

記念講演

記念講演

肝類洞壁細胞と肝を取り巻く諸臓器

谷川久一

久留米大学名誉教授（肝類洞壁細胞研究会 前代表世話人）

肝臓を取り巻く諸臓器から、門脈や肝動脈を介して、諸々の物質が肝に流入する。腸管からは、エンドトキシンが流入し、Kupffer 細胞などに働いて、TNF α などの炎症性サイトカインを産生せしめ、アルコール性肝炎や NASH の進展に深く関わっている。これら疾患におけるエンドトキシンの腸管からの吸収増加のメカニズムの解明や、これに対応する治療が急務である。

脾臓に関しては、なぜ同臓器からの血流がまず肝臓領域に流入しているのかという命題に関しては未だ明らかでないが、肝硬変にみられる脾腫の類洞壁細胞に及ぼす影響や、近年摘脾が頻度多く行われていることから、摘脾の類洞細胞に及ぼす影響など興味深い。

膵臓から流出するインシュリンは門脈を介して、まず肝細胞に作用するが、それに内臓脂肪組織からの FFA をはじめ諸々のサイトカインが門脈を介して、肝細胞に作用して、インシュリン抵抗性の発生に関わるが、これに類洞壁細胞の関与はどうかという問題がある。

肝疾患の中で、門脈が深く関わるのは、門脈圧亢進状態で、肝の線維化とそれにとまなう類洞の capillarization などにもこれに関与するが、同亢進状態における hyperdynamic circulation の発生機序が明らかでない。この解明が最も重要であろう。

肝に流入する血液は、門脈と共に肝動脈からのものがあり、臨床的には体内では肺臓と共に肝臓がもっとも頻度の高い癌転移の臓器であるが、この肝転移形成の過程で肝類洞壁細胞、ことに肝星細胞が深く関与している可能性が高い。また、肝より流出するものに、肝静脈からの血流と共に胆汁、肝リンパがある。

私共は、胆汁中にエンドトキシンが高濃度に出現することを明らかにしているが、腸管の炎症性疾患を多く合併する原発性硬化性胆管炎（PSC）は、肝移植後、再発が殆どの症例にみられるのは、腸管からの関与が存在しているからであろう。

肝リンパは門脈圧亢進時に増加し、拡大した Disse 腔より門脈域に開口するリンパ管を経て、平時の 10 倍以上のリンパが肝門部から胸管に排出されるが、腹水の発生と深く関わることが知られている。

このように肝をとりまく諸臓器は、諸々の形で肝類洞壁細胞に影響を与え、肝疾患の病態に深く関わっていることは明らかである。

ランチョンセミナー

Genetic lineage tracing を用いた肝・膵・腸管形成と臓器維持機構の解明

川口義弥

京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 臓器形成誘導分野

実験手法の進歩が Science 推進の原動力であることに間違いはない。例えば、ES 細胞の開発と遺伝子ターゲティングを組み合わせたノックアウトマウスの作成技術は、目的遺伝子の機能を探る上で、発生学を含めた広い分野において飛躍的な情報をもたらした。Cre/loxP を用いた genetic lineage tracing は、注目した細胞種の運命を in vivo で辿るのに極めて有用な手法である。

我々は以前に、本法と遺伝子ノックアウトの組み合わせ等によって転写因子 *ptfla* が発生過程において原始腸管から膵への運命決定に重要な役割を担っていることを示し、単純な遺伝子ノックアウトマウス解析のみからは到達できない結論を導いた。また、Tamoxifen-inducible Cre/loxP による lineage tracing を用いて、成体肝臓・膵外分泌組織および腸管が胆管・膵管・腸管陰窩に連続した樹状構造を形成する Sox9 陽性領域から持続的な細胞供給を受けて生理的に維持されていることを示した。様々な肝障害を加えた後の再生過程においては、障害の種類によって Sox9 陽性細胞からの新規細胞分化が促進されるケースと、そうでないケースとが認められ、肝再生現象における複数の機構（既存細胞の自己複製、Sox9 陽性肝前駆細胞とそれ以外の前駆細胞からの新規肝細胞分化）が存在する事が示された。更に、胎生期肝臓形成は Sox9 陰性肝芽細胞から始まり、発生中期の肝内胆管構造形成期を境として肝細胞の供給源が次第に Sox9 陽性細胞へと変化してゆくこと、胎生期膵 Sox9 陽性細胞はすべての細胞種へと分化可能であるが、出生 1 週間頃の膵島形成期に内分泌細胞への分化能を喪失することが分かった。すなわち、臓器構築と機能・幹前駆細胞システムには密接な関連があることが伺われる。

本セミナーでは、上記実験を含めた genetic lineage tracing の応用例を示しつつ、この手法の有用性とその pitfall も含めてお話ししたい。

一般演題

セッション I - 1

1.

肝臓星細胞のビタミンA脂質滴

吉川 究、目崎喜弘、山口典子、森井真也子、三浦光隆、今井克幸、
妹尾春樹

秋田大学大学院医学系研究科細胞生物学講座

【背景・目的】 肝臓星細胞はビタミンAをレチニルエステルとして脂質滴に貯蔵する（A脂質滴）。我々は、A脂質滴には perilipin2/ADRP、perilipin3/TIP47（脂肪細胞等に存在する一般的な脂質滴形成への関与が知られている）が局在することを本研究会にて報告してきた。ADRP と異なり TIP47 は必ずしも常にA脂質滴に局在するわけではなかった。本研究ではA脂質滴形成過程におけるTIP47 の局在を種々の条件で検討した。

【方法】 ビタミンA（レチニルエステル）をラットに経口投与することにより星細胞におけるA脂質滴の形成を促し、ADRP、TIP47 の局在を免疫蛍光染色により観察した。また、ラット肝より星細胞を単離・培養し活性化させた。これにビタミンA（レチノール）を添加しADRP、TIP47 の局在を観察した。

【結果・考察】 ビタミンA経口投与 24 時間後にはA脂質滴に局在する TIP47 が観察されたが、無投与（対照）、投与 7 日後のラットではA脂質滴には局在せず細胞質に分布した。TIP47 はA脂質滴の形成時に一時的に局在するが、形成がある程度進むと解離すると考えられる。

一方、ラット肝より単離・培養した星細胞（対照ラットより単離）では、活性化にともないA脂質滴に局在する TIP47 が観察された。ビタミンA添加により活性化星細胞に形成されたA脂質滴には、添加 24 時間後、7 日後ともに TIP47 が局在した。活性化星細胞では、静止状態の星細胞とは異なり、長期に渡りA脂質滴に TIP47 が局在しその形成・維持に関与するようになると考えられる。

ADRP は上記すべての条件でA脂質滴に局在したことから、恒常的にその動態に関与すると考えられる。

セッション I - 2

2.

Cytoglobin は肝星細胞を肝筋線維芽細胞と区別するマーカーになり得る

元山宏行¹、小宮 透²、吉里勝利^{1,3}、河田則文¹

¹ 大阪市立大学肝胆膵病態内科学、² 大阪市立大学理学部動物機能生物学的研究室、

³ 株式会社フェニックスバイオ

【目的】 Cytoglobin (Cygb) はラット肝星細胞から発見された哺乳類第 4 番目の globin であるが (J Biol Chem, 2001)、ヒト肝組織における発現に関する報告はない。本研究ではヒト線維化肝における Cygb 発現について検討した。

【方法】 ヒト Cygb に対するモノクローン抗体を新規作製。当科で肝生検した C 型慢性肝炎患者 [年齢 59.4 ± 9.3、ALT 70.3 (25, 115.2)、ALB 3.85 ± 0.3、PLT 12.3 ± 4.5] の組織 [F 因子 (F1/2/3/4 : 各 10 症例)] を用い、HE、Sirius red と免疫染色 [Cygb、cellular retinol binding protein-1 (CRBP-1)、 α -smooth muscle actin (α SMA)、Thy-1 (THYmocyte differentiation antigen 1)] を施行。マウス肝から星細胞を分離・培養し、蛍光免疫染色と免疫ブロットを行った。

【成績】 免疫ブロットにて抗ヒト Cygb 抗体は 21kDa の Cygb を特異的に検出した。ヒト正常肝組織の免疫染色で、Cygb は傍類洞の脂肪貯蔵細胞に存在し、蛍光二重染色で CRBP-1 と重なった。門脈域の α SMA⁺ 細胞の少数は Cygb⁺CRBP-1⁺ であった。生検組織の陽性面積率は α SMA; F1: 2.04, F2: 2.64, F3: 4.75, F4: 5.43 (%)、Sirius red; F1: 3.56, F2: 3.93, F3: 7.73, F4: 8.91 (%) と F 因子と伴に上昇した。ヒト肝硬変では、Cygb⁺CRBP-1⁺ 細胞は偽小葉内に認めたが、線維性隔壁部では減少し、大多数は Cygb⁻ α SMA⁺Thy-1⁺ 細胞であった。一方、マウス肝より分離培養した星細胞では、Cygb は培養 1 日目から核周囲の細胞質に観察された。 α SMA は培養 1 日目に観察されなかったが、4 日目より細胞辺縁部に観察された。また Thy-1 は培養 1 日目、7 日目においても観察されなかった。タンパク発現においても Cygb は 7 日目でも発現しているが α SMA は 4 日目より発現し、Thy-1 は 7 日目でも発現を認めなかった。

【考察】 肝星細胞は Cygb⁺であり、活性化すると Cygb⁺ α SMA⁺Thy-1⁻となる。ヒト肝硬変組織における線維性隔壁部に Cygb⁻ α SMA⁺Thy-1⁺細胞が存在し、星細胞とは性質が異なる。

3.

動物園飼育ホッキョクグマ肝臓にみられた細胞周囲線維化

妹尾春樹¹、吉川 究¹、三浦光隆¹、今井克幸¹、森井真也子¹、目崎喜弘¹、
岡橋 要²、福井大祐³、藤原睦憲⁴

¹ 秋田大学大学院医学系研究科細胞生物学講座、²京都市動物園、³旭川市旭山動物園、⁴日赤医療センター臨床病理部

【目的】肝臓（星細胞）に貯蔵されているビタミンAの量と肝臓の線維化との関係は、ビタミンAが肝臓の線維化に促進的なのか、あるいは抑制的なのかは、器官・細胞・分子・遺伝子発現などいずれのレベルでも結論が出ていない。

ホッキョクグマなど北極圏の食物網の上位に位置する動物では肝臓星細胞に大量のビタミンAが貯蔵されているが線維化が進展している所見はない。そこで管理された食餌を摂取している、動物園で飼育されているホッキョクグマの肝臓を調べた。

【方法】肝臓のビタミンAの定量を高速液クロでおこない、種々の形態学的手法で解析した。

【結果】管理された食餌を摂取している、動物園で飼育されているホッキョクグマA(2009年5月22日に、34歳5ヶ月で死去、飼育期間は33年6ヶ月、食餌中ビタミンAは2,340IU/day)では肝臓のレチニルエステルの濃度は536nmol/g wet weightであり、他の1頭B(2010年7月24日に34歳で死去、飼育期間は23年、食餌中ビタミンAは33,900-54,200IU/day)では28,000nmol/g wet weightであった。いっぽうグリーンランドで捕獲したホッキョクグマ(4匹)では18,000-48,000nmol/g wet weightであった。Aの肝臓には明瞭な細胞周囲線維化(pericellular fibrosis)が観察され、いっぽう、Bの肝臓には異常所見は見られなかった。グリーンランドで捕獲したホッキョクグマ肝臓にも異常な所見は観察されなかった。

【結論】以上の所見はホッキョクグマの肝臓で星細胞に貯蔵されているビタミンAの量は肝臓の線維化に抑制的に機能することを示唆している。

4.

レニンの肝星細胞および血管内皮細胞に対する直接作用

相原洋祐、吉治仁志、池中英、野口隆一、鍛冶孝祐、堂原彰敏、福井 博
奈良県立医科大学第3内科（消化器・内分泌代謝内科）

【目的】我々はこれまでにレニンアンジオテンシン系（RAS）の産物であるアンジオテンシン II（AT-II）が、活性化肝星細胞（Ac-HSC）や血管内皮細胞（EC）に作用し、肝線維化および肝癌進展過程に重要な役割を果たしていることを報告してきた。近年の研究より、RAS において AT-II の上流に位置する rate limiting enzyme のレニンが心や腎における線維化進展に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。しかし、レニンの肝線維化などにおける役割に関しては未だ報告がない。今回我々は最近臨床で使用可能となった直接的レニン阻害薬（DRI: Aliskiren）を用いて Ac-HSC と EC に対するレニンおよび DRI の効果について検討した。

【方法】 (1) レニンによる Ac-HSC 増殖に及ぼす影響を MTT 法にて経時的に検討すると共に、DRI の効果について検討した。 (2) レニンによる Ac-HSC の pro-collagen-I、TGF- β 発現に及ぼす影響について real-time PCR にて検討すると共に、DRI の抑制効果につき同様に比較検討した。 (3) レニンによる EC 増殖に及ぼす影響を MTT 法にて経時的に検討すると共に、DRI の効果について検討した。

【結果】 (1) レニンは用量および時間依存性に Ac-HSC の増殖を促進した。その効果は 0.01 μM で最大となり、処理 24 時間後でピークに達した。しかし、DRI は 100 μM の高用量で前処置してもレニンによる増殖抑制を示さなかった。

(2) レニンは 0.01 μM 、処理 24 時間後で Ac-HSC における pro-collagen-I、TGF- β 発現を有意に増加させたが、DRI は 1 μM から 100 μM のいずれの用量で前処置してもこれらの発現を抑制しなかった。

(3) レニンは 0.01 μM 、処理 24 時間後で EC の増殖を促進したが、DRI は増殖抑制を示さなかった。

【結論】 レニンが AT-II と同様に Ac-HSC および EC に対して直接的作用を有することが明らかとなった。一方、AT-II と異なりレニンと DRI の作用はレニン受容体における ligand-receptor 関係では説明できず、より複雑な制御機構の存在が示唆された。

5.

