

課題番号 : 29指1005

研究課題名 : オンコスタチンMを軸とした肝線維化の新規の診断、予防、治療法の開発

主任研究者名 : 田中 稔

分担研究者名 :

キーワード : 肝マクロファージ、肝星細胞、細胞間相互作用

研究成果 :

初年度は肝臓の線維化における肝マクロファージの役割に焦点を当て、免疫染色やFACS解析、遺伝子発現解析、肝星細胞との共培養系による解析を中心に行った。まず、マウス肝臓よりF4/80陽性のマクロファージを分離し、肝星細胞と共培養系を構築し、オンコスタチンM(OSM)を添加した結果、OSM依存的にコラーゲン及びTimp1の誘導が認められた。よって、OSMの肝マクロファージに対する作用が肝星細胞の活性化に重要であることが示された。実際に、F4/80陽性細胞をin vitroで刺激すると、線維化関連因子であるTGF β 1とPDGFの発現が誘導されることが示された。次に、in vivoにおけるマクロファージの作用を調べるために、チオアセタミドの12週間の飲水投与による慢性肝障害モデルまたはOSMのHTVi法による新規肝線維化モデルを用いて、マウスの肝臓に線維化を誘導した。線維肝に対してマクロファージマーカーであるF4/80とコラーゲン抗体を用いて共染色を行った結果、線維化部位に多数のマクロファージが集積している像が観察された。さらに、CD11bとコラーゲン抗体による共染色を行った結果、線維化部位のF4/80陽性の大部分がCD11b強陽性のマクロファージであることが明らかとなった。一方、線維化部位以外のF4/80陽性細胞のマクロファージの多くは、この染色条件ではCD11bが染色されないクッパー細胞であることが分かった。さらに、常在性マクロファージであるクッパー細胞と骨髄由来の単球・マクロファージに分けた上で、それぞれの特徴について検討を行った。まず、肝臓より調製した非実質細胞をFACS解析によりクッパー細胞(CD45陽性、Ly6G陰性、F4/80強陽性、CD11b弱陽性)と単球・マクロファージ(CD45陽性、Ly6G陰性、F4/80弱陽性、CD11b強陽性)に分離して回収した。OSM-HTViマウスとControl-HTViマウスよりそれぞれ回収したクッパー細胞と単球・マクロファージの遺伝子発現を比較した結果、クッパー細胞と単球・マクロファージの両方でOSMによるTGF β 1誘導が認められた。一方、慢性肝障害モデルを施した野生型マウスとOSM KOマウスを用いて、同様の実験を行った結果、単球・マクロファージでのみOSMの応答性が認められた。以上の結果は、クッパー細胞よりも骨髄由来の単球・マクロファージの方が、OSMによる肝線維化には重要な役割を果たしていることを示唆した。これらの成果は学術論文として報告した(Matsuda et al. *Hepatology* 67(1):296-312, 2018)。また、OSM誘導性の新規線維化関連遺伝子を探索するために、肝線維化モデルを施した野生型マウスとOSM KOマウスよりそれぞれ調製したクッパー細胞および単球・マクロファージを次世代シーケンサーによるRNAseq解析に供した。現在、解析を行っている途中であり、有望な遺伝子については順次、マウスを用いたHTVi法による線維化の検証や、分担研究者と協力してヒトサンプルでの発現比較解析を進める予定である。

Subject No. : 29指1005

Title : 慢性肝炎における細胞間相互連関に基づく肝硬変の新規診断・治療法の開発 (Development of novel diagnostic and treatment procedure for liver fibrosis based on cell-cell interaction under chronic hepatitis)

Researchers : Tatsuya Kanto, Makoto Tokuhara, Atsushi Miyajima

Key word : Oncostatin M, hepatic macrophage, cell-cell interaction, neutrophil

Abstract :

To develop novel diagnostic and therapeutic methods for liver fibrosis, it is important to understand the mechanisms underlying the balance of fibrogenesis and fibrolysis in the liver. To address the issue, we focused on the cell-cell interaction between hepatic macrophage (HM) and hepatic stellate cell (HSC), which is relevant to the excess production of collagens. We have previously identified Oncostatin M (OSM) as a strong inducer of liver fibrosis, and established a novel murine model of liver fibrosis by Hydrodynamic tail vein injection (HTVi)-mediated overexpression of OSM in the liver. By using such fibrosis model, we performed immunohistochemistry, FACS analysis, gene expression analysis and co-culture of HMs and HSCs. Consequently, we have revealed that bone marrow derived monocyte/macrophage is critical for liver fibrogenesis rather than liver resident macrophage, Kupffer cell. These works have been published in *Hepatology*.

