

49. 肝細胞死亢進マウスを用いた肝幹細胞増殖因子の同定

中野 裕康

東邦大学 医学部 生化学講座

Key words : 非アルコール性脂肪性肝炎, 細胞死, コリン欠乏食, 肝幹細胞 (HPCs), cFLIP

緒 言

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は飲酒歴がないにもかかわらず脂肪肝と慢性の炎症が進展し、最終的には肝がんを発症する疾患である¹⁾。この病態には高カロリー食などによる脂肪肝に伴う血中の遊離脂肪酸や TNF α などの炎症性サイトカインの増加、また酸化ストレスの増大に伴う肝細胞死の亢進が根底にあると考えられる。慢性に持続する肝障害にもかかわらず、酸化ストレスなどにより成熟肝細胞の増殖が抑制された結果、hepatic progenitor cells (HPCs) の代償的な増加やそれに伴う偽胆管形成が認められ、これらの変化が肝臓の線維化や肝がんへの進展と相関することが報告されている。HPCs の増殖に関与する因子としては TWEAK、Wnt、FGF などのサイトカインが考えられている。しかし NASH 時に誘導される細胞死がアポトーシスだけなのか、あるいは細胞死に伴いどのような因子が放出され、これらの病態が形成されるかについては不明な点が多い。近い将来 B 型や C 型肝炎ウイルスなどによる肝炎や肝硬変が克服されると考えられることから、NASH の病態の解明とその治療法の開発は今後の医療分野における緊急の課題の一つと言える。

我々はこれまでにアセトアミノフェンによる肝障害モデルを用いて、死細胞から放出された IL-11 が周囲の肝細胞に作用し、組織修復に関与していることを初めて明らかにした²⁾。また一方で我々は肝細胞特異的な cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) 欠損マウスを樹立し、cFLIP 欠損肝細胞では TNF α 、FasL、TRAIL などのデスリガンドに対するアポトーシス感受性が亢進していることを報告した^{3,4)}。cFLIP は外因性アポトーシス実行に必須の因子であるカスパーゼ 8 に類似した構造を持っているが、プロテアーゼ活性を喪失していることから、カスパーゼ 8 に会合してアポトーシスをブロックすると考えられている⁵⁾。そこで本研究では肝細胞で細胞死の亢進している肝細胞特異的 cFLIP 欠損マウスに NASH に類似した病態を誘導し、肝死細胞の増加に伴い HPCs の増加や線維化および腫瘍形成が誘導されるかを検討する。次にマイクロアレイやメタボローム解析を用いて、死細胞から、あるいは死細胞由来因子に応答して周辺細胞から放出される新たな HPCs 増殖因子の同定を目指す。最後に NASH の進展を予測できるような新たな血清バイオマーカーの同定を目指す。