肝類洞内皮細胞による肝星細胞活性化の促進

江田諭司^{1,2}、李殷瑞^{1,2}、原 詳子¹、桐田暁子¹、辰川英樹¹、小嶋聡一^{1,2}

¹理化学研究所・分子リガンド生物研究チーム、²東京医科歯科大学院・生命情報科学教育部・高次生命科学

【目的】近年、肝線維化と血管新生（毛細血管化）が並行して起こることが報告されている。また、血管新生阻害剤が肝星細胞（HSC）の増殖を抑えることも知られている。しかしながら、血管新生と肝線維化の因果関係は未だ不明な点が多い。特に血管新生が HSC の活性化に与える影響は知られていない。そこで、本実験では、肝類洞内皮細胞（LSEC）が HSC 活性化に与える影響を調べた。

【方法】以下のような LSEC と HSC の共培養を行い HSC の活性化に違いがみられるかどうかを調べた。HSC の活性化は α -SMA の免疫染色により評価した。

(1) LSEC から HSC へのパラクライン効果を調べるために、LSEC が過密状態、過疎状態、管腔形成状態のときの条件培地を作製し、HSC に添加後 5 日間培養した。

(2) LSEC から HSC へのジャクスタクライン効果を調べるために、LSEC と HSC を 5 日間共培養した。

【結果】(1) 通常培地で培養した HSC に比べ、LSEC の条件培地を添加した HSC はより強く活性化され、顕著に線維形成が起こっていた。また、過密状態の LSEC の条件培地で培養した HSC が最も活性化されており、次いで管腔形成状態の LSEC の条件培地で培養した HSC が活性化されていた。

(2) LSEC と共培養した HSC では、HSC 単培養に比べ、活性化が亢進され、偽足の形成や形態変化が起こっていたが、線維形成は見られなかった。

【考察】以上の結果より、LSEC から分泌された何らかのサイトカインが HSC の活性化を促進していることが示唆された。さらに、パラクラインとジャクスタクラインとでは HSC の線維形成や形態変化に違いがみられたことから、パラクラインとジャクスタクラインとではサイトカインの種類が違う、もしくはサイトカインの働き方に違いがある可能性があると考えられる。今後、LSEC から放出されるサイトカインを同定するために、種々の阻害剤を用いるとともに、in vivo での実験を行う予定である。

6.

血小板は肝星細胞の活性化を抑制する

池田直哉、野渡剛之、丸山岳人、野崎礼史、大河内信弘
筑波大学大学院人間総合科学研究科消化器外科

【目的】 活性型肝星細胞によって肝線維化は増悪する。静止型肝星細胞では細胞内 cAMP が重要である。有効な肝硬変治療は肝移植に限られるが、トロンボポイエチンによる血小板増加動物モデルでは肝線維化が軽減したことから、血小板が肝星細胞へ抑制的影響を与えたと仮定し、その影響とメカニズムを *in vitro* で検討した

【方法】 ヒト肝星細胞株 TWNT-1 と、手術検体から採取した初代肝星細胞とを用いた。ヒト血小板は健康成人より採取した。血小板を肝星細胞に添加して、i) Western blot で肝星細胞活性化の指標の α -SMA 発現と顕微鏡による細胞形態の観察、ii) BrdU 取り込み試験と Western blot での増殖関連シグナル (Akt, ERK1/2) の検討、iii) リアルタイム PCR で各種遺伝子発現変化の検討、iv) ELISA で I 型コラーゲン分泌量の検討、v) 肝星細胞活性化抑制候補物質の検索、vi) 肝星細胞活性化抑制物質の血小板中濃度測定、vii) 活性化抑制候補物質を添加しての α -SMA 発現とそのシグナル伝達の解析を行った。

【結果】 i) α -SMA 発現は抑制され、活性化状態の低い類円形細胞が増加した。ii) BrdU 取り込み、および増殖関連シグナルに変化は認めなかった。iii) ACTA2、COL1A1 は低下し、MMP-1、TIMP-1 は増加した。iv) I 型コラーゲン分泌は低下した。v) 血小板中の ATP 分解酵素による分解産物が ACTA2 をより低下させた。vi) 血小板中に高濃度アデニンヌクレオチドが存在した。vii) ATP、アデノシン、血小板は初代培養細胞の α -SMA 発現を抑制した。肝星細胞は ATP を分解しアデノシンを生じ、アデノシンは肝星細胞 cAMP を上昇させた。

【結論】 血小板は ATP などのアデニンヌクレオチドを放出し、それが肝星細胞によってアデノシンに分解されることで、肝星細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、肝星細胞の活性化を抑制し、I 型コラーゲン産生を低下させていると考えられた。臨床における血小板増加療法は、肝線維化治療法の選択肢の一つになり得ると考えられた。

7.

肝障害と肝線維化における NOX1/NADPH oxidase の役割

崔 文浩^{1, 2}、松野邦晴¹、矢部千尋¹

¹京都府立医科大学大学院医学研究科 病態分子薬理学

²大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学

【目的】肝臓の線維化には活性酸素種（ROS）が重要な役割を担っており、その産生源として NADPH オキシダーゼが最近注目されている。肝星細胞の活性化に伴い NADPH オキシダーゼの新たなホモログである NOX1 の発現が上昇することが報告されたが、NOX1 の分子機能については未だに十分な知見が得られていない。本研究では NOX1 に由来する ROS と肝臓の線維化について検討をおこなった。

【方法】8 週齢の野生型と Nox1 遺伝子欠損マウスを用いて胆管結紮（Bile Duct Ligation: BDL）により肝線維症モデルを作製した。線維化に関する遺伝子の発現を real-time PCR により検討した。蛋白質の発現は Western Blot 法、免疫染色法により検討した。初代培養星細胞についても検討を行った。

【結果】胆管結紮群で誘導される Collagen 1 α 1 mRNA とハイドロキシプロリン量の増加は NOX1 欠損マウスにおいて有意に抑制された。NOX1 欠損マウスでは α -smooth muscle actin の免疫染色、シリウスレッド染色において肝線維化の有意な減少が認められた。肝星細胞の初代培養系において、NOX1 欠損群では細胞増殖の有意な減少が見られた。NOX1 欠損マウスより単離した肝星細胞において細胞周期抑制因子である p27^{kip1} の有意な発現の増加が mRNA および蛋白質レベルで確認された。解析の結果 NOX1 欠損マウス由来の肝星細胞では p27^{kip1} の遺伝子発現調節因子である p-Akt 及びその下流である p-FOXO4 の発現が有意に抑制された。さらに、PI3K/Akt 経路のネガティブ調節因子である PTEN の活性化が NOX1 欠損マウス由来の肝星細胞で確認された。

【結論】NOX1 由来の ROS は PTEN を不活性化し、Akt/FOXO4/p27^{kip1} 経路を介して肝星細胞の増殖を促進し、肝線維化の進展に重要な役割を担っていると考えられた。

セッションⅡ－2

8.

クッパー細胞におけるオートファジー誘導とエンドトキシン感受性

山科俊平、深田浩大、福生有華、泉 光輔、内山 明、今 一義、鈴木聡子、
池嶋健一、渡辺純夫
順天堂大学消化器内科

【目的】 オートファジーは変性蛋白除去や細胞内小器官リサイクルを介し細胞内の恒常性を維持する上で重要な役割を果たしているが、近年、発癌やクローン病など多くの病態に関与することが報告され注目されてきている。クッパー細胞のオートファジー発現とエンドトキシン感受性変化について検討を行った。

【方法】 雄性8週齢 C57B6J マウスに普通食と高脂肪食を8週間与えた群を作成し、それぞれから単離したクッパー細胞の p62 発現と LPS 100ng/ml 添加後の LC3 蛋白発現をウエスタンブロットにて評価した。コントロールマウス (Atg7F/F) と肝特異的オートファジー欠損マウス (Atg7F/F:Mx1-Cre) より単離したクッパー細胞に LPS 100ng/ml を添加し、培養上清中の TNF α 濃度を ELISA 法にて評価した。IKK α β 、p38 活性化をウエスタンブロット法にて評価した。

【結果】 普通食群より単離したクッパー細胞では LPS 添加後に LC3-II 発現が増加したが高脂肪食群の単離クッパー細胞では認められなかった。ob/ob 高脂肪食群からの単離クッパー細胞では普通食群と比較し p62 蛋白発現が増加していた。肝特異的オートファジー欠損マウスより単離したクッパー細胞では LPS 添加後の LC3-II 発現はほとんど認められなかったが、p38 と IKK 活性化と TNF α 産生がコントロールクッパー細胞と比較し増加した。SB203580 添加により LPS による TNF α 産生がコントロールクッパー細胞、オートファジー欠損クッパー細胞ともに抑制された。

【結論】 オートファジー欠損によってクッパー細胞のエンドトキシン感受性が亢進した。脂肪肝におけるクッパー細胞のオートファジー誘導抑制はエンドトキシン感受性亢進に関与している可能性が示唆された。

9.

肝類洞壁細胞の役割を中心に据えた NASH 発症のメカニズム

三浦光一、大西洋英

秋田大学医学部消化器内科

【目的】 NASH は肝細胞に脂肪が蓄積された後に、酸化ストレスなどの 2nd hit が加わることで NASH へ進展する two hits theory が広く浸透している。しかし、two hits theory で NASH 発症のすべてを説明するのも困難である。我々は、Kupffer 細胞などの肝類洞壁細胞が脂肪肝に先行して、まず活性化され、そこから産生される mediator が肝細胞の脂肪蓄積や肝細胞障害を引き起こす可能性について考えている。そこで我々は、肝類洞壁細胞の役割を中心に据えた案を NASH 発症の一つのメカニズムとして提案したい。

【方法】 まず肝類洞壁細胞のうち、Kupffer 細胞および浸潤マクロファージ、さらにそれら細胞に発現する TLR2 および CCR2 にフォーカスを当てた。次に、以下のマウスモデルにコリン欠乏食を投与し、NASH を評価した。1) clodronate 投与による Kupffer 細胞除去マウス、2) TLR2KO マウスおよび骨髄移植によるキメラマウス (Kupffer 細胞の TLR2 を選択的に欠損させた状態)、3) ケモカイン MCP-1 の受容体である CCR2 の欠損マウス。

【結果】 WT マウスにコリン欠乏食 2 週間投与したところ、肝に炎症性細胞の浸潤と中等度脂肪肝を認めた。clodronate 投与で肝臓の F4/80 陽性細胞を消失させた後、コリン欠乏食を 2 週投与した群では、炎症細胞浸潤および脂肪肝が軽減した。TLR2KO マウスへのコリン欠乏食 22 週投与では著明な脂肪肝は認めるものの、炎症細胞浸潤および肝線維化が抑制された。キメラマウスによる検討では Kupffer 細胞の TLR2 が選択的に欠損することで、炎症細胞浸潤や線維化は抑制された。CCR2KO マウスでは炎症細胞浸潤、肝線維化、脂肪肝が抑制された。これらマウスモデルに共通することは炎症性サイトカインの抑制であり、さらなる vitro の検討で、IL- β は肝細胞に対し脂肪蓄積や障害作用を有した。

【結語】 マクロファージの活性をあらかじめ抑制することで、NASH の発症や進展は軽減できることから、肝類洞壁細胞、特に Kupffer 細胞は NASH 発症で中心的役割を果たす一つの細胞と考えられた。

セッションⅡ－４

10.

NASH モデルマウス肝 PSGL-1 発現に対する水素水の効果の検討

河合大介¹、高木章乃夫¹、 四方賢一²、佐藤千景³、山本和秀¹

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓内科学、²同新医療研究開発センター、³同 糖尿病性腎症治療学講座

【目的】組織炎症反応は白血球のローリングにより始まる。この時に、重要な働きを持つ機序として白血球上の接着分子PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) と、炎症組織の血管内皮細胞上に発現するP-セレクトインとの結合が報告されている。NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) はNAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease) の重篤な一型であり、脂肪肝の存在とともに炎症細胞の浸潤と線維化の進行を認めるものと定義されており、PSGL-1の発現亢進が認められる。最近、抗酸化物質としての水素分子が肝毒性のあるROS (reactive oxygen species) の産生を抑制することが報告されている。我々はこれまでに水素水を用いてNASHの病態を改善することを報告してきた。今回我々はNASHモデルマウス肝臓PSGL-1発現に対する、水素水の効果を検討した。

【方法】NASHモデルとしてメチオニン・コリン欠乏食 (MCD食) マウスを使用した。8週齢のC57BL/6マウスを3群に分け、以下のように餌を与えた：(1) MCD食+通常水 (CW群) (2) MCD食 + 水素水 (HW群) (3) 0.01% のピオグリタゾンを含むMCD食+通常水 (PGZ群)。8週間後に肝臓を摘出し組織像を比較した。また肝臓からRNAを抽出し、肝内の炎症、アポトーシスの指標であるTNF α 、IL-6およびPSGL-1遺伝子発現をリアルタイムPCR方にて測定した。GAPDHを相対定量のリファレンス遺伝子に用いた。

【結果】組織学的にHW群とPGZ群ではCW群と比較して炎症、線維化の程度が軽減していた。TNF α 、IL-6、PSGL-1発現もまたHW群とPGZ群ではCW群と比較して低値であった。

【結論】水素水は肝内においてPSGL-1の誘導を抑制しNASHにおける炎症を抑制し病態を改善している可能性が示唆される。

セッションⅡ－５

１１．

NASH 病態進展におけるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の役割

野口隆一、吉治仁志、鍛冶孝祐、相原洋佑、守屋 圭、堂原彰敏、福井 博
奈良県立医科大学第３内科（消化器・内分泌代謝内科）

【目的】我々はこれまでに、ACE 阻害薬（ACE-I）および選択的アルドステロン（Ald）阻害薬（SAB）が活性化肝星細胞（Ac-HSC）と共に血管内皮細胞（EC）に作用して肝線維化抑制効果を示すことを報告してきた。今回は、コリン欠乏アミノ酸（CDAA）食投与ラット NASH モデルを用いて、NASH 肝線維化進展および肝発癌に対する ACE-I と SAB の併用効果について検討すると共に、作用機序について各種検討を加えた。

【方法】CDAA 食投与 NASH ラットを ACE-I 投与群、SAB 投与群、両者（ACE-I+SAB）併用群、非投与群の４群に分け、肝線維化および GST-P 陽性前癌病変に対するこれら薬物の効果につき検討した。肝線維化に関しては、 α -SMA を指標とした活性化肝星細胞（Ac-HSC）の免疫組織染色および肝内 TGF- β 量について解析を加えた。前癌病変については肝発癌に重要とされる血管新生に注目し、CD31 発現を指標として免疫組織染色で検討すると共に、主要な血管新生因子である VEGF 蛋白発現を ELISA にて検討した。さらに、肝内アンジオテンシン II（AT-II）、Ald 発現レベルについて RIA 法にて解析を加えた。*In vitro* 実験系では、Ac-HSC および EC に対する AT-II 受容体阻害薬（ARB）、SAB の効果について検討した。

【成績】ACE-I 投与群および SAB 投与群では対照群に比し肝線維化および GST-P 前癌病変が有意に抑制されていたが、両者併用群ではより強い抑制効果が認められた。さらに、両薬剤投与により Ac-HSC 数、TGF- β 量および CD31、VEGF 発現は、線維化、前癌病変の抑制とほぼ平行するように抑制されていた。肝組織内における AT-II および Ald 発現は ACE-I 投与群では減少していたのに対し、SAB 投与群では逆に増加していた。SAB による AT-II 発現増加は ACE-I を併用することでほぼ消失した。*In vitro* での検討において、AT-II や Ald 刺激により促進された Ac-HSC の増殖や EC の管腔形成は ARB、SAB 存在下で抑制され、両者共存下ではさらに強く抑制された。

【結論】NASH 病態進展において AT-II、Ald は共に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。ACE-I と SAB はラット NASH における肝線維化と発癌を抑制し、両者の併用は薬剤単独に比してさらなる抑制効果を示した。臨床的に投与可能な両薬剤の併用は NASH 治療に新たな可能性を開くと考えられた。

セッションⅡ－6

12.