By contrast, Dr. Miyajima's group showed that neutrophil played a crucial role for fibrolysis in the process of healing. The adoptive transfer of neutrophil into the fibrotic liver induced by repeated administration of carbon tetrachloride markedly reduced fibrosis area. They also showed that matrix metalloproteinase (Mmp)-8, 9 were highly expressed in isolated neutrophils. Overexpression of Mmp8 and Mmp9 in the liver by using adeno-associated virus alleviated liver fibrosis. These results demonstrated a beneficial role of neutrophils in chronic liver injury by promoting fibrolysis. These works have been published in *Hepatology communications*.

Dr. Kanto's group measured the serum concentration of OSM in patients with liver diseases by ELISA to evaluate OSM as a diagnostic biomarker. They tested the serum of 70 patients linked to Fibrosis-4 (FIB-4) index and 10 healthy volunteers. However, most of samples showed undetectable results. Six samples ranging from 4.648 to 26.354 pg/mL were all derived from patients but not healthy volunteers, although the correlation between OSM concentration and fibrosis degree was not evident at present. Considering the low concentration of OSM in the serum, it seems not to be adequate for a diagnostic biomarker. Therefore, the other candidate molecules induced by OSM will be measured in the next plans.

Dr. Tokuhara's group performed immunostaining of specimens derived from patients of liver diseases. The resected samples at operation was used for analysis after the acquisition of informed consent. They showed that OSM was clearly expressed in the fibrotic liver. In addition, immunostaining of myeloid cell marker (CD68) demonstrated that many macrophages existed in the fibrotic liver. Further analysis of co-staining will provide new insights into the involvement of macrophage in the progression of liver fibrosis.

課題番号 : 29指1005
研究課題名 : ヒト肝疾患の臨床検体を用いた線維化診断マーカーの評価
主任研究者名 :
分担研究者名 : 考藤 達哉

キーワード : 血清、ELISA、FIB-4

研究成果 :

初年度は、バイオバンク事業において肝疾患で登録された検体等を活用し、肝線維化関連の候補分子の血中濃度を測定し、肝硬度との相関について検討する計画であった。そのためにまず、倫理審査委員会に対して、本研究内容を申し出て承認を得た。本研究課題の中心となるオンコスタチンM(OSM)について、まずELISAによる血中濃度の測定を試みた。ELISAキットとしては、Thermo Scientific社のHuman Oncostatin M ELISA kitを使用した。Fibrosis-4 (FIB-4) indexが紐付けされたHBV+慢性肝炎検体5例、HCV+慢性肝炎検体10例、NAFLD慢性肝炎検体10例、HBV+肝硬変検体5例、HCV+肝硬変検体10例、NAFLD肝硬変検体10例、HCV+HCC検体10例、NAFLD-HCC検体10例、健常成人検体10例の計80サンプルについて検討を行ったが、大部分のサンプルでは検出限界以下であった。4.648-26.354 pg/mLの範囲で測定できた6検体については、いずれも肝炎患者の検体であったが、FIB-4との明確な相関性は認められていない。キットの感度の問題もあるが、慢性肝炎、肝硬変となるにつれて上昇するOSMと同じファミリーメンバーであるIL-6と比べると、OSMは線維化進行過程でも血中濃度がそれほど高くない可能性が考えられた。主任研究者の田中らの論文からOSMは線維化部位での局所濃度が重要であることが示唆されていることから、今後はOSM誘導性の他の候補分子について、バイオバンク検体等を活用し、ELISAによる血中濃度の測定と肝硬度評価との整合性を引き続き検証する予定である。

課題番号 : 29指1005
研究課題名 : ヒト肝疾患の臨床検体の提供とマクロファージ系細胞の動態解析
主任研究者名 :
分担研究者名 : 徳原真

キーワード : マクロファージ、線維、サイトカイン、CD68
研究成果 :