方法および結果

まず肝細胞特異的 cFLIP 欠損肝細胞では TNF α に対するアポトーシス感受性が亢進していることを確認した (図 1)。

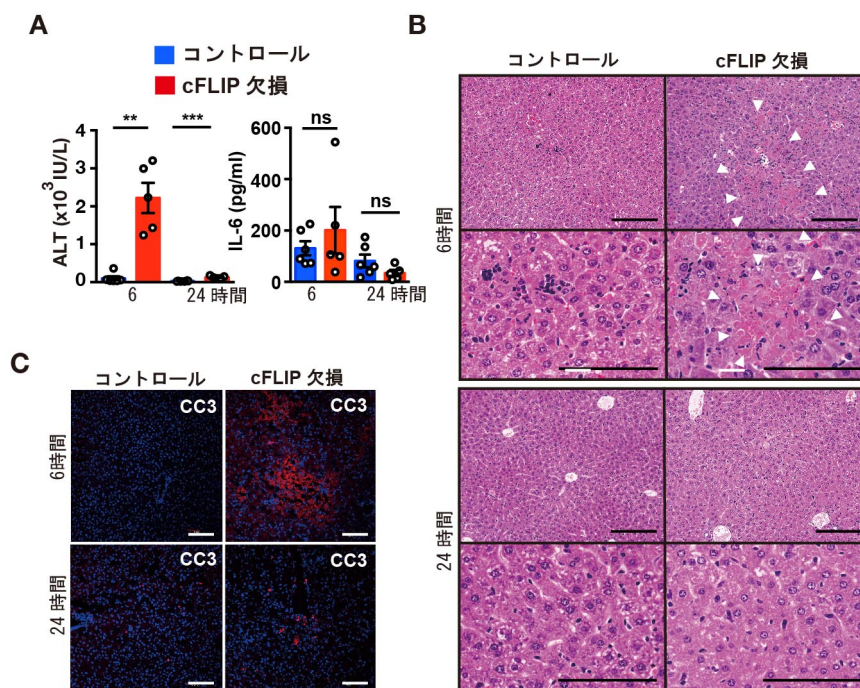


図1. cFLIP 欠損マウスでは少量の TNF α 投与により一過性の肝障害が誘導される。

(A) コントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスに TNF α (15 μ g/kg) を静脈投与し、6 時間および 24 時間後に採血して血中 ALT (IU/L) および IL-6 (pg/ml) を測定した。図は平均 \pm SEM (マウスは各群 5 匹)。検定は unpaired Student's *t* test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ns: 有意差なし。(B) TNF α 投与後 6 時間、24 時間後のコントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスの肝臓の HE 染色像 (マウスは各群 5 匹)。白矢印頭はアポトーシス細胞。Scale bar: 100 μ m。(C) TNF α 投与後 6 時間、24 時間後のコントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスの肝臓の活性化型カスパーゼ 3 抗体による免疫染色像 (マウスは各群 5 匹)。Scale bar: 100 μ m。

次に肝細胞特異的 cFLIP 欠損マウスにコリン欠乏食 + エチオニン水 (CDE 食) を投与し NASH モデルを作製した。肝細胞特異的 cFLIP 欠損マウスに CDE 食を短期間 (48 時間) 投与したところ、野生型マウスに比較して肝障害が増悪し、その傾向は 3 ~ 4 週間後においても認められた (図 2A)。また一部の cFLIP 欠損マウスは CDE 投与中に死亡することが明らかとなった (図 2B)。4 週間後に解剖したところ cFLIP 欠損マウスの肝臓には直径 5 mm 大の白色の結節が出現しており、再生結節あるいは前がん状態にあると考えられた (図 2C)。組織学的な検討では、HE 染色では肝細胞より小型の HPCs と考えられる細胞が cFLIP 欠損マウスの肝臓では著明に増加していた (図 2D)。肝臓内の線維化をアザン染色により評価したところ、肝細胞特異的 cFLIP 欠損マウスの肝臓で線維化の亢進が認められた (図 2E)。さらに胆管上皮細胞や HPCs のマーカーである Keratin 19 (CK19) 陽性細胞が著明に増加していた (図 2F)。以上のことから肝細胞死の亢進した cFLIPs 欠損では、CDE 投与による肝細胞死の促進に伴い HPCs の著明な増加が認められ、新たな HPCs 増殖因子を同定する上で適切なモデルと考えられた。