Rho キナーゼ阻害剤は脂肪肝虚血再灌流障害を軽減する

黒田慎太郎、田代裕尊、五十嵐友香、楠部潤子、御厨美洋、小林 剛、
天野尋暢、田沢宏文、安部智之、田中由香、大段秀樹
広島大学大学院先進医療開発科学講座外科学

【目的】 脂肪肝に対する大量肝切除や、脂肪肝をグラフトに用いた生体肝移植では、肝虚血再灌流障害による術後合併症や Primary Nonfunction が課題である。肝虚血再灌流障害の一因は肝小葉の微小循環障害であり、血流を調節する肝星細胞との関連が示されているが、脂肪肝においてその機序は明確にされていない。今回われわれは、ラット脂肪肝における星細胞と Rho キナーゼの関連を調べ、肝虚血再灌流障害の予防法を明らかにした。

【方法】 コリン欠乏食を投与し作成した脂肪肝モデル (FL 群) を以下の実験に用い、普通食を投与したラット (NL 群) と比較した。また、両群の肝より肝星細胞を分離し in vitro の実験に用いた。

【結果】 肝星細胞のファロイジン染色では、FL 群において F-アクチンの重合が亢進しており、Rho キナーゼ阻害剤である fasudil により抑制された。ウェスタンブロットでは、ミオシン軽鎖ならびにコフィリンのリン酸化が、エンドセリン 1 (ET-1) で亢進され、fasudil で抑制された ($P<0.05$)。コラーゲングルコントラクションアッセイでは、NL 群より FL 群において収縮率が有意に高く、その効果は ET-1 で亢進され、fasudil で抑制された ($P<0.01$)。肝虚血再灌流後のラットの肝灌流圧の上昇は NL 群より FL 群において有意に高く、その効果は ET-1 で亢進され、fasudil で抑制された ($P<0.01$)。またこれらの結果は、NO 合成酵素阻害剤 L-NAME の存在に fasudil の効果は抑制されなかった。ラット虚血再灌流 1 日後の生存率は、FL 群で有意に低く、fasudil 投与で改善された ($P<0.05$)。

【結論】 脂肪肝における肝虚血再灌流障害の一因として、Rho/Rho キナーゼ系を介した肝星細胞の活性化が関与しており、Rho キナーゼ阻害剤で予防できることが示唆された。

13.

Theaflavin は脂肪肝モデルにおける阻血再灌流障害を軽減する

羅 小雨^{1, 2}、高原照美³、Jiangang Hou¹、河合健吾³、杉山敏郎³、塚田一博²、竹元万壽美⁴、竹内征夫⁵、李 小康¹

¹成育医療センター、²富山大学医学部第二外科、³同第三内科、⁴奥羽大学薬品製造化学、⁵日本老化制御研究所

【目的】近年、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）が増加しており、NAFLD 患者が肝移植や肝切除を受ける機会が増えている。しかし、術後の阻血再灌流障害が問題となっており、その機序として酸化ストレスが関与していることが報告されている。本研究では、抗酸化作用を示すポリフェノール Theaflavin が阻血再灌流障害を改善するか、その有効性を検討した。

【方法】Theaflavin (TF)は紅茶から抽出した。脂肪肝モデルはマウスにメチオニン・コリン欠乏高脂肪食（MCDHF 食）を2週間投与して作製し、門脈を15分間阻血しその後3時間再還流して肝組織を採取した。TF 群は阻血直前の48, 24, 3時間の3回TFを腹腔内投与した。生食群は同様に生食を3回投与した。一方正常食マウスに阻血再灌流・生食投与を行った群を正常対照群とした。肝臓はTBARSの測定、F4/80免疫染色、TUNEL染色のほか、炎症関連分子の遺伝子発現を検討した。さらに脂肪肝モデルから得た初代培養肝細胞を用いてROS産生におけるTFの影響を観察した。さらにマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を用いてLPSで誘導されるTNF- α 産生におけるTFの影響をELISAで検討した。

【結果】MCDHF食投与により脂肪肝を引き起こすが、TF投与群では生食群に比較して脂肪滴面積が有意に減少した。またTBARSもTF群で低下した。F4/80陽性細胞はTF群で優位に減少し、TUNEL染色でも同様であった。しかしMPO陽性細胞はどの群でもほとんど観察されなかった。TNF- α 、IL-6、osteopontin等の遺伝子発現はいずれも生食群に比較してTF群で発現が低下していた。一方、脂肪肝から分離した肝細胞はTF添加でROS産生は有意に低下した。またLPS添加によるRAW264.7細胞のTNF- α 産生は、TF添加で有意に低下した。

【結論】TFは抗酸化、抗炎症、抗アポトーシス作用を介して脂肪肝の阻血再還流障害を軽減した。

セッションⅢ－１

１４．

肝細胞の混合培養系を利用したクッパー細胞の新しい単離・回収法

木谷 裕¹、竹之内 敬人¹、佐藤 充¹、吉岡 都²、山中典子²

¹農業生物資源研究所 動物生体防御研究ユニット、²農研機構動物衛生研究所 病態研究領域

【目的】肝特異的マクロファージであるクッパー細胞は異物排除や免疫応答など重要な生体防御機能を担う。この細胞の単離にはエルトリエーション遠心機など特殊機器と熟練技術が必要であった。我々はラット、マウス、ウシの肝細胞の混合培養系を用いて、簡便で効率的な単離・回収法を開発した。

【方法】肝臓をコラゲナーゼ溶液で灌流・分散し、低速遠心により肝実質細胞分画を得た。10%FCSを含むDMEM培地に懸濁し、組織培養フラスコ（5 x 10⁶/75 cm²）へ播種した。培養開始1週間から10日後には、肝細胞シート上にマクロファージが活発に増殖する混合培養系が形成された。フラスコを振とうして細胞を浮遊させた後、プラスチックディッシュへの強い付着性を利用してマクロファージを選択的に回収した。フラスコには新しい培地を添加し、混合培養を継続した。

【結果】約2～3週間にわたり、同じフラスコからマクロファージを繰り返して採取できた。単離された細胞は培養マクロファージの形態を示すとともに、ほぼ全ての細胞がマクロファージ特異的モノクローナル抗体で染色された。一方、肝実質細胞や間葉系細胞などの混入は極めて少なかった。さらに、GM-CSFへの増殖応答、蛍光ラテックスビーズの貪食、リポポリサッカライド刺激による各種炎症性サイトカインの産生などクッパー細胞の特性が確認された。

【結論】肝実質細胞の混合培養を用いて高純度のクッパー細胞を簡便に効率よく、繰り返して単離することができた。本手法はヒトにも適用可能と考えられ、得られたクッパー細胞は肝臓疾患の病態解明や治療薬の開発などに大きく貢献すると期待される。

セッションⅢ－２

15.

肝の Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) による肝免疫調節

阿部雅則^{1, 2}、陳 式儀¹、ファズレ アクバル^{1, 3}、日浅陽一¹、恩地森一¹

¹愛媛大学大学院先端病態制御内科、²愛媛大学大学院地域医療学、

³東芝病院研究部

【目的】肝細胞癌患者や肝癌モデルマウスの解析で、骨髄由来細胞の一分画である Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) が末梢血やリンパ組織、腫瘍部位に存在し、免疫抑制に関与していることが報告されている。しかし、肝臓における MDSC の存在や機能については明らかになっていない。今回、定常状態におけるマウス肝臓に存在する MDSC の機能解析を行った。

【方法】C57BL/6 マウス (8 週齢、雄) の脾臓・肝臓から脾細胞・肝非実質細胞を単離した。1) MDSC (CD11b⁺Gr1⁺) の細胞数を flowcytometry で解析した。2) MDSC を肝非実質細胞から FACS を用いて単離した (purity >98%)。C57BL/6 マウスの樹状細胞 (DC: CD11c⁺) と C3H/He マウス T 細胞の共培養の系に MDSC を添加し、T 細胞増殖能の変化について解析した。コントロールとして、CD11b⁺ Gr1⁻ 細胞を用いた。3) T 細胞を MDSC の存在下に ConA で刺激し、IFN- γ 産生細胞数と T 細胞表面マーカーの発現の変化を flowcytometry で解析した。

【結果】1) マウス肝臓に存在する MDSC の割合は、脾臓に比べて有意に多く、肝臓では CD11b⁺ Gr1^{dim} 細胞が多くを占めていた。2) MDSC の添加により、アロ T 細胞の増殖誘導能は有意に抑制された ($p < 0.05$)。一方、CD11b⁺ Gr1⁻ 細胞を添加した場合には、DC によるアロ T 細胞増殖誘導能は抑制されなかった。3) MDSC を添加すると、IFN- γ 産生細胞数の低下と T 細胞上の PD-1, CTLA-4 の発現増強がみられた。

【結論】マウス肝臓には生理的状态においても MDSC が存在し、T 細胞増殖能を抑制した。MDSC は肝臓における免疫寛容誘導に関与している細胞群の一つであると考えられた。

16.

ケモカインレセプター CX3CR1 およびリガンド CX3CL1 による肝マクロファージにおける抗炎症性作用の誘導と肝線維化進展抑制

青山友則¹、石 亦宏²、宮崎招久¹、David A. Brenner²、渡辺純夫³

¹順天堂大学練馬病院消化器内科、²カリフォルニア大学サンディエゴ校、

³順天堂大学消化器内科

【目的】 ケモカインレセプターCX3CR1 は主に抗炎症性マクロファージで発現している。我々はCX3CL1 とCX3CR1 の相互作用による肝マクロファージ (MΦ) の制御と肝線維化との関連を検討した。

【方法】 CC1₄ 投与/非投与 野生型(WT)およびCX3CR1 欠損マウス(KO)よりMΦを単離し、TNF- α , TGF- β および抗炎症性サイトカイン IL-10, arginase-1 mRNA 発現をqPCRで測定した。recombinant CX3CL1(rCX3CL1)投与WTMΦに同様な検討を行った。肝星細胞(HSC)をcollagen promoter-driven GFP トランスジェニックマウスより単離し、CC1₄投与/非投与 WT およびKOより単離したMΦと共培養を行った。また一部のMΦにrCX3CL1を投与し同様に共培養を行った。MΦと共培養後のHSCのコラーゲンプロモーター活性をHSCのGFP陽性細胞数により測定した。さらに、CC1₄投与WT, KOの肝線維化、炎症性変化を検討した。

【結果】 CX3CR1 はMΦ、CX3CL1 はHSCに主に発現した。rCX3CL1投与WTMΦではIL-10, arginase-1mRNA 発現が増強した。CC1₄投与KOMΦはCC1₄投与WTMΦと比べTNF- α , TGF- β の発現増強, IL-10, arginase-1 の発現減弱を認めた。HSCのGFP陽性細胞数はCC1₄投与KOMΦと共培養した群で最多だった。一方、rCX3CL1投与WTMΦと共培養したHSCのGFP陽性細胞数はrCX3CL1非投与群と比較し有意に減少した。CC1₄投与後の肝線維化と炎症性変化はWTと比較しKOで増強した。

【結論】 rCX3CL1 はMΦの抗炎症性サイトカイン発現を増強した。CX3CL1 とCX3CR1 による抗炎症性MΦの誘導が肝線維化進展抑制に重要であることが考えられた。

17.

活性化肝星細胞における自然免疫とレニンアンジオテンシン系のクロストーク

堂原彰敏、吉治仁志、白井勇作、野口隆一、鍛冶孝祐、相原洋佑、守屋 圭、
福井 博

奈良県立医科大学第3内科（消化器・内分泌代謝内科）

【目的】 近年、さまざまな肝病態における自然免疫の関与が明らかにされる過程で、エンドトキシン(LPS)シグナルを伝達する Toll-like receptor-4 (TLR-4) の肝線維化進展における重要性が報告されている。一方、我々はこれまでにレニンアンジオテンシン系の産物である angiotensin-II (AT-II) が、肝線維化進展に重要な役割を果たしていることを報告してきた。今回我々は、AT-II シグナルと TLR-4 シグナルの Ac-HSC におけるクロストークについて検討を加えた。

【方法】 活性化肝星細胞 (Ac-HSC) を用いて以下の検討を行った。(1) AT-II の TLR-4 発現、および AT1-R 受容体阻害薬 (ARB) の効果について検討した。(2) AT-II の TLR-4 シグナルに対する影響を MyD88、NF- κ B を指標として検討し、TGF- β 発現に関しても解析を加えた。(3) AT-II および LPS の Ac-HSC の細胞増殖に及ぼす影響について MTT assay にて検討した。

【結果】 (1) AT-II は用量および時間依存性に TLR-4 発現を増加させ、その効果は各々 $1\mu\text{M}$ 、ならびに処理 12 時間後でピークに達した。なお、これらの効果は ARB ($10\mu\text{M}$) の前処理にてほぼ完全に抑制された。(2) MyD88 および NF- κ B は LPS ($10\mu\text{g/ml}$) により発現が増加したが、AT-II と LPS 共存下ではさらに両遺伝子発現が増強していた。TGF- β 発現に関しても同様の増強効果を認めた。LPS 刺激下で TGF- β は MyD88 および NF- κ B とほぼ平行するように増加していた。なお、AT-II による促進効果は ARB 処理により著明に抑制された。(3) Ac-HSC の増殖は AT-II により有意に促進されたが、LPS では有意な変化を認めなかった。

【結論】 Ac-HSC において AT-II は AT1R を介して LPS による TLR-4 $\sim$ MyD88 $\sim$ NF κ B 伝達経路を促進し、TGF- β 産生に重要な役割を果たしていることが示唆された。AT-II シグナルと TLR-4 シグナルは密接に関連しながら肝線維化進展に働くものと思われた。

18.