初年度は肝疾患患者の手術検体を用いて、免疫細胞の所在や OSM 関連分子の発現を免疫組織化学的染色法により評価する計画であった。そのためにはまず、倫理審査委員会に対して、本研究内容の申し出を行ない、承認を得た。正常肝～慢性肝炎の肝切除後の手術検体の目標解析数は初年度は 5 例としたが、7 例を解析することができた。(方法) 肝検体を凍結保存した後、クライオスタットで 8.0 μm 厚で複数枚切り出し、各々スライドガラスに張りつけ風乾し、連続切片標本として組織学的解析を行った。肝線維化はシリウスレッド染色で評価した。OSM, OSM 受容体発現細胞、肝マクロファージ、肝星細胞の同定は免疫染色で行った。免疫染色には 2 種類の固定法 (4%PFA および冷アセトン) と複数の分子特異的抗体で染色条件を検討した。(結果) シリウスレッド染色では全ての症例で肝門脈周囲の線維を、ほぼ全ての症例で門脈-門脈間の線維架橋を、また一部の症例で門脈-中心静脈の線維架橋を認めた。免疫染色の組織固定法の検討では、抗 OSM 抗体、CD68 抗体ともに PFA 固定法よりアセトン固定法の方が良好であった。OSM 発現細胞は全ての検体で検出できたが、陽性細胞数は症例によりばらつきがあった。OSM 受容体は今回使用した抗体、固定法では局在が確定できなかった。免疫細胞の同定には、汎マクロファージマーカーである CD68 を用いた。CD68 陽性細胞は PFA 固定よりもアセトン固定でより良く検出できた。CD68 陽性細胞は肝臓実質の非線維部と線維部の両方に分布していた。(考察) 今回、慢性肝炎患者からの検体の組織学的解析により、線維化、マクロファージ、OSM 陽性細胞を検出することができた。しかし今回検討した抗 OSM, 抗 CD68 抗体のうち検出が良好であった抗体は免疫動物がいずれもラットであり共染色は困難であった。OSM 発現細胞種の同定には、さらなる各種肝構成細胞特異的マーカーを検討した上で、抗 OSM 抗体との共染色を行う必要が有る。また OSM 陽性細胞数は症例によりばらつきが有るように見えたが、OSM 発現細胞数と、背景疾患や線維化のステージとの相関性は、今後更に検討数を増やした解析が必要と考える。また、OSM 受容体については、今後別の抗体と固定法の検討、あるいは FACS による解析が必要と考える。

課題番号 : 29指1005

研究課題名 : 線維溶解における血液細胞の機能解析と肝硬変治療への応用

主任研究者名 :

分担研究者名 : 宮島 篤

キーワード : 好中球、マトリックスメタロプロテアーゼ、アデノ随伴ウイルスベクター

研究成果 :

これまでに、Tribble 1 (Trb1)欠損マウスでは好中球が増加していること、四塩化炭素頻回投与による慢性肝障害後に肝線維化が軽減していること、Trb1欠損マウスの好中球を移植すると線維化が軽減することを見出していた。初年度は好中球が肝内に蓄積した線維の溶解に寄与するとの仮説に基づき、様々な検証実験を行った。まず、野生型の骨髄由来好中球を肝線維化モデルに養子移植した結果、Trb1欠損好中球を移植した時と同様に肝線維化が軽減されたことから、好中球には本来線維を溶解する能力が備わっていることが強く示唆された。また、単離した好中球の遺伝子発現解析を行った結果、野生型、Trb1欠損の好中球はともにマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-8、9を高発現していたことから、MMP-8と9が線維の溶解に寄与したものと考えられた。そこで、2年度目の計画を前倒しして、MMP-8と9のcDNAを組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)をそれぞれ作製し、四塩化炭素頻回投与モデルで作製した線維肝に感染、発現させたところ、MMP-8とMMP-9の単独発現でも有意な線維化の軽減が認められ、MMP-8と-9の同時発現では相加的な線維溶解が認められた。以上の結果は、様々な炎症疾患において好中球は増悪を担う存在であるという従来の考え方を覆すものであり、慢性肝障害においては線維の溶解を介して肝線維化の軽減に寄与するという新しい概念が提唱された。これらの成果は学術論文の一部として発表を行った(Saijou et al. *Hepatology Communications* 2(6), 703-717, 2018)。