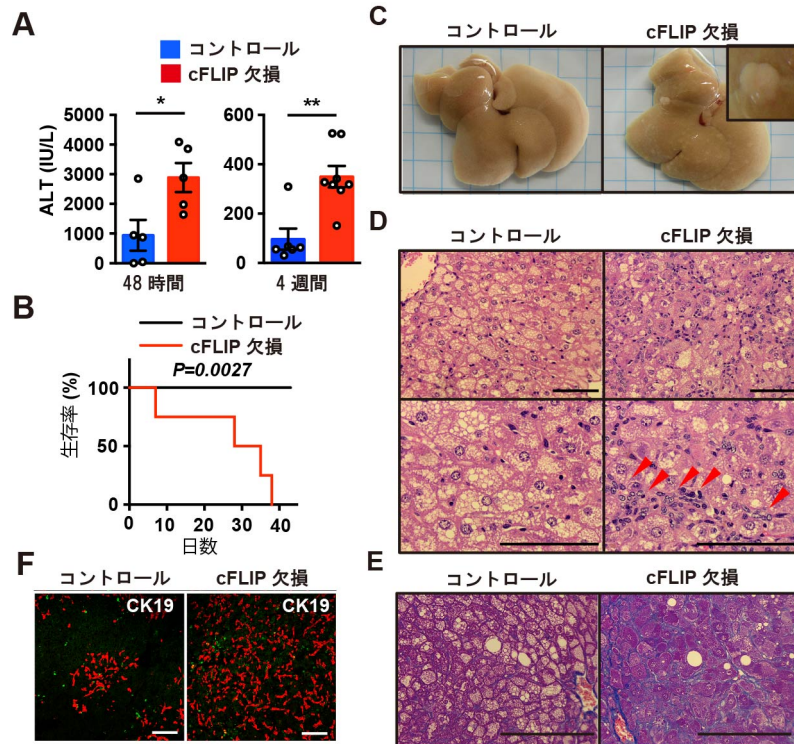


図2. CDE 投与により cFLIP 欠損マウスの肝臓では HPC の著明な増加が誘導される

(A) コントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスに CDE 食を投与し、48 時間後、4 週間後に採血し、ALT 値を測定。図は平均±SEM (マウスは各群 5-8 匹)。検定は unpaired Student's *t* test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(B) コントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスに CDE 食を投与した後の生存曲線。検定は Log-rank test. $P < 0.01$ 。(C) CDE 食 4 週間投与後の肝臓の肉眼所見。黒四角は肝臓の結節。(D) CDE 食 4 週間投与後の肝臓の HE 染色像 (マウスは各群 6-8 匹)。赤矢印頭は HPC を示す。Scale bar: 100 μ m。(E) CDE 食 4 週間投与後の肝臓の Azan 染色像 (青が線維化) (マウスは各群 3 匹)。Scale bar: 100 μ m。(F) CDE 食 4 週間投与後の肝臓凍結切片の CK19 による免疫染色像 (赤) (マウスは各群 3 匹)。Scale bar: 100 μ m。

そこで次に CDE 食投与後 4 週間の肝細胞から RNA を抽出し、肝再生に関与すると考えられるサイトカインをマイクロアレイ法を用いて解析し、その中の幾つかの遺伝子については qPCR により発現を確認した (図 3A)。HPCs が著明に増加していた cFLIP 欠損マウスの肝臓では、これまで HPCs を増殖させる因子として報告されている *Fgf7* の上昇が認められ⁶⁾、我々のモデルおよび解析の妥当性が示された。しかし、*Oncostatin M (Osm)*、*Tgfb1*、*Fgfl* などの遺伝子の発現に両群で差は認められなかった。そこで発現上昇の見られた遺伝子と HPC の増殖との因果関係を明らかにするために、Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法⁷⁾ により目的遺伝子を強制的に肝細胞で発現させることにした。まず cFLIP 欠損マウス肝臓で優位に発現上昇の見られた Gene a および c、また約半数の cFLIP 欠損マウスでは発現の亢進していた b、陰性コントロールとして d の 4 遺伝子をそれぞれ *Albumin* プロモーター下に組み込んだ発現ベクターを構築し、HTVi 法により野生型マウス肝臓で候補遺伝子を発現させた。3 週間後に肝臓を CK19 で免疫染色し HPCs の増殖が誘導されるかを検討した。その結果 4 種類の遺伝子のうちの二種類の遺伝子 a と b は図 3B のように HPCs を増加させていることが明らかとなった。

