。このようにHSCの老化による機能変化の研究は始まったばかりであるが、肝微小環境において再生・免疫・炎症すべてに關与するkey regulatorで、加齢肝への影響は確実である。

本研究では上記をふまえ、HSC制御に着目した、(1) 背景肝内環境要因の特徴解析、(2) 機能不全機序解明と生体肝移植・大量肝切除での適用、(3) 加齢肝における虚血再還流障害肝再生の制御、を目指して加齢肝過小グラフト・大量肝切除の包括的治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1). ヒト加齢肝における背景肝内環境要因の解析

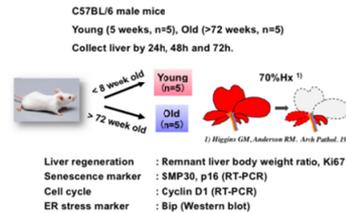
肝切除99例を60歳以下の若年群(n=45)、70歳以上の高齢群(n=54)に分類。加齢指標マーカー(SMP30, p16INK4a, p66, SIRT1)及び肝再生関連因子(HGF, c-MET)発現をreal time PCRにより測定し、遺伝子発現変化を比較検討。肝切除後再生率は、術前/術後6ヶ月肝容積(VINCENT, Fuji Film)を比較。

(2). マウス加齢肝における加齢遺伝子発現と肝切除術後発現変化

C57BL/6 male mice 5週齢以下を若年群(n=5)、72週令以上を高年齢群(n=5)に分類し70%肝切除を施行。肝切除後肝傷害、肝再

生(残肝体重比・Ki67 LI)を検討。real time PCRにより加齢指標マーカー(SMP30, p16INK4a, p66, SIRT1)、細胞増殖因子(Cyclin D1)、アポトーシス(Caspase3)、オートファジー(LC3)について術後経時的(24, 48, 72時間)に比較検討。

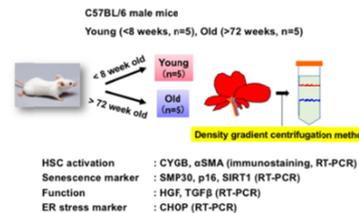
Aged liver regeneration - 70% hepatectomy model -



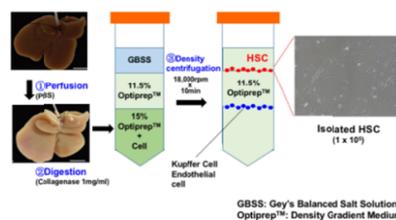
(3). HSCの肝再生への影響の検討(HSC単離による解析)

若年(8週齢)・加齢(>72週齢)C57BL/6雄性マウス肝から密度勾配分離法(Collagenase: 1mg/ml 処理後ホモジネートし、Gey's Balanced Salt Solution + Optiprep添加、1800rpm/10min)によりHSCを抽出。HSC活性状態(cytoglobin/αSMA mRNA)、加齢マーカー(SMP30/p16 mRNA)、肝再生因子(HGF, TGFβ1 mRNA)、medium内のHGF分泌能(ELISA)とともにER stressマーカー(Xbp1 / Atf4 / Atf6 / CHOP mRNA)を解析。

Aged HSC function - HSC isolation -

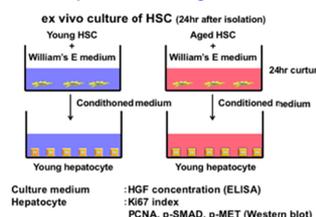


HSC isolation method (Mouse)



さらに若年・加齢HSCを培養したconditioned mediumによる若年肝細胞培養で再生能(ki67 labeling index)を比較検討。

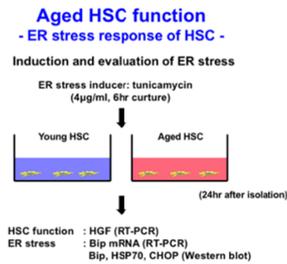
Aged HSC function - Trophic function of aged HSC -



(4). 若年及び加齢肝星細胞における小胞体ストレス反応

若年・加齢HSCに小胞体ストレス応答誘

導剤処理(Tunicamycine 4ug/ml・6hr)による ER stress マーカー(Atf4 / Atf6 / CHOP / Bip mRNA)や Bip 蛋白発現(Western blotting)、HGF mRNA 発現を解析。