研究概要

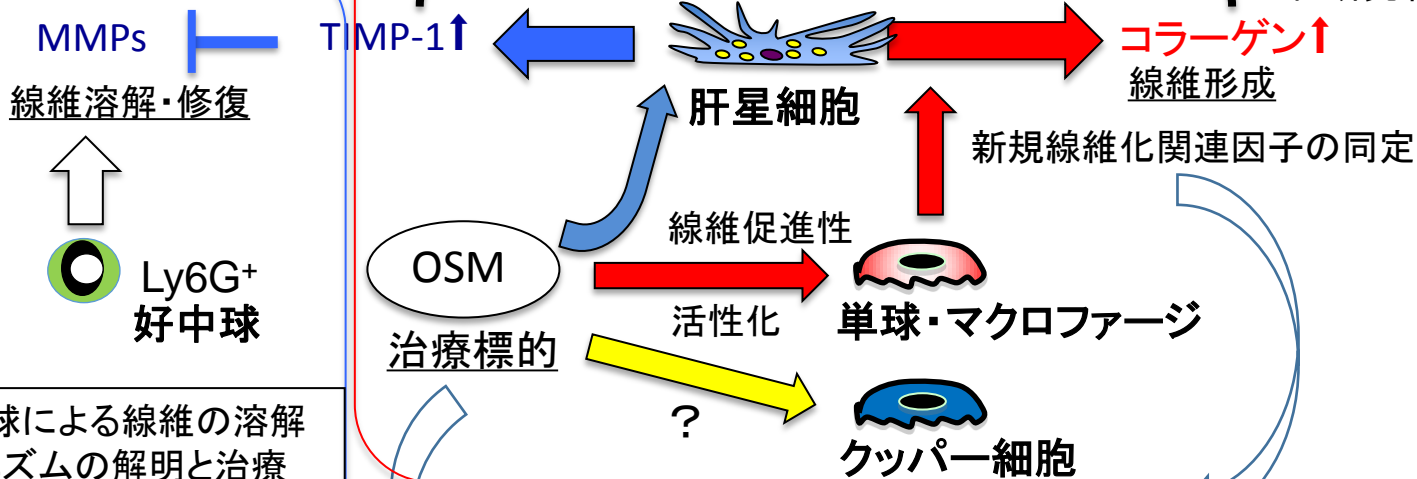
本研究では、肝線維化の発症機序を細胞間相互作用に基づいて解明することを第一の目的とし、得られた知見を肝線維化に対する新規の診断、予防、治療法の開発へ応用することを目指す。マウスを用いた実験から強力な肝線維化作用を示す因子として見出したオンコスタチンM(OSM)を中心に、肝星細胞と免疫細胞との細胞間相互作用に焦点を当て解析を進める。また、動物実験から得られた情報については、ヒト検体を用いて検証し、治療戦略の妥当性について評価する。

概念図と分担する課題内容

線維の溶解阻害と産生亢進による線維蓄積

肝マクロファージ-肝星細胞間相互作用に基づくOSMの肝線維化メカニズムの解明

主任研究者: 田中(戸山研究所)



好中球による線維の溶解メカニズムの解明と治療への応用の可能性の検証

分担研究者: 宮島(東大)

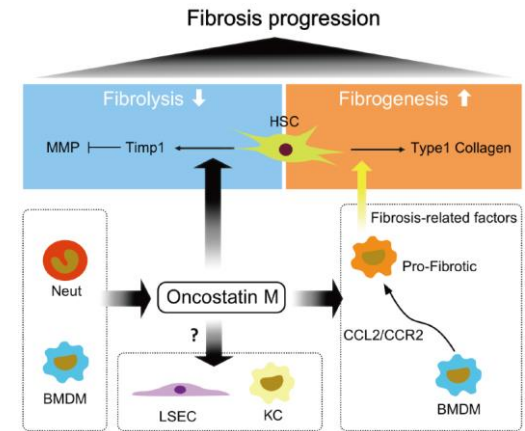
ヒト検体を用いた診断・治療標的としての評価と検証

分担研究者: 考藤(国府台・肝炎センター) 血清の解析
分担研究者: 徳原、竹村(センター病院) 組織の解析

実施内容

主任研究者: 田中 稔

初年度は肝臓の線維化における肝マクロファージの役割に焦点を当て、免疫染色やFACS解析、遺伝子発現解析、肝星細胞との共培養系による解析を中心に行った。オンコスタチンM(OSM)による線維化作用はクッパー細胞よりも骨髄由来の単球・マクロファージに対して強く発揮されている可能性が示された。よって、OSMと骨髄由来マクロファージが治療標的として有望であることが示された。これらの成果は本研究課題が提案する概念(右図)を実証する上で、極めて重要な結果となるものであり、学術論文として報告を行った(Matsuda et al. *Hepatology* 67(1):296-312, 2018)。