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

永妻啓介¹、桐田暁子²、原 詳子²、小嶋聡一²、田中 賢¹、松本喜弘¹、
高木一郎¹、前橋はるか³、進藤大典⁴、鈴木政登⁴、羽野 寛⁵、斉藤美知子⁶、
河野憲二⁶、松浦知和⁴

¹東京慈恵会医科大学・消化器肝臓内科、²(独) 理化学研究所・分子リガンド
生物研究チーム、³東京慈恵会医科大学・生化学、⁴同・臨床検査医学、
⁵同・病理学、⁶奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科動物
細胞工学

【目的】 TGF- β は、プレペプチドの Latency associated protein (LAP) に疎水結合によりトラップされた複合体として細胞から産生・分泌され、マトリックスにプールされる。組織特異的プロテアーゼにより TGF- β のトラップに関わる LAP α ヘリックスが切断されると TGF- β は複合体から放出、すなわち活性化される。肝組織での TGF- β 活性化反応は、慢性肝障害において肝線維化のイニシエーションをはたすことが臨床的にも明らかになりつつあるが、急性肝不全においても肝再生不全の惹起など臨床的意義は大きいと考えられている。本研究では、急性肝不全における TGF- β 活性化反応の実態と病態への関与を明らかにする目的で、新規の急性肝不全モデルである TRECK (Toxin receptor-mediated cell knock out) 肝炎モデルマウスにおける血中 LAP 断片 (LAP-D) と肝組織 LAP-D の発現を検討した。

【方法】 肝臓特異的にヒトジフテリア毒素レセプターを発現した TRECK マウスにジフテリア毒素 (DT) (Sigma) を 500-1500ng/kg BW 腹腔内に投与し、48 時間後エーテル麻酔下で犠牲死させ、採血後、肝組織を採取し 10% 緩衝ホルマリンで固定した。分離血清で生化学一般検査、血漿で LAP-D 濃度を測定した。肝組織では、Masson 染色、渡銀染色および、組織に結合した LAP-D を免疫染色した。

【結果】 500ng/kg BW 以上の DT 投与によって、血清 ALT は 10000IU/L 前後に上昇し、肝不全が惹起された。肝組織では、強度の出血壊死・肝細胞の脱落を認めた。血中 LAP-D は、肝障害の程度に応じて上昇を認め、これに呼応して肝組織の LAP-D も α -smooth muscle cell actin と類似した部位で染色された。

【結論】 TRECK 急性肝不全モデルマウスにおいて、TGF- β 活性化反応は肝組織で証明され、血中 TGF- β LAP-D 濃度は、組織の TGF- β 活性化を大変良く反映しており、急性肝不全における TGF- β 活性化と病態の関連を明らかにする上で、TRECK 肝炎モデルマウスは有用である。

セッションⅢ－6

19.

C型肝炎ウイルス NS3 プロテアーゼによる TGF- β I 型受容体を介した TGF- β シグナルの活性化

坂田幸太郎¹、原 詳子¹、鈴木哲朗²、渡邊則幸³、相崎英樹³、高谷大輔⁴、
松本武久⁴、脇田隆字³、小嶋聡一¹

¹理化学研究所・分子リガンド生物、²浜松医科大・感染症学、³国立感染研・
ウイルス第二部、⁴理化学研究所・SSBC

【目的】C型肝炎ウイルス（HCV）は肝線維症の主要原因であるが、HCV が肝線維症を引き起こす機構は未だ不明な点が多い。我々は、セリンプロテアーゼ活性を有する NS3 が TGF- β 2 の活性化に寄与しているのではないかという作業仮説を検証する過程において、NS3 プロテアーゼ自身が TGF- β 2 抗原活性および生物活性を有するという興味深い結果を得た。そこで、NS3 プロテアーゼによる TGF- β 疑似活性発現の詳細な機構を明らかにするために、NS3 と TGF- β 受容体との相互作用について検討を行った。

【方法】組換え NS3 プロテアーゼは大腸菌により調製した。TGF- β 2 抗原活性は ELISA（プロメガ社）により測定した。TGF- β シグナル活性化の程度は、Smad 応答配列（CAGA）をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミド（9xCAGA-Luc）を導入したミンク肺上皮細胞を用いたレポータージーンアッセイにより定量した。NS3 と TGF- β 受容体との相互作用については、ドッキングシミュレーションを行い、その予測結合サイトに対する抗体をウサギから調製した。

【結果】組換え NS3 は、ELISA により TGF- β 2 抗原活性を有することが示され、さらにレポータージーンアッセイにより TGF- β シグナルを活性化することが明らかとなった。一方、ドッキングシミュレーションにより、NS3 と TGF- β I 型受容体が 3 ヶ所の結合サイトを介して相互作用することが示唆された。NS3 側および TGF- β I 型受容体側のそれぞれ 3 ヶ所の予測結合サイトに対する抗体を作製し、抗体が NS3 の TGF- β 疑似活性に与える影響をレポータージーンアッセイにより評価した。その結果、作製した 6 種類すべての抗体が NS3 の TGF- β 疑似活性を阻害した。

【結論】NS3 プロテアーゼは、TGF- β I 型受容体と直接的に相互作用し TGF- β シグナルを活性化することが示唆された。

20.

肝障害に伴う細胞外マトリックス再構築におけるファイブロネクチンの役割

守屋 圭^{1,2}、酒井尚雄²、福井 博¹

¹奈良県立医科大学第三内科(消化器・内分泌代謝内科)、²Lerner Research Institute of the Cleveland Clinic

【目的】細胞外マトリックス (ECM) 蛋白であるファイブロネクチン (Fn) は個体発生において必須の役割を担う重要な蛋白質である。成体における臓器障害時のECM再構築では、FnとフィブリノジェンによりProvisional matrix (PM) が形成されるとともに、コラーゲンIIIからコラーゲンIへの置換が生じるが、それらの詳細な分子機構は未だ明らかではない。さらに、臓器障害時の線維化誘導に関してTGF- β が中心的な役割を担うことは広く知られているものの、肝線維化におけるTGF- β 活性化とFnの関連について詳細な検討はこれまで行われていない。 *In vitro* におけるFn欠損モデル (Velling: JBC, 2002) では、組織障害時にはPMが形成不能でコラーゲン合成も生じないためECMは再構築されず、Fnが必須であることが報告されているが、*in vivo* での報告はない。そこで今回我々は、Fnノックアウトマウス (Fn-KO) を用いて生体内ECM再構築におけるFnの役割について種々の検討を行った。

【方法】四塩化炭素 (CCl₄) による急性肝障害モデルを作成して、肝組織における活性型肝星細胞 (Ac-HSC) とTGF- β シグナルの発現および、ECM再構築時に必須とされるコラーゲンIIIおよびIのmRNA、蛋白のレベルと肝組織中のヒドロキシプロリン含有量(Hp)についてFn-KOとコントロールマウス (Cont) で比較検討した。

【結果】肝障害群では、Fn-KOおよびCont共に非処置群に比してAc-HSCのマーカーである α SMAを強く発現するとともに、HSCにおけるTGF- β レベルとその下流シグナル分子であるSmad2/3リン酸化レベルが上昇していた。コラーゲンIIIおよびIのmRNAと蛋白のレベルについても、Fnが欠損しているにも関わらず対照群と同等であり、肝組織中のヒドロキシプロリン含有量にも相違を認めなかった。

【結論】これらの結果より、肝障害時におけるECM再構築に関しては、Fnが関わるPM形成とコラーゲン合成が重要で、この過程にはTGF- β の活性化から始まる下流へのシグナル伝達が大きく寄与すると考えられた。

２１．

慢性肝疾患における肝線維化診断マーカーとしてのマイクロ RNA の有用性

飯塚昌司¹、小川智弘²、榎本 大¹、吉里勝利^{1,3}、池田一雄⁴、河田則文¹

¹大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学、²近畿大学工学部教育推進センター、³株式会社フェニックスバイオ、⁴大阪市立大学大学院医学研究科機能細胞形態学

【目的】肝組織中の遺伝子発現を制御するマイクロ RNA(miRNA)を同定し、その機能を解析することは、miRNA の肝線維化マーカーとしての利用に繋がることが期待できる。本研究では、肝組織内の miRNA 発現を解析し、肝線維化進行例に特有の miRNA を同定し、その機能について検討した。

【方法】C 型慢性肝炎患者を対象に、得られた肝生検組織から RNA を抽出し、マイクロアレイによる miRNA の網羅的解析を行なった。肝線維化軽度群(stage 1-2)と進行群 (stage 3-4) との比較を行い肝線維化の進展に伴って変動する miRNA の同定を行った。同定した miRNA の挙動をマウス肝線維化モデルで検証すると同時に、その機能をマウス初代培養星細胞とヒト星細胞株 LX-2 を用いて解析した。

【結果】マイクロアレイの結果、肝線維化進行群では miR-422a の発現が有意に低下する一方、miR-222、miR-214、miR-199a-3p (miR-199b-3p)、miR-199a-5p の発現が有意に増加した。定量性 PCR で検証したところ、miR-222 および miR-214 がヒト肝線維化と伴に有意に増加することが判明した。マウス肝線維化モデルにおいても、線維化の進展とともに miR-222 および miR-214 の発現が増加した。また、マウス肝より分離・培養した星細胞の miR-222 および miR-214 の発現は星細胞の活性化とともに増加した。LX-2 に miR-222 を過剰発現させるとコラーゲン 1A1 の発現を誘導し、MMP1 の発現を抑制することが判明した。

【結論】肝線維化の進行に伴い発現が変動する miRNA を数種同定した。miR-222 および miR-214 は活性化星細胞で強発現しており、肝線維化進展に関与する可能性が示唆された。

セッションⅣ－２

２２．

肝障害患者における新規肝線維化活動度マーカー血漿 TGF- β LAP 断片量の臨床的検討

桐田暁子¹、原 詳子¹、松浦知和²、齋藤勝也³、永妻啓介³、上竹慎一郎³、
瀬嵐康人³、高木一郎³、相澤良夫³、浦島充佳⁴、池田 均⁵、小嶋聡一¹

¹理化学研究所 基幹研究所 分子リガンド生物研究チーム

²東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座

³東京慈恵会医科大学 消化器肝臓内科

⁴東京慈恵会医科大学 分子疫学研究室

⁵東大病院 検査部（消化器内科）

【目的】肝線維化の主要原因因子 TGF- β は肝星細胞から潜在型複合体として産生され、活性化されることにより肝線維化を誘発するとされており、血漿カリクレインが TGF- β のプロペプチド Latency Associated Protein (LAP) の R58-L59 を限定分解することにより TGF- β を活性化することが示されている。本研究では、TGF- β 活性化反応の過程で生じる C 末 LAP 断片 (LAP-D) を特異的に認識する L59 抗体を用いた ELISA で、健常者、肝疾患患者の血漿 C 末 LAP-D 量測定を行い、C 末 LAP-D の臨床的意義を検証した。

【方法】ELISA を用いて肝疾患患者血漿 C 末 LAP-D 量を定量し、既存の肝線維化、肝障害マーカーと比較した。また、PEG-インターフェロン/リバビリン併用療法における経過観察を行った。

【結果】血漿 LAP-D の基準値を 234pM（健常者平均+2SD）とした。慢性ウイルス性肝疾患患者では約 17% の患者が基準値より高値を示した。血漿 C 末 LAP-D は線維化初期段階（肝臓病理ステージ F1、F2）で高く線維化が進行すると低下する傾向を示し、既存の肝機能、肝線維化マーカーとは相関しなかった。血漿 C 末 LAP-D は PEG-インターフェロン/リバビリン併用療法施行後減少し、3 ヶ月～6 ヶ月後で半減した。

【結論】血漿 C 末 LAP-D 量は、急性・慢性ウイルス性肝炎、自己免疫性肝炎患者で高値例を認め、線維化初期の段階で高値を示すことから、肝線維化活動度の指標となることが示唆された。また、PEG-インターフェロン/リバビリン併用療法で治療応答性がみられることから、長期にわたる治療経過観察に有用であることが考えられた。肝障害時に起こる TGF- β 活性化反応の結果生じる血漿 LAP-D 量の測定は、臨床において、従来の肝障害マーカーとは異なる早期を含む肝線維化の活動度を反映する可能性が示唆された。

２３．

Sonazoid 造影超音波 Kupffer 相における肝脾実質の輝度比（LS 比）を用いた肝線維化進展度予測

岩井孝史¹、田中弘教^{1, 2}、山平正浩²、西口修平¹、飯島尋子^{1, 2}

¹兵庫医科大学 内科学肝胆膵科

²兵庫医科大学 超音波センター

【目的】肝線維化の非侵襲的診断は、エラストグラフィーや血清マーカーなど近年さまざまな取り組みがなされているが確立したものはない。肝線維化進展例では Sonazoid 造影超音波の Kupffer 相における肝実質輝度が低下することが知られており、肝線維化診断への応用が期待される。そこで今回、Kupffer 相における肝輝度と脾輝度の比（LS 比）と、肝の線維化グレードおよび Child-Pugh 分類との関連を検討し、肝線維化進展度予測における有用性を検討した。

【方法】肝線維化グレードとの検討では、肝生検で F 因子の分類が確認できた 77 例（平均年齢 68 ± 11 歳、男性 55 例、女性 22 例）を対象とした。Child-Pugh 分類との検討では、LS 比を検討できた症例のうち、血小板数が $10 \text{ 万}/\mu\text{l}$ 以下あるいは食道静脈瘤を有し、臨床的に肝硬変と診断した 142 例（平均年齢 65 ± 14 歳、男性 94 例、女性 48 例）を対象とした。超音波診断装置は Toshiba Aplio XG を使用、撮像モードは PS-LOW、音圧は MI 値で $0.2 \sim 0.3$ を用いた。Sonazoid は 0.0075 ml/kg を bolus にて投与し、20 分以降の Kupffer 相で肝と脾の実質画像を撮像した。OFF ラインで輝度解析ソフトを用いフォーカス付近の血管を避けた部位で 5 点計測し、その平均を輝度値とした

【結果】肝線維化グレード別での LS 比は、F0-2 群 ($n=30$) 1.1 ± 2.9 、F3 群 ($n=23$) -3.2 ± 4.8 、F4 群 ($n=24$) -3.9 ± 5.6 であり、F0-2 群より F3 群が有意に低値であった ($P=0.007$)。LS 比での F3 群以上の診断能を ROC 解析すると、曲線下面積は 0.813 、cut off 値 -0.21 の時の感度 86.1% 、特異度 72.6% と良好な判別能を呈していた。Child-Pugh 分類別の LS 比は、Child A ($n=103$) -2.8 ± 3.5 、Child B ($n=41$) -4.8 ± 4.1 と病期の進展に伴い低下していた ($P=0.037$)。

【結論】造影超音波検査を用いた LS 比は、肝線維化グレードおよび Child-Pugh 分類との相関を認め、肝線維化進展度診断に有用である。

24.