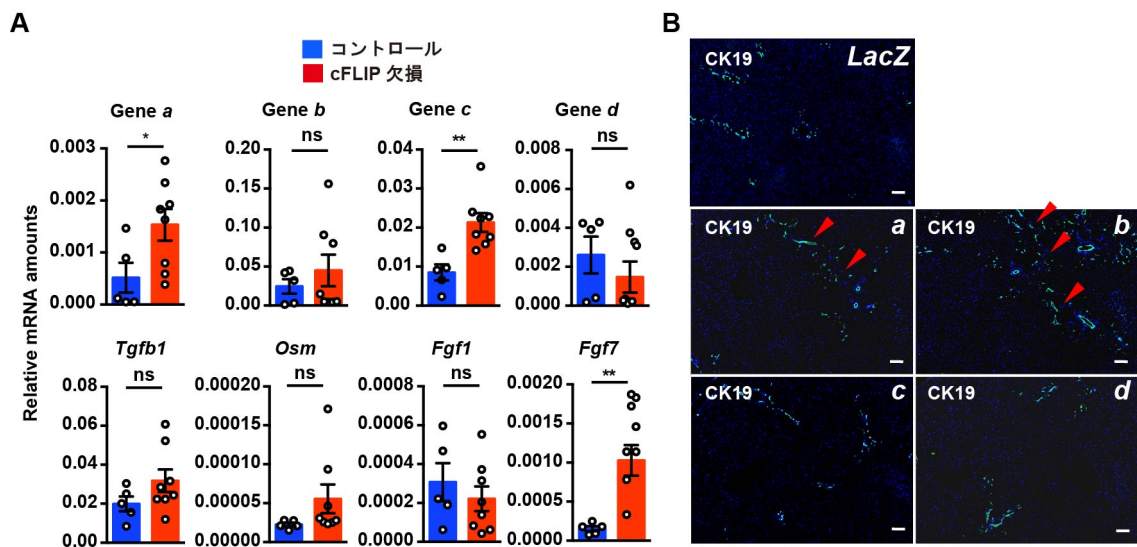


図3. CDE 投与 4 週間後のコントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスの肝臓における遺伝子発現解析
 (A) コントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスに CDE 食を投与し、4 週間後に肝臓を摘出し、RNA を抽出して qPCR を施行。図は平均 ± SEM (マウスは各群 5-8 匹)。検定は unpaired Student's *t* test. **P* < 0.05、***P* < 0.01、ns、有意差なし。(B) 野生型マウスに HTVi 法によりそれぞれの遺伝子の発現ベクターを静脈投与し、3 週間後に肝臓を摘出し、凍結切片を抗 CK19 抗体により免疫染色 (green)。白矢印頭は HPCs を示す。Scale bar; 100 μm.

最後に CDE の予後を予測できるようなバイオマーカーを検索するために、CDE 食投与のマウス血清を用いてメタボローム解析を行い (理化学研究所 環境資源科学開発センターの及川彰博士と共同研究)、HPCs の増加と相関するようなバイオマーカーを検討した。図 4 に示すように代謝産物 X、Y、Z は CDE 投与後 48 時間後には cFLIP 欠損マウス由来の血清で有意に上昇していたが、4 週間後には X と Y の二種類の代謝産物の上昇は維持されていた。

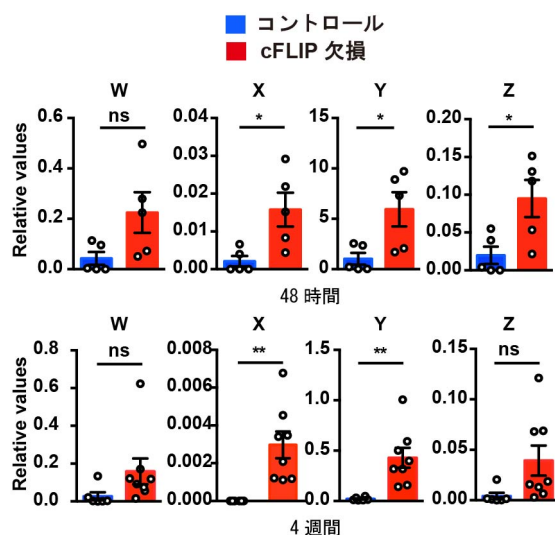


図4. CDE 投与 48 時間後および 4 週間後のメタボローム解析
 コントロールマウスおよび cFLIP 欠損マウスより血清を採取し、各種代謝産物 (W、X、Y、Z) の解析を CE-TOF MS を用いて行った。図は平均 ± SEM (マウスは各群 5-8 匹)。検定は unpaired Student's *t* test. **P* < 0.05、***P* < 0.01、ns、有意差なし。