(5). 若年及び加齢肝星細胞機能解析 (Human)

マウス HSC 分離法と同様の手技で、ヒト肝切除標本から HSC を分離。対象は 70 歳以上を加齢群(n=3)、50 歳以下を若年群(n=2)とし、加齢マーカー(p16, SIRT1, SHC1 mRNA)とともに TGF-β mRNA を検討。

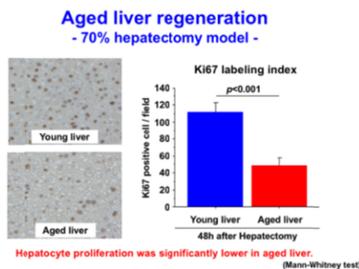
4. 研究成果

(1). ヒト加齢肝における背景肝内環境要因の解析

若年群(<60 歳:n=45)と高齢群(>70:n=54)では、高齢群の p16INK4a は高値で、HGF 及び c-MET は低値であり、加齢肝では加齢遺伝子発現とともに、再生増殖因子が減弱していた。肝切除後再生率(術前/術後 6 ヶ月肝容積)は高齢群で低く、p16INK4a 発現と有意に反比例(R=0.67)していた。

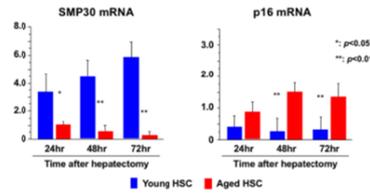
(2). マウス加齢肝における加齢遺伝子発現と肝切除術後発現変化

肝切除前 SMP30 は高齢群で低値、p66・p16 INK4a は高齢群で高値で、肝切除後若年群は全例生存したが、加齢群では術後 4 日目までに半数が死亡し、術後肝傷害(AST, ALT, LDH, T-Bil)も術後 48 時間以降、加齢群で上昇していた。肝再生に関して、肝切除後 48 時間以降では高齢群で肝再生が遅延し、ki67 LI も低値であった。



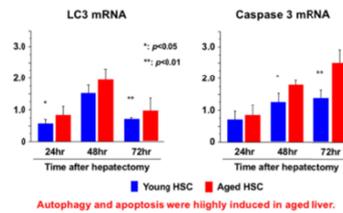
また術後 24 時間の CyclinD1 減少し、術後 SMP30 の低下、p16INK4a の上昇が継続しており、肝切除後加齢肝再生には加齢遺伝子が関与していることが推察された。

Aged liver regeneration - 70% hepatectomy model -



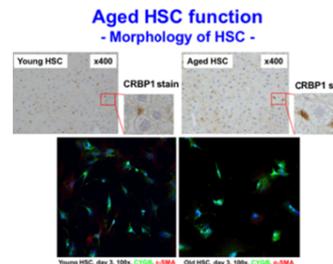
さらに加齢群では LC3 mRNA(オートファジーが誘導)、Caspase 3 mRNA(アポトーシスも誘導)が術後高値であった。

Aged liver regeneration - 70% hepatectomy model -



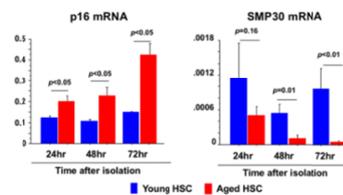
(3). 肝星細胞の肝再生への影響の検討(肝星細胞単離による解析)

若年・加齢 HSC の形態的相違は、加齢 HSC において vitamin A 小滴が多数認められ、分離肝星細胞でも同様であった。



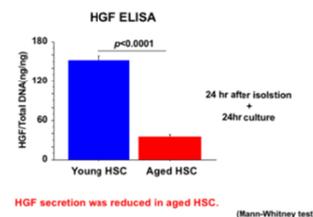
また加齢 HSC における加齢マーカー p16 は有意に上昇、SMP30 は有意に減弱しており、HSC の老化も示唆された。

Aged HSC function - Changes of senescence markers -



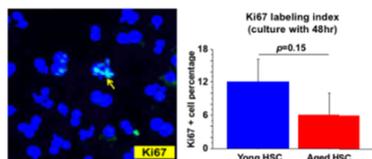
さらに加齢 HSC の HGF mRNA は分離後 24hr で有意に低下し、medium 内の HGF 分泌も有意に低下しており、HSC 老化による機能不全の可能性が示唆された。