TGF- β 活性化反応阻害物質のケミカルスクリーニング

山本由佳^{1, 2}、坂田幸大郎²、本田香織³、近藤恭光³、斎藤臣雄³、下仲基之¹、
長田裕之³、小嶋聡一²

¹東京理科大 理学部第一部化学科

²理化学研究所ケミカルゲノミクス研究グループ分子リガンド生物研究チーム

³理化学研究所ケミカルバイオロジー研究基盤施設

【目的】 肝硬変や肝細胞癌へ進展しうる肝線維症の初期発症を抑える有効な薬は未だ開発されていない。Transforming growth factor (TGF)- β は、コラーゲンの過剰な蓄積を引き起こす肝線維症の主要因子である。プロペプチドのLatency associated protein (LAP) に包まれた高分子潜在型複合体として産生され、LAP の R58-L59 が血漿カリクレイン (plasma kallikrein, PLK) により切断されると、潜在型複合体より TGF- β が放出、すなわち活性化される。そこで、同切断部位及びその周辺に結合し、PLK による TGF- β 活性化を抑制する化合物のケミカルスクリーニングを行った。

【方法】 理研天然化合物バンク (RIKEN NPDepo) の化合物ライブラリーより、PLK の LAP 切断部位及びその周辺に結合する化合物を探索した。1 次スクリーニングとして、R58-L59 を含む LAP 由来の 11 アミノ酸からなるペプチド (QP ペプチド) に結合するが、切断配列を A もしくは Q に変異させたペプチド (QPA ペプチド、QPQ ペプチド) とは結合しない化合物を、化合物アレイスクリーニング法により探索した。2 次スクリーニングとして、活性化の過程で PLK によって切断され生じた LAP 断片に対する特異抗体を利用した ELISA を用いて TGF- β 活性化反応を抑制する化合物を評価した。

【結果】 1 次スクリーニングにより、NPDepo の 6,800 化合物のうち 69 種の、その中から 2 次スクリーニングにより 2 種のヒット化合物を得た。このうちの 1 つの化合物とその誘導体について TGF- β 活性化反応に対する影響を検討した結果、もとのヒット化合物より約 100 倍強く PLK による TGF- β 活性化を阻害する化合物が見つかった。

【結論】 LAP 切断部位と相互作用することによって PLK 依存 TGF- β 活性化反応を阻害する化合物を見つけた。今後はこの化合物の構造活性相関について検討し、得られたリード候補化合物の動物モデルにおける有効性について検証する予定である。

セッションⅣ－５

２５．

Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV)阻害薬の肝星細胞に及ぼす影響

鍛冶孝祐、吉治仁志、池中康英、野口隆一、相原洋祐、堂原彰敏、守屋 圭、
福井 博

奈良県立医科大学第３内科

【目的】近年、新たな糖尿病治療薬としてインクレチンの１つである GLP-1 作用を増強させる DPPIV 阻害薬 (DPPIV-I) が注目され、臨床でも使用されている。一方、活性化肝星細胞 (Ac-HSC) に DPPIV が発現していることが報告されている。しかし、DPPIV-I が Ac-HSC に及ぼす影響については未だ報告されていない。今回、我々は DPPIV-I の HSC に及ぼす細胞増殖、コラーゲン、および TGF- β 1 発現に対する影響について検討した。

【方法】Ac-HSC としてラット T6 cell を用いて以下の検討を行った。(1) PDGF-BB にて刺激した Ac-HSC を用いて、DPPIV-I の細胞増殖に及ぼす影響について MTT 法で検討した。(2) DPPIV-I のコラーゲン、TGF- β 1 発現に及ぼす影響を ELISA、real-time PCR で検討すると共に、細胞内伝達経路について ERK1/2、JNK および p38 の解析を加えた。(3) 同細胞をマトリゲル上で培養することで非活性化させ (q-HSC)、(1) と同様に細胞増殖における影響について検討した。

【結果】(1) PDGF-BB 刺激により Ac-HSC の増殖は著明に促進され、DPPIV-I 存在下で抑制された。(2) PDGF-BB 刺激により Ac-HSC のコラーゲン、TGF- β 1 の発現はタンパク、mRNA レベルでそれぞれ著明に増加し、DPPIV-I により有意に抑制された。細胞内の ERK1/2、p38 リン酸化は DPPIV-I 存在下で抑制されたが、JNK では抑制作用は認めなかった。(3) q-HSC では PDGF-BB による増殖促進および DPPIV-I による抑制は認めなかった。

【結論】DPPIV-I は ERK1/2、p38 リン酸化阻害を介して Ac-HSC における細胞増殖、コラーゲン、TGF- β 1 産生を抑制することが示唆された。これらの結果より DPPIV-I が肝線維化抑制作用を有する可能性が示唆された。

セッションⅣ－6

26.

ACE 阻害薬、低用量 IFN、リバビリン併用カクテル療法による肝線維化抑制

吉治仁志、野口隆一、鍛冶孝祐、相原洋佑、堂原彰敏、守屋 圭、福井 博
奈良県立医科大学第3内科（消化器・内分泌代謝内科）

【目的】我々はこれまでに、ACE 阻害薬（ACE-I）や Angiotensin-II 受容体阻害薬（ARB）などによるレニンアンギオテンシン系ブロックが肝線維化抑制につながることで、IFN 抵抗例に対する ACE-I と低用量 IFN 併用による抗線維化作用について報告してきた。今回我々は、現在標準療法で用いられているリバビリン（RVB）を加えることで、より強い抗線維化作用が認められるか否か基礎的に検討すると共にその作用機序についても解析を加えた。

【方法】四塩化炭素マウス実験的肝線維症を作成し、ARB（losartan: 30mg/kg）投与群、IFN（IFN- α : 1×10^4 IU/週 2 回）投与群、RVB（10mg/kg）投与群、2 剤併用群（ARB+IFN、ARB+RVB、IFN+RVB）、3 剤併用群（ARB+IFN+RVB）、およびコントロール（C）群に分け、8 週後に動物を犠死させて各種検討を行った。肝線維化の程度についてイメージアナライザーによる半定量を行うと共に、活性化肝星細胞（Ac-HSC）への作用を検討するために α -SMA を指標とした免疫染色、TGF- β の変動について比較検討した。さらに *in vitro* において各薬剤の影響について解析した

【結果】ARB、IFN、RVB 各群共に C 群に比し肝線維化が有意に抑制されたが、二剤併用投与では単剤投与に比しより強い線維化抑制効果が認められた。さらに、三剤全てを併用投与した群においては、全実験群中最も強い線維化抑制作用を示した。また、肝における Ac-HSC 数、TGF- β 産生は線維化抑制の程度に相応していた。*In vitro* の検討でも、Ac-HSC の増殖および TGF- β 産生は ARB、IFN、RVB 存在下で抑制され、三者共存下で最も強く抑制された。

【結論】ARB、IFN、RVB カクテル併用療法により、肝星細胞の活性か阻害を伴う著明な実験的肝線維症抑制作用を認めた。強力な抗ウイルス療法困難例やウイルス陰性化を望めない臨床例に対しても有効である可能性が示され、線維化抑制に基づく慢性肝疾患予後改善を目指した治療として有用であると考えられた。

27.

ヒト肝細胞キメラマウス肝臓における特徴的な組織構築に関する考察

立野知世^{1, 2}、工藤 篤³、和氣健二郎⁴、加国雅和¹、井上 亮¹、山崎ちひろ¹、
吉実康美¹、柳 愛美¹、石田雄二^{1, 2}

¹株式会社フェニックスバイオ、²広島大学肝臓プロジェクト研究センター、

³東京医科歯科大学肝胆膵・総合外科学、⁴ミノファージェン製薬肝臓ユニット

【目的】 通常、肝部分切除後、肝細胞が分裂することにより肝細胞索が二列となる。二列になることにより血管からの酸素供給量が減少し肝細胞が低酸素状態となる。その結果、HIF-1 が上昇しその下流の VEGF が誘導され、類洞内皮細胞が増殖することにより肝細胞索が一行になると考えられている。我々は、urokinase plasminogen activator transgenic/SCID (uPA/SCID) マウスにヒト肝細胞を移植することによりヒト肝細胞を持つキメラマウスを作製している。キメラマウス肝臓では、肝細胞は二列の索状構造を示し、肝臓が肥大しているという特徴を持つ。キメラマウス肝細胞の酸素消費量および血流を調べることにより、キメラマウス肝臓の組織学的構築に関して考察した。

【方法】 キメラマウスおよび SCID マウスからコラゲナーゼ灌流法によりヒト肝細胞とマウス肝細胞をそれぞれ採取し、酸素消費量を測定した。また、それぞれのマウスに Hypoxiprobe を投与し、肝臓切片を染色することにより低酸素状態を調べた。次に、肝臓における血流量を ICG 法、および微小循環を画像解析により調べた。

【結果】 肝細胞の酸素消費量を調べたところ、ヒト肝細胞ではマウス肝細胞の約 1/5 であった。微小循環を調べたところ、肝類洞内における血流はキメラマウスでは SCID マウスの約 1/3 であったが、微小循環障害は認められなかった。また、Hypoxiprobe の染色によりキメラマウス肝臓におけるヒト肝細胞領域において低酸素状態は認められず、HIF-1 下流の遺伝子の上昇も認められなかった。

【結論】 キメラマウスの肝臓では微小循環障害は起きていないと考えられた。ヒト肝細胞は酸素消費量がマウス肝細胞に較べて顕著に低いため、肝細胞索が二列であっても低酸素状態ではなく、類洞内皮細胞の増殖、肝細胞索の一行化が起らないと考えられた。

28.

肝類洞再構築過程におけるセマフォリン 3A の役割

傅 玲¹、北村庸雄^{1, 2, 3}、岩渕和久¹、市野瀬省三¹、柳田光昭¹、小川秀興¹、
渡辺純夫³、須山正文^{2, 3}、高森建二¹

¹順天堂大学大学院医学研究科環境医学研究所、

²順天堂大学医学部附属浦安病院消化器内科、³順天堂大学医学部消化器内科

【目的】 本研究の目的は、神経ガイダンス因子であるセマフォリン 3A (semaphorin 3A; Sema3A) の肝再生における類洞再構築に及ぼす影響を検討することにある。

【方法・結果】 肝再生の動物実験モデルである 70%肝切除ラットを作成し、手術 24、48、72、96、144、192 時間後に残存肝を採取し、real-time PCR 法で解析した結果、Sema3A の mRNA 発現量は肝切除 24、48、72、96、144 時間後に有意に減少していた。又、免疫染色法により Sema3A は肝実質細胞に発現が認められた。さらに、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) と Sema3A の共通受容体であるニューロピリン-1 (neuropilin-1; Nrp-1) の抗体および肝類洞内皮細胞のマーカー SE-1 を用いて二重染色を行い、肝における Nrp-1 の発現・分布を検討した。Nrp-1 は主に門脈側の血管内皮細胞と肝類洞内皮細胞に発現しており、中心静脈の内皮細胞に発現はみられなかった。類洞内皮細胞における Nrp-1 の発現量は肝切除 48、72、96 時間後に増加していた。

一方、初代培養類洞内皮細胞 (SECs) を既報のごとく分離し、*in vitro* で transwell 遊走系を用いて SECs の遊走能を定量した結果、Sema3A によって SECs の遊走能の低下が認められた。SECs における Nrp-1 の mRNA とタンパクの発現はそれぞれ real-time PCR と免疫染色法によって確認した。

【結語】 VEGF は肝再生における類洞再構築の重要な促進因子として知られている。Sema3A は VEGF の coreceptor である Nrp-1 と競合することで、VEGF による血管内皮細胞の遊走、血管新生を抑制することが報告されている。肝再生において Sema3A は Nrp-1 を介し、類洞再構築の抑制因子として働く可能性が示唆され、肝切除後の Sema3A 発現減少は類洞再構築に寄与するものと考えられた。

29.

アンギオテンシン II レセプターブロッカー (ARB) の類洞内皮細胞小孔に対する効果ーバイオ人工肝臓を用いてー

松浦知和¹、田中 賢^{1,2}、永妻啓介²、松本喜弘²、前橋はるか³、相澤 守⁴

¹東京慈恵会医科大学・臨床検査医学講座、²同・消化器肝臓内科、³同・生化学、

⁴明治大学・理工学部・セラミックス工学

【目的】 アンギオテンシン II レセプターブロッカー (ARB) には、降圧作用のほかに、臓器保護作用、インスリン抵抗性改善効果、門脈圧低下作用などの効果について報告されている。今回は、バイオ人工肝臓を用いて、ロサルタンによる肝臓内皮細胞の小孔に対する影響を、走査型電子顕微鏡で観察し、興味ある知見を得たので報告する。

【方法】 バイオ人工肝臓構成細胞には、ImmortoMouse より樹立した、不死化肝細胞、星細胞、内皮細胞を用いた。細胞培養担体は、明治大学相澤研究室で開発した、可溶性アパタイトファイバースキャフォールド (AFS)、そして、培養はラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) を用い、3 次元共培養を行った。充填担体の AFS で内部は空隙となっており、有孔率は 90%以上である。AFS カラムを円筒状の RFB に装填し、培養液を外から内にむけて還流し、細胞を播種、高密度培養を行った。バイオ人工肝臓の培養経過は、¹³C-glucose 呼気試験でモニタリングした。培養液に ¹³C-glucose を加え、代謝されて生ずる排気中の ¹³CO₂ を赤外分光光度計で測定した。培養終了時、グルタルアルデヒドで固定し、TI ブルーで染色し、日立簡易型走査電子顕微鏡 TM-1000 で試料をウェットのまま観察した。

【結果】 はじめに不死化肝細胞を RFB で培養し、1 週間ほどしてから星細胞を加えた。星細胞を加えると、¹³CO₂ 産生が急速に上昇し、最後に内皮細胞を加えた。電顕で観察すると、アンギオテンシン II (AngII) のみの投与では、内皮細胞の小孔はわずかに認めるものの、めだたなかった。一方、AngII にロサルタンを投与したバイオ人工肝臓では、生体の肝臓に近い小孔の集簇像、つまり篩板状小孔にきわめて類似した構造が、頻度は高くないが、観察された。小孔の径を測定したところ、AngII では小孔は縮小傾向を示し、ロサルタンでは拡大傾向でした。

【結論および考察】 AFS を RFB の充填担体に利用することで、毛細血管様構造が発達したバイオ人工肝臓の作製が実現できた。さらに、電顕観察を行ったところ、ロサルタン投与により篩板状小孔の再現、小孔の拡大効果もあり、より生体肝に類似した肝臓オルガノイド作製の一助となる可能性が示唆された。こうした小孔拡大効果は、従来のアンギオテンシン II レセプターの ATI レセプターの ARB による阻害効果でなく、ARB のもつ ATII レセプターへの促進効果が関与している可能性がある。今後、ARB のインスリン抵抗性改善効果の確認、ATII レセプター刺激効果による小孔拡大作用などがあるか、検討を行う予定である。本研究は、バイオ人工肝臓開発、インスリン抵抗性改善、門脈圧亢進症の内服薬による治療法の開発に寄与する研究である。

30.