Matsuda et al. *Hepatology* 2018

分担研究者: 考藤達哉

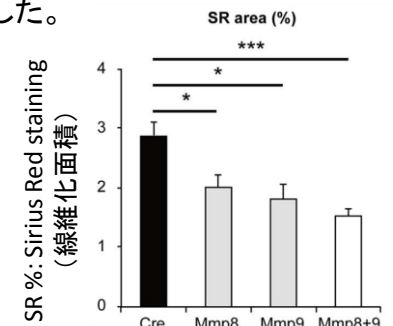
初年度は、バイオバンク事業において肝疾患で登録された検体等を活用して、オンコスタチンM(OSM)の血中濃度をELISAで測定し、肝硬度との相関について検討した。そのために、倫理審査委員会に対して、本研究内容を申し出て承認を得た。Fibrosis-4 (FIB-4) indexが紐付けされたHBV+慢性肝炎検体5例、HCV+慢性肝炎検体10例、NAFLD慢性肝炎検体10例、HBV+肝硬変検体5例、HCV+肝硬変検体10例、NAFLD肝硬変検体10例、HCV+HCC検体10例、NAFLD-HCC検体10例、健常成人検体10例の計80サンプルについて検討を行った。その結果、大部分のサンプルでは検出限界以下であったが、4.648-26.354 pg/mLの範囲で測定できた6検体については、いずれも肝炎患者の検体であった。しかしながら、FIB-4との明確な相関性は認められなかった。今後はOSM誘導性の他の候補分子について、バイオバンク検体等を活用し、ELISAによる血中濃度の測定と肝硬度評価との整合性を引き続き検証する。

分担研究者: 徳原 真

初年度は肝疾患患者の手術検体を用いて、免疫細胞の所在やOSM関連分子の発現を免疫組織化学的染色法により評価する計画であった。そのため、倫理審査委員会に対して、本研究内容の申し出を行ない、承認を得た。正常肝～慢性肝炎の肝切除後の手術検体の目標解析数は5例であったが、7例を解析することができた。シリウスレッド染色による線維化部位の評価を行った。また、抗OSM抗体、CD68抗体を用いた蛍光免疫染色により、OSM産生細胞とマクロファージの存在部位を確認した。

分担研究者: 宮島 篤

初年度は野生型の骨髄由来好中球を肝線維化モデルに養子移植し、肝線維化が軽減されることを明らかにした。また、野生型とTrb1欠損マウスから単離した好中球の遺伝子発現解析を行なった結果、ともにマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-8、9を高発現していた。さらに、2年度目の計画を前倒しして、MMP-8と9のcDNAを組み込んだアデノ随伴ウイルスベクター(AAV)をそれぞれ作製し、四塩化炭素頻回投与モデルで作製した線維肝に感染、発現させたところ、有意な線維化面積の減少が認められた(右図)。これらの結果は、好中球が線維の溶解を介して肝線維化の軽減に寄与していることを示すものであり、その成果は学術論文に発表した(Saijou et al. *Hepatol. Commun* 2(6),703-717,2018)。



Saijou et al. *Hepatol. Commun* 2018
一部改変

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指1005

研究課題名： 慢性肝炎における細胞間相互連関に基づく肝硬変の新規診断・治療法の開発

主任研究者名： 田中 稔

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Oncostatin M causes liver fibrosis by regulating cooperatio between hepatic stellate cells and macrophages in mice.	Matsuda M, Tsurusaki S, Miyata N, Saijou E, Okochi H, Miyajima A, Tanaka M.	Hepatology	67(1)	2018
Neutrophil alleviate fibrosis in the CCl4-induced mouse chronic liver injury model.	Saijou E, Enomoto Y, Matsuda M, Yuet-Yin Kok C, Akira S, Tanaka M, Miyajima A.	Hepatology Communications	2(6)	2018

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Oncostatin M regulates the role of macrophage during progression and resolution of hepatic fibrosis.	Matsuda M, Miyajima A, Tanaka M.	EASL The International Liver Congress 2018	Paris, France	2018年4月
オンコスタチンMは肝星細胞とマクロファージの相互作用を介して肝線維化を誘導する	田中稔、松田道隆、宮島篤	第31回肝類洞壁細胞研究会学術集会	三重	2017年11月
肝線維化におけるオンコスタチンMとマクロファージの役割	田中稔	第2回Fibrosis	名古屋	2018年2月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。