Aged HSC function - HGF concentration of conditioned medium -



実際に若年・加齢 HSC による conditioned medium の若年肝細胞培養により肝細胞再生への影響を確認すると、加齢群における肝細胞再生能(ki67 labeling index)が低い傾向を認めた($p=0.15$)。

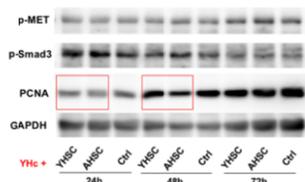
Aged HSC function
- Hepatocyte proliferation with aged HSC medium -



Hepatocyte proliferation was impaired in aged HSC medium. (Mann-Whitney test)

Western blotting における PCNA 発現も加齢群が培養後 48hr で低下していたことから、加齢 HSC の機能低下による肝再生能への影響が示された。

Aged HSC function
- Hepatocyte proliferation with aged HSC medium -



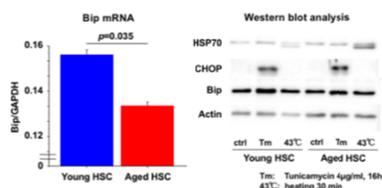
YHc: Young hepatocyte YHSC: Young HSC AHSC: Aged HSC

しかしながら、加齢 HSC における機能不全のメカニズムとして ER stress マーカーに着目し検討を加えたが、Xbp1 / Atf4 / Atf6 / CHOP mRNA 発現には一定の傾向を認めず、加齢と ER stress の関連を示すことはできなかった。

(4). 若年及び加齢肝星細胞における小胞体ストレス反応

Tunicamycin 4ug/ml・6hr 処理による ER stress 反応解析では、Atf6 は若年 HSC で有意に高値であったが、CHOP は加齢 HSC で有意に高値であり、反応に一定の傾向を示さなかった。また ER stress 反応性蛋白である Bip 発現は同等であり、若年・加齢 HSC における ER stress 反応に差を認めず、加齢による影響を示すことができなかった。

Aged HSC function
- ER stress response of HSC -



Unfolding protein response showed no significant difference.

(5). 若年及び加齢肝星細胞機能解析 (Human)

加齢群で SIRT1, SHC1 が発現上昇している傾向を確認したが、TGF-β に関しては差を認めなかった。

これらの知見により、加齢肝は肝切除後肝再生が不良で肝傷害も強く、加齢マーカー

一解析により、肝切除術後再生不全の誘導が示された。その機序として HSC 老化の関与が示されたが、機序として着目していた ER stress に関与は認めなかった。

これらのことは高齢ドナー・高齢肝切除症例の選別及び治療ターゲットになる可能性があり、今後、HSC に着目した包括的遺伝子解析を導入し、さらに加齢に関連する新たな肝再生制御因子を同定する必要がある。

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 21 件)

1. Saito Y, Morino Y, Shimada M. Mechanism of impairment on liver regeneration in elderly patients: Role of hepatic stellate cell function. doi: 10.1111/hepr.12872. *Hepato Res.* 2017;47(6):505-513. 査読有
2. Davaadorji M, Shimada M 他 8 名 10 番目. Loss of Secreted Frizzled-Related Protein-1 expression is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. doi:10.1016/j.ejso.2016.11.017. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(2):344-350. 査読有
3. Ikemoto T, Shimada M, Yamada S. Pathophysiology of recurrent hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. doi: 10.1111/hepr.12705. *Hepato Res.* 2017;47(1):23-30. 査読有
4. Teraoku H, Shimada M 他 8 名 10 番目. Role of thrombospondin-1 expression in colorectal liver metastasis and its molecular mechanism. doi: 10.1002/jhbp.376. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2016;23(9):565-573. 査読有
5. Yada K, Shimada M 他 6 名 8 番目. The Kampo medicine "Daikenchuto (TU-100)" prevents bacterial translocation and hepatic fibrosis in a rat model of biliary atresia. doi: 10.1016/j.surg.2016.02.002. *Surgery.* 2016;159(6):1600-1611. 査読有
6. Iwahashi S, Shimada M 他 7 名 2 番目. pithelial-mesenchymal transition-related genes are linked to aggressive local recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.041. *Cancer Lett.* 2016;375(1):47-50. 査読有
7. Yamada S, Shimada M 他 8 名 10 番目. Liver regeneration after splenectomy in patients with liver cirrhosis. doi: 10.1111/hepr.12573. *Hepato Res.* 2016;46(5):443-449. 査読有
8. Wubetu GY, Shimada M 他 8 名 2 番目. Epigallocatechin gallate hinders human