ヒト肝類洞内皮細胞およびヒト肝細胞に対する Eltrombopag の効果

野崎礼史¹、村田総一郎¹、池田直哉¹、高橋一広¹、永井健太郎¹、田村孝史¹、丸山岳人¹、野渡剛史¹、小川光一¹、大河内信弘¹

¹筑波大学消化器外科

【目的】Thrombopoietin (TPO)は肝細胞が分泌するが、その TPO 受容体 (c-Mpl) は肝細胞ではなく肝類洞内皮細胞 (LSEC) に存在するとされている。我々は、新しい経口 TPO 製剤である Eltrombopag により、LSEC から成長因子が分泌され肝細胞の増殖を促進するのではないかと考えた。本研究では、Eltrombopag のヒト肝細胞およびヒト LSEC に対する効果を検討することを目的とした。

【方法】実験には、初代培養肝細胞およびヒト不死化肝類洞内皮細胞株 (TMNK-1) を用いた。

実験 1) Eltrombopag の LSEC に対する効果を検討するために、LSEC の増殖、成長因子 (IL-6, IGF-1 および VEGF) と増殖関連シグナルを測定した。

実験 2) 肝細胞の増殖促進効果を検討するために、Eltrombopag 単体、Eltrombopag を添加した LSEC の培養上清を肝細胞に添加し、肝細胞の増殖を測定した。

【結果】

実験 1) Eltrombopag は LSEC の増殖を促進せず、逆に高濃度の Eltrombopag により細胞数が減少した。成長因子の分泌では VEGF の分泌が促進されたが、IL-6 と IGF-1 は検出されなかった。増殖関連シグナルでは Akt シグナルの活性化を認めた。

実験 2) Eltrombopag の有無にかかわらず、LSEC の上清を添加した肝細胞の BrdU uptake は増加した。

【結論】高濃度の Eltrombopag による LSEC に対する細胞障害性を認めた。Eltrombopag により LSEC から VEGF が分泌された。Eltrombopag の肝細胞に対する著明な増殖効果は認めなかった。

31.

肝類洞血流測定による肝機能評価

佐藤公太¹、工藤 篤¹、飯島尋子²、有井滋樹¹

¹東京医科歯科大学肝胆膵・総合外科、²兵庫医科大学内科学肝胆膵科

【目的】近年、各種癌に対して腫瘍血管形成を target とした分子標的治療薬が使用され、その有効性が報告されているが、肝微小循環に対する影響は未知である。そこで本研究では、肝細胞癌の治療に使用されている血管新生阻害薬である Sorafenib をマウスに投与して、intravital videomicroscopy で肝微小循環を定量的に検討した。

【方法】実験には BALB/c Slc-nu/nu を使用し、非投与(Control)群、Sorafenib 大量投与群(60mg/kg×7days)を作成した。Sorafenib 投与開始 1 週間後に非覚醒麻酔下(urethane : 1000mg/Kg s.c)に開腹し、光学顕微鏡で肝臓を観察した。さらに、高速度カメラ(HAS-L1:DITECT)を用いて肝類洞血流を撮影し、2 次元流体解析ソフト(Flownizer 2D : DITECT)を用いて赤血球の流速を測定した。

【結果】Sorafenib 投与群は非投与群と比較すると肝細胞の膨化や肝小葉の縮小を認めた。肝類洞血流速度は非投与群： $1.977 \times 10^{-3} \pm 2.266 \times 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$ 、Sorafenib 大量投与群： $1.5 \times 10^{-3} \pm 1.792 \times 10^{-4} \mu\text{m}/\mu\text{s}$ ($p=0.10$)、類洞径は非投与群： $2.492 \pm 0.072 \mu\text{m}$ 、Sorafenib 大量投与群： $2.037 \pm 0.083 \mu\text{m}$ ($p=0.0003$)であり、類洞血流量は非投与群： $1.0 \times 10^{-2} \pm 1.0 \times 10^{-3}$ 、Sorafenib 大量投与群： $5.169 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$ ($p=0.006$)であった。

【結論】この解析により、Sorafenib 大量投与群では、肝類洞血流速度が低下する傾向にあり、類洞径の狭小化と類洞血流量低下を呈することが判明した。以上から、この解析ソフトを用いた肝類洞血流測定の結果は、肝機能障害を反映し、肝機能評価の一助となる可能性が示された。

32.

肝温虚血再還流障害における脾臓由来の IL-17A は肝臓への好中球遊走を促進し、臓器障害に関与する

河野 寛、原 倫生、古屋信二、大菊雅人、土屋雅人、藤井秀樹
山梨大学第一外科

【目的】 IL-17Aの肝温虚血再還流（I/R）障害における好中球の肝への遊走と、肝障害発症機序への関与について、IL-17Aノックアウトマウス（IL17A^{-/-}）を用いて検討した。

【方法】

検討I： wild-type（WT）、ならびにIL17A^{-/-}を用いて90分間の肝部分I/Rモデルを作成。血清ALT値、肝障害、好中球の浸潤、MPO活性、MIP-2発現を検討。WT群より肝マクロファージを分離し、IL-17AまたはIL-17F共培養後、TNF- α 産生を測定。

検討II： WT群において、脾摘を施行し（Spx群）、非脾摘群と肝障害ならびに門脈血中IL-17A値、肝好中球数と肝障害を検討した。

検討III： I/R後の肝臓ならびに脾臓よりリンパ球を分離し、細胞内IL-17A発現をフローサイトメトリー法により検討した。

【結果】

検討I： WT群のALT値は、急性期と亜急性期で2峰性のピークを認めたが、IL-17A^{-/-}群では急性期のみにピークを認め、亜急性期においては肝細胞障害とALT値ともに有意に減少した。肝臓でのMPO活性ならびに好中球数もIL17A^{-/-}群で有意に減少。IL-17A発現は、脾臓に認めた。肝マクロファージのTNF- α 産生は、IL-17A 共培養細胞で産生が亢進した。

検討II： Spx群において、非脾摘群と比較し、門脈血中IL-17A値は有意に低下し、肝内の好中球数の有意な減少と、肝障害の軽減を認めた。

検討 III： 肝臓遊走リンパ球での IL-17A 発現は認めず、脾臓リンパ球では、その発現が上昇していた。

【考察】 脾臓由来のIL-17Aは、I/R後の亜急性期における肝への好中球遊走に関与し、肝障害発症機序において重要な因子である事実が解明された。

33.

門脈圧亢進症におけるスフィンゴシン 1 リン酸の関与

池田 均¹、影山祐子¹、矢富 裕¹、小池和彦²

¹東京大学 検査部、²東京大学 消化器内科

【目的】 門脈圧亢進症の病因に肝臓周囲に存在する星細胞収縮の関与が示唆されている。我々は脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1 リン酸 (sphingosine 1-phosphate: S1P) が培養星細胞の収縮を促進し、ex vivo のラット肝灌流系において受容体 S1P₂ を介して Rho kinase を活性化させ門脈圧を上昇させることを報告した (Am J Physiol 2000, BBRC 2004)。さらに胆管結紮により作成した門脈圧亢進症ラットにおいて S1P₂ アンタゴニストが平均動脈圧への影響なしに門脈圧を低下させる一方、対照ラットにおいては門脈圧および平均動脈圧を変化させないことを本研究会で報告した。今回、この作用機序について検討した。

【方法】 胆管結紮術後 4 週ラットを門脈圧亢進症モデルとした。S1P₂ 発現検討には S1P₂/LacZ ノックインマウスを、S1P₂ 作用の検討には S1P₂ ノックアウトマウスを用いた (ともに金沢大学多久和教授より供与)。

【結果】 門脈圧亢進症ラットの肝臓における S1P₂ mRNA 発現は対照の 2 倍に亢進していた。胆管結紮施行 4 週後の S1P₂/LacZ ノックインマウス肝臓では門脈および増生した胆管周囲を主とした線維成分沈着部位に S1P₂ 発現が顕著であり、平滑筋 α アクチンを共発現する細胞が多数確認された。また、門脈圧亢進症ラットにおいて S1P₂ アンタゴニスト投与により肝臓における Rho kinase 活性は低下した。さらに野生型マウスにおいて胆管結紮後 1 週間で肝臓での Rho kinase 活性の上昇が確認されたが、S1P₂ ノックアウトマウスにおいては野生型に比して、この上昇が軽度であった。

【結論】 胆管結紮による門脈圧亢進症モデルにおいて S1P₂ アンタゴニストは選択的に門脈圧低下作用を有し、その機序に Rho kinase 活性抑制および肝臓筋線維芽細胞での S1P₂ 発現亢進が関与すると考えられた。

34.

LPS/GaIN 肝炎モデルマウスを用いた核内タンパク質 HMGB1 の生体反応機構の検討

佐藤哲二¹、黒田範行¹、井上孝二²、和氣健二郎^{1,3}

¹鶴見大学歯学部解剖・組織細胞学講座、²電子顕微鏡研究センター、

³ミノファーゲン製薬・肝臓リサーチ・ユニット

【目的】核内タンパク質である High mobility group B1 (HMGB1) 蛋白は、侵襲部位では壊死細胞や活性化マクロファージから細胞外に放出されて生体防御・修復などの応答を誘導するが、全身性に作用するとショックや敗血症、播種性血管内凝固症候群 (DIC) に至ることが知られている。本研究では、LPS/GaIN 肝炎モデルマウスを用いて細胞外 HMGB1 の細胞・組織障害誘導のメカニズムを明らかにするとともに、その抑制機序について検討する。

【方法】対照群 (生理的食塩水投与)、処置群 (50 mg/kg の GL の非投与群と投与群) において、組織病変を HE 染色法、HMGB1 やアセチル化 HMGB1 陽性細胞および HMGB1 放出細胞の同定を免疫組織化学染色法、血清中の AST、ALT ならびに HMGB1 レベルの測定、HMGB1 の受容体である RAGE と TLR4 の mRNA 発現量の解析を Real-time PCR 法、アポトーシスを TUNEL 法、アポトーシス関連遺伝子の発現をマイクロアレイ解析にて行った。

【結果・考察】LPS/GaIN 投与後 6-10 時間では、中心静脈周囲の肝組織に組織病変が認められた。さらに、対照群では HMGB1 蛋白は核内に限局していたが、LPS/GaIN 投与群では時間経過とともに HMGB1 蛋白が核外、さらには細胞外へ移動し、形態的には処置後 8 時間に最も大きな変化を示した。同様に、血清中の HMGB1 レベルと ALT・AST レベルは著しく上昇し、両者は強い相関を示した。Real-time PCR による解析では、LPS/GaIN 投与群で TLR4 mRNA の発現量に上昇がみられたが、RAGE の mRNA 発現量は LPS/GaIN 投与群では対照群に比べてむしろ減少していた。一方、LPS/GaIN 投与群では、活性化マクロファージと樹状細胞からの HMGB1 放出が認められた。LPS/GaIN 肝炎モデルマウスでは、グリチルリチン (GL) 投与によって HMGB1 の細胞外放出ならびに血清中の ALT・AST と HMGB1 レベルの上昇が抑えられた。本研究では、HMGB1 の細胞外への流出機構ならび HMGB1 による肝障害機構とその抑制機構についても検討する。

35.

障害肝組織修復におけるトロンボキサン受容体シグナルの役割

南野 勉^{1, 2}、伊藤義也³、大久保博世³、細野加奈子¹、小泉和三郎³、
馬嶋正隆¹
北里大学医学部薬理学¹、消化器内科²、外科³

【目的】急性肝障害後の肝組織修復には、様々なサイトカインや増殖因子などのメディエーターが関与している。プロスタノイドの一つであるトロンボキサンは血小板を凝集させ、トロンボキサン受容体(TP)を介して血管新生に寄与していることが示唆されている。そこで、障害肝修復過程においてトロンボキサン受容体が肝再生に果たす役割を調べた。

【方法】7～9 週齢の雄性 TP^{-/-}または野生型マウス (C57BL/6, WT) に四塩化炭素 (CC14) を腹腔内投与 (1.0ml/kg) し、急性肝障害モデルを作成した。投与後、0, 12, 24, 48, 72, 96 時間の血清 ALT, 肝壊死面積、肝再生の指標として PCNA 発現、肝組織における mRNA およびタンパク発現などの経時的変化 (0, 12, 24, 48, 72, 96 時間) を比較検討した。

【結果】CC14 を投与後、ALT 値は WT、TP^{-/-}において投与後 24 時間でピークとなり、以降減少した。肝壊死面積は WT において 24～48 時間でピークとなり、以後減少したが、TP^{-/-}においては 48 時間がピークで WT よりも高値を示し、72 時間でも依然高値であった。PCNA 陽性細胞数が WT においては 48 時間で、TP^{-/-}においては 72 時間がピークであった。また TP^{-/-}において IL-6, TNF, HGF あるいは CD31, bFGF, TGF β などの発現が有意に減少した。マクロファージのマーカーである F4/80 ならびに CD11b の肝組織中の発現ならびに陽性細胞数は TP^{-/-}において抑制された。さらにケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) とそのレセプター C-C chemokine receptor (CCR)2 の肝組織発現をみると、TP^{-/-}において mRNA が抑制された。

【結論】TP シグナリングは CC14 誘発肝障害後に肝再生因子や肝血管新生因子を増強することで、肝組織修復を促進することが示唆され、これには MCP-1/CCR2 を介したマクロファージの集積が関与する可能性が考えられた。

36.