考 察

肝臓特異的な cFLIP 欠損マウスに CDE を投与すると細胞死の亢進と相まって HPCs の顕著な増殖が誘導されることが明らかとなった。さらに遺伝子発現解析の結果および HTVi 法を用いた実験から、少なくとも遺伝子 a 及び b の二つはおそらく細胞死に伴い発現が上昇し、肝臓で過剰発現させることで HPC の増加を誘導できることが判明した。今後 HPCs を肝臓から分離し、遺伝子 a や b の産物と共培養することですること、HPCs の増殖が誘導されるかを検討する予定である。また細胞死に伴いどのようなシグナルが遺伝子 a や b の発現に関与するのか、肝臓に存在するどのような細胞が産生するのかについても検討する予定である。このような解析を通じて NASH の発病や NASH から肝臓癌への進展のさらなるメカニズムの解明が可能になると考えられる。また同定したバイオマーカーについては患者血清中でもマウスと同様に同じメタボライトが上昇しており、予後のマーカーになるかを検討する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東邦大学医学部生化学講座の土屋勇一講師、駒沢幸子技術員、国立国際医療研究センター研究所細胞組織再生医学研究部の田中稔室長、理化学研究所環境資源科学開発センターおよび山形大学農学部農産物生理化学分野の及川彰准教授である。最後にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Nov;10(11):656-65. doi: 10.1038/nrgastro.2013.183. Epub 2013 Oct 1. PMID: 24080776.
- 2) Nishina T, Komazawa-Sakon S, Yanaka S, Piao X, Zheng DM, Piao JH, Kojima Y, Yamashina S, Sano E, Putoczki T, Doi T, Ueno T, Ezaki J, Ushio H, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal*. 2012 Jan 17;5(207):ra5. doi: 10.1126/scisignal.2002056. PMID: 22253262.
- 3) Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Koike M, Piao JH, Ehlken H, Kurihara H, Hara M, Van Rooijen N, Schütz G, Ohmuraya M, Uchiyama Y, Yagita H, Okumura K, He YW, Nakano H. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. *Sci Signal*. 2012 Dec 18;5(255):ra93. doi: 10.1126/scisignal.2003558. PMID: 23250397.
- 4) Piao X, Yamazaki S, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Nakabayashi O, Kurosawa T, Mikami T, Tanaka M, Rooijen NV, Ohmuraya M, Oikawa A, Kojima Y, Kakuta S, Uchiyama Y, Tanaka M, Nakano H. Depletion of myeloid cells exacerbates hepatitis and induces an aberrant increase in histone H3 in mouse serum. *Hepatology*. 2016 Oct 22. doi: 10.1002/hep.28878. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27770461.
- 5) Nakano H, Piao X, Shindo R, Komazawa-Sakon S. Cellular FLICE-Inhibitory Protein Regulates Tissue Homeostasis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015 Jul 10. [Epub ahead of print]. PMID: 26160013.
- 6) Takase HM, Itoh T, Ino S, Wang T, Koji T, Akira S, Takikawa Y, Miyajima A. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev*. 2013 Jan 15;27(2):169-81. doi: 10.1101/gad.204776.112. Epub 2013 Jan 15. PMID: 23322300.
- 7) Sawyer GJ, Rela M, Davenport M, Whitehorne M, Zhang X, Fabre JW. Hydrodynamic gene delivery to the liver: theoretical and practical issues for clinical application. *Curr Gene Ther*. 2009 Apr;9(2):128-35. PMID: 19355870.