- hepatoma and colon cancer sphere formation. doi: 10.1111/jgh.13069. J Gastroenterol Hepatol. 2016;31(1):256-264. 査読有
9. Zhu C, **Shimada M**. 他 8 名 10 番目. KISS1 Associates with Better Outcome via Inhibiting Matrix Metalloproteinase-9 in Colorectal Liver Metastasis. doi: 10.1245/s10434-015-4891-7. Ann Surg Oncol. 2015;22 Suppl 3:S1516-1523. 査読有
 10. Enkhbold C, **Shimada M**. 他 8 名 10 番目. Dysfunction of liver regeneration in aged liver after partial hepatectomy. doi: 10.1111/jgh.12930. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(7):1217-1224. 査読有
 11. Kashihara H, **Shimada M**. 他 7 名 2 番目. Duodenal-jejunal bypass improves diabetes and liver steatosis via enhanced glucagon-like peptide-1 elicited by bile acids. doi: 10.1111/jgh.12690. J Gastroenterol Hepatol. 2015;30(2):308-315. 査読有
 12. Saito Y, **Shimada M**. 他 10 名 2 番目. Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. doi: 10.1002/jhbp.147. J Hepatobiliary Pancreat Sci. 2014;21(12):873-880. 査読有
 13. Zhu C, **Shimada M**. 他 9 名 11 番目. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is associated with poor prognosis via activation of c-MET in hepatocellular carcinoma. doi: 10.1245/s10434-014-3874-4. Ann Surg Oncol. 2014;21 Suppl 4:S729-735. 査読有
 14. Wubetu GY, **Shimada M**. 他 12 名 14 番目. High STAT4 expression is a better prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. doi: 10.1245/s10434-014-3861-9. Ann Surg Oncol. 2014;21 Suppl 4:S721-728. 査読有
 15. Utsunomiya T, **Shimada M**, Morine Y, Tajima A, Imoto I. Specific molecular signatures of non-tumor liver tissue may predict a risk of hepatocarcinogenesis. doi: 10.1111/cas.12431. Cancer Sci. 2014;105(7):749-754. 査読有
 16. Arakawa Y, **Shimada M**. 他 9 名 2 番目. Gene profile in the spleen under massive partial hepatectomy using complementary DNA microarray and pathway analysis. doi: 10.1111/jgh.12573. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29(8):1645-1653. 査読有
 17. Enkhbold C, **Shimada M**. 他 9 名 11 番目. Loss of FBXW7 expression is associated with poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma. doi: 10.1111/hepr.12314. Hepatol Res. 2014;44(14):E346-352. 査読有
 18. Asanoma M, **Shimada M**. 他 8 名 10 番目. Cytokine expression in spleen affects progression of liver cirrhosis through liver-spleen cross-talk. doi: 10.1111/hepr.12267. Hepatol Res. 2014;44(12):1217-1223. 査読有
 19. Nii A, Utsunomiya T, **Shimada M**. 他 7 名 2 番目. Hydrolyzed whey peptide-based diet ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat nonalcoholic fatty liver. doi: 10.1007/s00595-014-0853-0. Surg Today. 2014;44(12):2354-2360. 査読有
 20. Zhu C, **Shimada M**. 他 8 名 10 番目. Senescence-related genes possibly responsible for poor liver regeneration after hepatectomy in elderly patients. doi: 10.1111/jgh.12468. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29(5):1102-1108. 査読有
 21. Yamada S, **Shimada M**. 他 9 名 2 番目. CXC receptor 4 and stromal cell-derived factor 1 in primary tumors and liver metastases of colorectal cancer. doi: 10.1016/j.jss.2013.10.030. J Surg Res. 2014;187(1):107-112. 査読有
- [学会発表](計 10 件)
1. Yamada S, **Shimada M**. 他 8 名 2 番目. High NEK2 expression in hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy. **The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2016)** 2016 年 2 月 20 日-24 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
 2. Yoshikawa M, Morine Y, **Shimada M**. 他 7 名 3 番目. Elevated preoperative serum CEA levels in patients with HCC is associated with prognosis and EMT. **The 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2016)** 2016 年 2 月 20 日-24 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
 3. Morine Y. Treatment strategy for intrahepatic cholangiocarcinoma: From optimal surgical management to adjuvant therapy. **American Society of Clinical Oncology 2016 Gastrointestinal Cancer Symposium (ASCO-GI 2016)** 2016 年 1 月 21 日-23 日 Moscone Convention Center(USA, San Francisco)
 4. Yamada S. Recurrent feature after radiofrequency ablation therapy for hepatocellular carcinoma: Risk of increasing malignant behavior. **American Society of Clinical Oncology 2016**