肝部分切除後肝再生におけるNK・NKT細胞の関与

細谷聡子、池嶋健一、山形寿文、青山友則、今 一義、山科俊平、鈴木聡子、
渡辺純夫
順天堂大学医学部消化器内科

【目的】肝再生の調節機構には自然免疫系が深く関与していると考えられているが、肝NK細胞およびNKT細胞の肝再生機転における機能的役割については未だ不明の点が多い。そこで今回私たちは、抗体投与によるNK細胞とNKT細胞の枯渇させたマウスおよび、全身性にNKT細胞を欠損するCD1d-KOマウスを用いて、70%肝切除後の肝再生過程におけるこれらの自然免疫系細胞の関与について検討した。

【方法】12週齢の雄性WT(C57Bl/6)およびCD1d-KOマウスを用いて70%肝部分切除を行い、経時的に肝組織、血液を採取した。一部のマウスにはNK1.1抗体(150 μ g/body, i.p.)ないしasialoGM1抗体(200 μ g/body, i.p.)を肝部分切除24時間前に投与し、NK細胞・NKT細胞の双方ないしNK細胞のみを枯渇させた。肝細胞核へのBrdU摂取およびPCNA発現を免疫染色で確認するとともにCyclinD1発現をWestern blot法で検討した。また、IFN γ 、HGF、IL-6およびsocs3mRNAをリアルタイムRT-PCR法で測定し、血清IL-6、HGFをELISA法を用いて測定した。

【結果】WTマウスにNK1.1抗体を前投与した際には、肝切除48時間後のBrdU摂取率が20.8%から1.7%へ、PCNA発現が30.1%から11.9%へと有意に低下し、CyclinD1発現誘導もコントロール群の約20%にまで抑制された。肝切除後のIFN γ mRNAの発現誘導はNK1.1抗体前投与の影響を受けなかった。HGF mRNAの発現、血清HGFはピーク時においてWTと比べNK1.1抗体を投与した群で低下していた。また、NK1.1抗体投与マウスでは、肝部分切除3時間後で肝実質IL-6mRNAの発現誘導が低下しており、6時間後の血清IL-6値およびsocs3 mRNA発現も低下していた。asialoGM1抗体を前投与したWTないし未処置のCD1d-KOでは肝再生機転に異常を認めなかったが、CD1d-KOにasialoGM1抗体を投与してNKT細胞とNK細胞の双方を欠失させると、NK1.1抗体投与WTと同様に有意なBrdU摂取の抑制およびPCNAの発現低下が認められた。

【結論】NK細胞・NKT細胞の両者が同時に欠失すると肝再生機転が障害されるが、一方のみの欠損では再生機転は保たれていることから、NK細胞とNKT細胞が協調的に作用して肝切除後のIL-6/JAK-stat系、HGF誘導などを調節し、正常な肝再生機転の維持に寄与していることが示唆された。

37.

肝切除後肝再生における IL-17A の関与について

古屋信二、河野 寛、原 倫生、土屋雅人、大菊正人、藤井秀樹
山梨大学第一外科

【目的】 IL-17A ならびに IL-17F は、第 3 のリンパ球サブセットである Th17 より産生されるサイトカインであり、関節リュウマチや炎症性大腸疾患などに関与する。一方、これまでのわれわれの検討より、IL-17A は Kupffer cell の TNF- α 産生を亢進させる事実を報告した (J Immunology; 2011 In press)。この結果は、IL-17A の肝再生への関与を強く示唆する。そこで、今回、IL-17A knockout (KO) マウスを用いて、肝切除後の肝再生における IL-17A の関与と脾臓の役割について検討した。

【方法】 KO ならびに wild-type マウス (WT) を用い、70% 部分肝切除モデルを作成した。肝切除後、0、1、3、5、7、10 日目で犠牲死させ、肝体重比を検討した。BrdU と Ki-67 陽性細胞数と、Cyclin D1 の肝での発現を検討した。また、肝切除後早期における、TNF- α と IL-6 mRNA の肝発現について検討した。さらに、IL-17A 発現ならびに肝再生における脾臓の関与を検討する目的で、脾摘後肝切除モデルを 2 種類の動物で作成し肝再生を検討した。肝切除後マウスより CD4 陽性リンパ球を分離し、FACS にて細胞内 IL-17A 発現を比較検討した。

【結果】 WT と比較し KO で肝再生が有意に遅延した。これを反映し、KO において BrdU ならびに Ki-67 陽性細胞数は減少、Cyclin D1 の発現と、肝臓での TNF- α ならびに IL-6 mRNA 発現も有意に低下した。WT における脾摘群では、非脾摘群と比較し有意に肝再生が遅延していたが、KO においては、脾摘は肝再生に影響を与えなかった。肝切除後マウスより分離したリンパ球の解析において、肝臓リンパ球では IL-17A 陽性細胞は認めなかったが、脾臓リンパ球で IL-17A 陽性リンパ球の比率増加を認めた。

【結論】 IL-17A は、肝切除後肝再生初期に関与する TNF- α や IL-6 の発現を誘導する役割を有し、肝切除後肝再生に関与していた。また、脾摘により WT においてのみ肝再生が遅延した結果より、脾臓由来 IL-17A が肝切除後肝再生において重要であることが明らかとなった。

38.

骨髓造血幹細胞ならびに間葉系幹細胞による肝線維化の病態形成

中尾祥絵¹、東山礼一¹、茂呂 忠^{1, 4}、皆川香織¹、三上健一郎¹、住吉秀明¹、
福光 寛^{1, 2}、山岡華児^{1, 3}、鈴木禎史⁵、松崎有未⁵、稲垣 豊¹

¹東海大学医学部再生医療科学、²同 消化器外科学、³同 皮膚科学、

⁴ミノファージェン製薬研究所、⁵慶應義塾大学医学部生理学

【目的】近年、線維肝組織に浸潤した骨髓由来細胞がコラーゲンあるいは Matrix metalloproteinases (MMPs) を産生して肝線維化の進展もしくは改善に関わるという一見相反する報告が見られるが、その一因は、骨髓が多種多様な細胞で構成され、線維肝に流入・生着した骨髓由来細胞も均一な集団でないことにある。また、それらの細胞系譜や分化形質についても、未だ充分には解明されていない。そこで今回、骨髓の間葉系幹細胞と造血幹細胞とを個別に標識し、両幹細胞の線維肝組織への生着や分化動態について検討を行った。

【方法】EGFP transgenic mouse (Tg) の骨髓より、FACS を用いて間葉系幹細胞分画 (P α S 細胞 : PDGFR α ⁺ Sca-1⁺ CD45⁻ Ter119⁻)、もしくは造血幹細胞分画 (34KSL 細胞 : CD34⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻) を分離した。これらの幹細胞あるいは全骨髓細胞を野生型マウスに移植して骨髓を置換し、6 週後にレシピエントマウスの末梢血単核球中の EGFP キメリズムを FACS により確認した。次いで、移植 8 週後よりレシピエントマウスに四塩化炭素を反復投与して肝線維症を作製し、線維肝組織に流入・生着した EGFP 陽性細胞を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

【結果】移植 6 週後において末梢血単核球中の EGFP キメリズムは 85% 以上であったが、間葉系幹細胞の末梢血への動員は認められなかった。EGFP Tg から得た全骨髓細胞を移植したレシピエントマウスでは、骨髓における P α S 細胞分画の EGFP 陽性率は 5% にすぎなかったが、P α S 細胞のみを分離・移植することで、EGFP キメリズムは 30% にまで増加した。しかしながら、P α S 細胞移植マウスの線維肝組織中には、EGFP 陽性細胞は全く観察されなかった。一方で、全骨髓細胞あるいは 34KSL 細胞を移植したレシピエントマウスの線維肝組織には、多数の EGFP 陽性細胞が見られ、その一部は Kupffer 細胞や類洞内皮細胞の分化形質を示した。さらに、これら造血幹細胞に由来する細胞の一部は、MMP-13 および MMP-9 を産生していた。

【結論】線維肝組織に流入・生着した造血幹細胞由来の細胞は MMP-13/MMP-9 を産生し、肝線維化の改善に寄与している可能性が示された。一方、肝線維化過程において間葉系幹細胞の動員や線維肝組織への流入・生着は認められなかったことから、間葉系幹細胞のコラーゲン産生による肝線維化の進展は否定的であった。

39.

肝線維化修復時における二種類の骨髄由来細胞の動態と特徴

山本直樹^{1,2}、寺井崇二¹、岩本拓也¹、藤澤浩一¹、廣瀬恵一¹⁾、高見太郎¹、
内田耕一¹、山崎隆弘¹、仁科博史²、坂井田 功¹

¹ 山口大学大学院 医学系研究科 消化器病態内科学

² 山口大学 大学教育機構 保健管理センター

³ 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 発生再生生物学分野

【目的】我々は難治性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法(ABMi therapy)の開発を行い、基礎研究で様々な解析を報告してきたが、投与した骨髄細胞がどのような特徴を示し、肝線維化を改善していくか不明である。今回 FEI 社製電子顕微鏡 Tecnai12BT と Qunta3D FEG を使用して、微小環境での骨髄細胞の動態を観察した。また免疫電顕解析で GFP 陽性骨髄細胞と Liv2(肝芽細胞 marker)、Liv8(CD44)、A-6(oval cell marker)、EpCAM, Maid(細胞増殖制御転写因子)、MMP9 各陽性細胞との関連をそれぞれ検討した。

【方法】GFP Tg マウスより骨髄細胞を採取、同種同系の CCl₄による肝障害モデルマウス群の尾静脈より投与する。肝臓内の GFP 陽性骨髄細胞の存在を免疫染色・蛍光二重染色で確認しながら、電子顕微鏡で細胞の形態・微細構造を検討した。また GFP 抗体、Liv2 抗体、EpCAM 抗体、Liv8 抗体、A6 抗体、Maid 抗体、MMP9 抗体による免疫電顕で各細胞の特徴を検討した。

【結果】骨髄細胞投与群では大量の lysosome を含む細胞を認め、肝線維周囲に小型の細胞を多数認めた。免疫電顕では、GFP 陽性細胞は細胞内に大量の lysosomeを含む類円形の15～30umの大型細胞とN/C比の高い2～5umの小型細胞が存在していた。Liv2 抗体陽性細胞、A6 抗体陽性細胞、EpCAM 抗体陽性細胞はN/C 比が高く小型で門脈周囲に存在し、貪食作用をしていた。MMP9 抗体陽性細胞、Maid 抗体陽性細胞は類円形を呈し、肝障害・肝線維化領域に入り修復作用をしていた。

【結論】今回、電顕と免疫電顕の手法を用いて骨髄由来細胞の様々な形態を確認し、大きさ・形態より投与された骨髄細胞は2～5umの A6, EpCAM, Liv2陽性小型細胞と15～30um のLiv8, MMP9, Maid陽性類円形細胞の二つの細胞集団に分けられ、肝線維化改善・肝組織修復を分担して行なっていることがわかった。

40.

骨髓細胞に由来する新たな肝線維化改善・再生促進因子の同定と臨床応用

福光 寛^{1, 2}、東山礼一¹、中尾祥絵¹、皆川香織¹、茂呂 忠^{1, 4}、
三上健一郎¹、住吉秀明¹、山岡華児^{1, 3}、東 清史⁵、斎藤幸一⁵、稲垣 豊¹
¹東海大学医学部再生医療科学、²同 消化器外科学、³同 皮膚科学、
⁴ミノファーゲン製薬研究所、⁵住友化学生物環境科学研究所

【目的】線維肝に対する再生治療を考える際には、線維化の進展を抑制しつつ線維肝の再生を促すという、他臓器の再生とは異なる視点に立った治療戦略が必要となる。また、肝細胞癌の90%以上が硬変肝に合併するという特殊性から、切除後の残存線維肝の再生促進は喫緊の臨床的課題である。演者らはこれまで、線維肝組織に流入・生着した骨髓細胞がMatrix metalloproteinase (MMP)-13/-9を順次発現して線維化の改善に寄与すること、この際にG-CSFを投与すると骨髓細胞の動員と線維化改善効果が高まることを報告した。今回さらに、線維化改善と再生促進に関わる新たな骨髓細胞由来因子の同定を行った。

【方法】Enhanced green fluorescent protein (EGFP)発現トランスジェニックマウスの骨髓細胞を移植したレシピエントマウスに四塩化炭素を反復投与し、肝線維症を作製した。この際、線維肝組織に流入・生着したEGFP陽性骨髓由来細胞をLaser capture microdissectionにより採取し、これらの細胞における遺伝子発現プロファイルをG-CSF投与の有無で比較した。G-CSFの投与により2倍以上の発現増加を示した遺伝子の中から初代培養肝細胞の増殖を促進する遺伝子を抽出し、これを組み込んだレンチウイルスを作製した。骨髓由来間葉系幹細胞(MSC)にレンチウイルスを感染させ、これを四塩化炭素誘導肝線維症ヌードマウスの脾臓内に注入し、肝線維化と再生に対する影響を検討した。

【結果】G-CSFを投与した線維肝組織では565遺伝子が2倍以上の発現増加を示し、このうち肝細胞の増殖を促す因子としてOpioid growth factor receptor like-1 (OGFRL1)とProteolipid protein 2 (PP2)を同定した。OGFRL1もしくはPP2発現レンチウイルスを感染させたMSCを肝線維症マウスの脾臓内に注入すると、いずれも肝内MMP-13/-9遺伝子の発現を増加させ、線維化の改善が認められた。また、肝線維症マウスを70%部分肝切除に供すると、OGFRL1発現MSCを脾臓内に投与したマウスでは肝細胞へのBrdU取り込みの著しい亢進が認められた。さらに肝組織より抽出したRNAのmicroarray解析では、OGFRL1発現MSCの投与によりcyclinA2/B1/B2/E1やその他の細胞周期関連遺伝子、IGF-BP1やAFP遺伝子の有意な発現促進が確認された。

【結論】骨髓細胞に由来し、肝線維化改善と再生促進に関わる新規因子として、Opioid growth factor receptor like-1を同定した。そのさらなる機能解析は、肝線維化の進展抑制のみならず、切除後の残存線維肝の再生を促進させて術後肝不全を防止する上でも、有用な治療法になりうると考えられた。

セッションⅦ－1

4 1.

炎症性肝発癌と進展における M-CSF の関与について

原 倫生、河野 寛、土屋雅人、古屋信二、大菊正人、藤井秀樹
山梨大学第一外科

【目的】M-CSFは新生血管を誘導し、その抑制は腫瘍の増殖を抑制する報告がある。一方、マクロファージ(M ϕ)には細菌感染などで活性化するM1型と、寄生虫感染・血管新生などに関与するM2型の亜種が存在する。M2 M ϕ への分化は、IL-4あるいはmacrophage colony stimulating factor (M-CSF) により誘導され、脳腫瘍や卵巣癌、膵癌などの悪性度や進行度に関与する報告がある。そこで今回、肝発癌・進展とM-CSFの関連についてM-CSF欠損マウスを用いて検討した。

【方法】

検討 I : M-CSF 欠損マウス(op/op) と littermate マウス (LT) を用い、生後 14 日目にジエチルニトロサミン (DEN) を腹腔内投与し肝発癌モデルを作製。投与後 28 週目に犠牲死させ、発癌率、腫瘍数、最大腫瘍径について検討した。肝臓における活性化 M ϕ 分布を F4/80 免疫組織染色法で、また、肝 M ϕ の M1/M2 比について、抗 CD68、CD204 抗体を用いて、FACS 法にて解析した。さらに、肝臓での CD163 mRNA 発現を real-time RT-PCR 法で検討した。

検討 II : DEN 投与後の急性期における肝臓への影響を検討する目的で、炎症性サイトカイン発現、肝細胞アポトーシス、肝細胞分裂について検討した。

検討 III : *in vitro* において、DEN の肝細胞に対する細胞障害性を、Kupffer 細胞との共培養の有無で MTT Assay にて比較検討した。

【結果】

検討 I : LT と比較し、op/op では発癌率、腫瘍数、最大腫瘍径のいずれにおいても有意に低下。肝内活性化 M ϕ の分布は、LT では正常肝組織・腫瘍内部ともに認められるのに対して、op/op では腫瘍内部とその辺縁部においてのみ認められた。DEN 投与後の発癌マウスでは、op/op において CD204⁺/CD68⁺ 比と、CD163 mRNA 発現が LT と比較して有意に低下した。

検討 II : DEN 投与後急性期では、op/op で炎症性サイトカイン発現は低下していたが、アポトーシスについては op/op で増加していた。肝細胞分裂には両群で差を認めなかった。

検討 III : Kupffer 細胞と肝細胞の共培養下では、肝細胞単独培養下と比較し cell viability の改善が認められた。

【結論】炎症性肝発癌モデルにおいて、M-CSF が発癌の発症と進展に強く関与していた。DEN 投与後早期における op/op での肝細胞アポトーシスの増加と、Kupffer 細胞と肝細胞の共培養下での cell viability の改善より、M-CSF 誘導型 M2M ϕ は癌の進展により関与している可能性がある。

4 2.

Tumor formation and the role of Cygb in DEN-mediated carcinogenesis

Le Thi Thanh Thuy, Takashi Morita, Kayo Yoshida, Kenichi Wakasa, Masashi Iizuka, Tomohiro Ogawa, Katsutoshi Yoshizato, and Norifumi Kawada
Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University

Aim: Cytoglobin (Cygb) is a recently discovered vertebrate globin the molecular characteristics of which are similar to myoglobin. To study the biological function of Cygb *in vivo*, we generated *Cygb* knockout mice and investigated their susceptibility to *N,N*-diethylnitrosamine (DEN)-induced tumorigenesis.

Methods: Mice lacking exon 1 of the *Cygb* gene were generated using the lox-P system. Four-week-old *Cygb*^{+/+} (wild-type), *Cygb*^{+/-} (heterozygote), and *Cygb*^{-/-} (homozygote) male mice were administered DEN in drinking water at the dose of 25 ppm for 25 weeks or 0.05 ppm for 36 weeks. Tumor formation and the role of Cygb in DEN-mediated carcinogenesis were analyzed. In order to examine the mechanism by which CYGB acts as a tumor suppressor gene, human HCC and corresponding non-tumor adjacent samples were analyzed for CYGB SNP rs3217541 by direct sequencing.

Results: *Cygb* deficiency promoted the DEN-induced development of liver and lung tumors. All *Cygb*^{+/-} and *Cygb*^{-/-} mice treated with 25 ppm DEN exhibited liver tumors, compared with 44.4% of their wild-type counterparts. Lung tumors were present only in *Cygb*-deficient mice. More than 40% of *Cygb*^{-/-} mice developed liver and lung tumors at the non-toxic dose of DEN (0.05 ppm), which did not induce tumors in wild-type mice. *Cygb* loss was associated with increased cancer cell proliferation, elevated Erk and Akt activation, overexpression of *Il-1β*, *Il-6*, *Tnfa*, and *Tgfb3* mRNAs, and hepatic collagen accumulation. *Cygb*-deficient mice also exhibited increased nitrotyrosine formation, a marker of oxidative stress. CYGB SNP analysis showed that in total 31 human HCC samples, the frequency of major type (MA) of SNP rs 3217541 is 16/31 (51.6%) and minor type (MI) is 15/31 (48.4%). In contrast, among 23 corresponding non-tumor samples, MA is 17/23 accounts for 73.9%, MI is only 6/23 account for 22.1% (*p*<0.05 compared with HCC group).

Conclusions: This study is the first to report that *Cygb* deficiency induced susceptibility to cancer development in the liver as well as the lungs of mice under DEN treatment. *Cygb*-deficient mice can be a useful animal model to study cancer development in the liver and lungs. Globins such as *Cygb* will thus shed new light on the biology of organ carcinogenesis.

セッションⅦ-3

43.

骨髓細胞投与はマウス肝硬変発癌モデルにおいて発癌を抑制する

高見太郎^{1, 2}、寺井崇二²、前田雅喜²、廣瀬恵一²、藤澤浩一^{1, 3}、山本直樹^{1, 4}、坂井田 功^{2, 3}

¹ 山口大学 医学部附属病院検査部、² 同 大学院医学系研究科消化器病態内科学、

³ 同 大学院医学系研究科修復医学教育センター、

⁴ 同 大学教育機構保健管理センター

【目的】 これまでに我々も肝発癌マウスモデルへの抗酸化剤投与が肝発癌を有意に抑制させることを報告するなど、高発癌状態である肝硬変症には酸化ストレス制御による肝線維化改善と発癌抑制効果を併せ持つ治療法の開発が期待される。そこで、骨髓細胞投与が酸化ストレスと肝発癌に与える影響をマウスモデル系で検討した。

【方法】 マウス腹腔内への DEN 単回処理と CCl₄ 反復投与によりマウス肝硬変発癌モデルを作成し、コントロール群 (n=17) とした。一方、投与群 (n=23) には DEN 処理 2 ヶ月後から同種同系 GFP 陽性マウス骨髓細胞を末梢 (尾) 静脈から 2 週間毎に計 5 回投与した。なお、肝発癌動態は組織学的に foci および腫瘍の発生率・個数・サイズで評価し、肝線維化は Sirius-red 染色、酸化ストレスは肝 8-OHdG 量と SOD 活性で評価した。

【結果】 DEN 処理後 4.5 ヶ月の投与群において、foci および腫瘍の発生率 (foci/腫瘍; $p<0.001/p<0.05$) と個数 ($p<0.01/p<0.001$) は有意に抑制されており、foci および腫瘍サイズは同等で、GFP 陽性腫瘍は認めなかった。また投与群の肝線維化は抑制され ($p<0.05$)、肝 8-OHdG 量は少なく ($p<0.01$)、肝 SOD 活性は高く維持されていた ($p<0.05$)。さらに背景肝の線維束に沿って GFP/SOD3 共陽性細胞の生着を認めた。

【結論】 肝硬変への骨髓細胞投与は、その Re-dox 制御により肝線維化改善と肝発癌抑制に作用すると考えられた。

44.

肝細胞増殖因子 HGF が有する肝癌細胞増殖抑制作用の解析

瀧澤友里^{1,2}、辺 颯¹、小山 遼¹、楊 宇¹、駒田雅之¹、福光 寛²、
中尾祥絵²、皆川香織²、稲垣 豊²、喜多村直実¹、田中利明¹

¹東京工業大学大学院生命理工学研究科 生体システム専攻

²東海大学医学部 再生医療科学

【目的】HGF (Hepatocyte growth factor) は正常肝細胞の増殖を促進する一方、ある種の癌細胞の増殖を抑制する。私達はヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いて、HGF 受容体 c-Met の活性化により Ras-Erk 経路を介して癌抑制因子 p16 の発現が上昇すること、それによって細胞周期の G1 期で増殖が停止することを報告した。最近、HepG2 細胞に対する HGF 刺激を一定時間持続することで、その後に HGF を除いても増殖停止が維持される現象を見出した。この不可逆的な増殖停止機構を解明出来れば、新規癌治療薬として応用できる可能性がある。今回、不可逆的増殖停止と Ras-Erk 経路との関係を調べるとともに、個体レベルでも HGF が肝癌細胞の増殖を抑制するかを検討した。

【方法】強活性型 Ras 変異体の発現を ON/OFF できる HepG2 細胞株を用い、変異型 Ras の発現中および発現中止後の細胞数の推移をカウントした。また、Ras 下流の Mek の強活性化変異体を発現させた際の増殖抑制についても検討した。さらに、重度免疫不全 NOD/SCID マウスに HepG2 細胞を移植して癌を形成させ、HGF を含ませた徐放剤を腫瘍周囲に投与して、腫瘍サイズの変化を調べた。また、未処置の腫瘍組織を摘出し、再び培養した HepG2 細胞を HGF 刺激した際の細胞数および癌抑制因子 p16 の発現量の変化を検討した。

【結果と考察】Ras 変異体を一定時間発現させた後に停止しても、その後も細胞増殖が抑制され続けたことから、不可逆的増殖停止は一定時間の強い Ras 活性により誘導されることが分かった。一方、Mek 阻害剤 PD98059 により Erk 活性を抑制した場合や、Mek の強活性型変異体の発現により Erk を強く活性化させても増殖停止作用が見られなかったことから、増殖抑制には Mek-Erk の活性化だけでは不十分で、Ras-Raf から派生する Erk 以外の経路が必要であることが示唆された。HGF 投与マウスでは、PBS 投与の対照マウスと比べて腫瘍の増殖抑制効果が見られた。また、未処置の腫瘍から再び培養系に戻した HepG2 細胞を HGF 刺激すると、親株と同様に細胞増殖の抑制ならびに p16 発現の上昇が認められた。

45.

新規抗癌剤投与方法である S-1 metronomic chemotherapy による血管新生抑制効果

岩本英希^{1, 2}、鳥村拓司^{1, 2}、古賀浩徳^{1, 2}、中村 徹^{1, 2}、安倍満彦^{1, 2}、
増田 裕^{1, 2}、上野隆登³、佐田通夫¹

¹久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門、²久留米大学病院先端癌治療研究センター肝臓部門、³朝倉医師会病院

【目的】従来の抗癌剤投与は、最大耐容量(MTD)に基づき大量投与、長期休薬を繰り返す方法であるが、肝細胞癌において臨床で有用性を示す事が出来ていない。metronomic chemotherapy(MC)とは少量無休薬継続投与に基づいた抗癌剤の新規投与方法である。我々は肝細胞癌に対する MC の有用性・作用メカニズムを検証し、さらに VEGFR-2 と EGFR のリン酸化阻害剤である vandetanib との併用による効果増強を検討した。

【方法】肝細胞癌株、血管内皮細胞を培養し、抗癌剤(5-fluorouracil)を MTD 及び MC 様に曝露させ、増殖抑制の濃度を比較検討した。肝癌細胞皮下・肝接種マウスを用いて、コントロール、MTD S-1、MC S-1、vandetanib、MTD S-1+vandetanib、MC S-1+vandetanib の治療効果、副作用を検討した。各群の腫瘍血管数(MVD)、及び VEGF、Thrombospondin-1(内因性血管新生阻害因子;TSP-1)、p-VEGFR-2 を比較検討した。

【結果】細胞培養レベルで、MC は MTD に比べ低濃度で細胞増殖抑制効果を示し、その効果は血管内皮細胞でより強く示された。肝癌細胞接種マウスで、MTD S-1 に対し MC S-1 は副作用の出現なく、有意に高い腫瘍抑制効果・生存延長効果を認め、その効果は vandetanib の併用で増強した。腫瘍組織の MVD は MC S-1、vandetanib、MC S-1+vandetanib 群で著明に減少していた。MC S-1、MC S-1+vandetanib 群では TSP-1 の著明な増加を認めた。

【結論】S-1 を用いた MC は副作用なく高い抗腫瘍効果を示した。その作用機序には血管内皮細胞の増殖抑制効果と TSP-1 上昇による血管新生抑制効果があり、作用機序の異なる VEGFR-2 リン酸化阻害剤との併用でその治療効果は増強され、肝細胞癌に対する新しい治療戦略として期待できる。

46.

Stabilin2 の機能阻害による癌転移抑制効果の解析

廣瀬恵一¹、西條栄子²、菅野安喜³、坂井田 功¹、宮島 篤²

¹ 山口大学医学部 消化器病態内科学

² 東京大学分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野

³ 大阪鉄道病院 血液内科

【目的】我々はこれまでに肝類洞内皮細胞の特異的マーカー遺伝子として Stabilin2（以下 Stab2）を同定し報告してきた。Stab2 はヒアルロン酸に結合するスキャベンジャー受容体としての報告があるが生体内での機能は未知であった。そこで我々は Stab2 ノックアウトマウスを作成し Stab2 の機能解析を行った。

【方法】Stab2 ノックアウトマウスの病理組織学的解析、血液生化学検査等。癌細胞の転移試験。

【結果】作成したノックアウトマウスは正常に発生し、繁殖にも一切異常は見られなかったが、血清ヒアルロン酸濃度が劇的に上昇していた。Stab2 と同様にヒアルロン酸受容体である CD44 が多くの癌細胞で発現しているという報告に基づき、ノックアウトマウスに癌細胞株を移植した結果、ノックアウトマウスでは癌細胞の転移が有意に抑制された。さらに、Stab2 に対するモノクローナル抗体の腹腔内投与により、野生型マウスにおいてもノックアウトマウスと同様に、血清ヒアルロン酸濃度の上昇と癌細胞の転移抑制が確認された。次に、転移抑制の分子機構解析のため、ヒアルロン酸の癌細胞への影響を解析したところ、ヒアルロン酸により *in vitro* での細胞接着能が減少していることが示唆された。また、ノックアウトマウスでは移植後数時間における癌細胞の肺への接着が減少しており、抗体の腹腔内投与やヒアルロン酸の尾静脈投与でも癌細胞の肺への接着阻害が再現できた。

【結論】Stab2 が生体での主要なヒアルロン酸受容体であることが判明すると共に、高濃度の血清ヒアルロン酸が癌細胞の転移を抑制することが分かった。さらに、Stab2 の機能阻害抗体による癌転移抑制効果の臨床への応用が期待される。

MEMO