- Gastrointestinal Cancer Symposium (ASCO-GI 2016)** 2016年1月21日-23日 Moscone Convention Center(USA, San Francisco)
5. Ikemoto T. Japanese Kampo medicine TJ-114 prevents autoimmune diabetes onsets in nod mice through CD4+CD49B+regulatory T cells. **European Society for Organ Transplantation (ESOT2015)** 2015年9月13日-16日 The square brussels meeting centre(Belgium, brussels)
6. Imura S. Shimada M. 他6名2番目 Rational hepatic anatomical resection based on a hybrid concept of the territory of portal vein and hepatic vein. **The Asian-Pacific Hepato- Pancreato-Biliary Association 2015 (A-PPBA 2015)** 2015年3月18日-21日 Suntec Singapore Convention & Exhibition Centre(Singapore, Singapore)
7. Shimada M. 他11名1番目. Impact of FOLFOXIRI regimen on early "Conversion" and long-term outcome in patients with initially unresectable colorectal liver metastases. **American Society of Clinical Oncology 2015 Gastrointestinal Cancer Symposium (ASCO-GI 2015)** 2015年1月15日-17日 Moscone Convention Center(USA, San Francisco)
8. Imura S. Shimada M. 他8名2番目 Long-term survivors after sorafenib therapy in unresectable hepatocellular carcinoma. **American Society of Clinical Oncology 2015 Gastrointestinal Cancer Symposium (ASCO-GI 2015)** 2015年1月15日-17日 Moscone Convention Center(USA, San Francisco)
9. Yoshimoto T, Shimada M. 他9名11番目. Impact of STAT4 expression on cellular immunity and prognosis in hepatocellular carcinoma. **American Society of Clinical Oncology 2015 Gastrointestinal Cancer Symposium (ASCO-GI 2015)** 2015年1月15日-17日 Moscone Convention Center(USA, San Francisco)
10. Arakawa Y. Shimada M. 他8名2番目. The impact of endoplasmic reticulum stress in non-tumor tissue on recurrence of HCC. **American College of Surgeons Clinical Congress 2014 (ACS 2014)** 2014年10月26日-30日 Moscone Convention Center(USA, San Francisco)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田光生 (SHIMADA, Mitsuo)
 徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・教授

研究者番号：10216070

(2) 研究分担者

安友 康二 (YASUTOMO, Koji)
 徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・教授
 研究者番号：30333511

田中 真二 (TANAKA, Shinji)
 東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
 研究者番号：30253420

片桐 豊雅 (KATAGIRI, Toyomasa)
 徳島大学・先端酵素学研究所・教授
 研究者番号：20398019

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)
 徳島大学・先端酵素学研究所・教授
 研究者番号：20398019

森根 裕二 (MORINE, Yuji)
 徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・准教授
 研究者番号：60398021

居村 暁 (IMURA, Satoru)
 徳島大学・大学病院・特任教授
 研究者番号：90380021

池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)
 徳島大学・大学病院・特任准教授
 研究者番号：20398019

濱田 康弘 (HAMADA, Yasuhiro)
 徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・教授
 研究者番号：00144973

岩橋 衆一 (IWAHASHI, Shuichi)
 徳島大学・大学病院・特任助教
 研究者番号：30531751

荒川 悠佑 (ARAKAWA, Yusuke)
 徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・徳島大学特別研究員
 研究者番号：00448325