

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08475

研究課題名(和文) 急性肝不全救命に向けた成熟肝細胞の至適増殖環境の解明

研究課題名(英文) Investigation of an optimal environment for the proliferation of mature hepatocytes toward the rescue of acute liver failure patients

研究代表者

滝川 康裕 (Takikawa, Yasuhiro)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：50254751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：急性肝不全は血液浄化療法や肝臓移植など多大な医療・経済資源が投じられるが、内科的救命率は未だに30%程度と低く、最大の原因は肝再生不全にある。当該研究は、血液浄化療法で肝再生環境を整えて内科救命率を向上させるために、再生不全の原因物質とその機序を突き止めることを目的として立案された。臨床的・基礎的研究の結果、IL-8に代表される炎症物質が肝細胞の増殖、分化を妨げていることが判明した。さらに、再生不全の特徴である細胆管反応という現象とVEGFを介した血管新生に強く依存していることも明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当該研究の結果、急性肝不全における肝再生不全を克服するための治療標的物質がIL-8をはじめとした炎症性サイトカインであることが明らかになった。一方で、肝細胞脱落に対する防御反応と考えられている細胆管反応を血管新生が強く支えていることが判明した。当該研究の成果は、肝再生妨害因子の同定のみならず再生促進機構の一部を解明したことから、肝再生不全克服のための臨床的な方向性と標的を示したと言える。

研究成果の概要(英文)：The survival rate of acute liver failure (ALF) patients still remains around 30% without liver transplantation. The main reason for that is impaired liver regeneration. This study aimed to increase the survival rate by improving the liver-regenerating environment in ALF patients using the blood-purifying system. This study revealed that IL-8 and other inflammatory cytokines disturbed hepatocyte proliferation and differentiation and that the bile-ductular reaction, a feature of impaired liver regeneration, depends on the capillary proliferation through VEGF signal.

研究分野：消化器内科学

キーワード：急性肝不全 肝再生 サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常肝は旺盛な再生能力を持つにもかかわらず、障害肝では肝再生不全がしばしば致命的な結果をもたらす。応募者はこれまで急性肝不全の内科的救命率向上のため、血液浄化により肝の至適再生環境を達成することを最終目的として、臨床的に人工肝補助機器の開発を行う一方で、基礎的に肝前駆細胞の増殖機序の研究を行ってきた。これまで重症肝障害例では未分化な肝細胞（肝前駆細胞）が増殖しており、そのシグナルは ATP P2Y 受容体, TNF 受容体から, JNK, ATF2 に伝達されることを明らかにしたが、この微小環境は機能（成熟）肝細胞の増殖を抑制することも判明した。この所見は、急性肝不全における肝再生不全の特徴（肝細胞再生不全と細胆管反応いわゆる偽胆管形成）を *in vitro* で再現していると考えられた。さらに、この現象を惹起する患者血漿中の因子候補として IL-8 が想定された。本研究の最終目的を達成するためには次の段階として、IL-8 を中心とする肝細胞増殖関連因子の分子機構と細胆管反応機構の解明が必要と認識された。

2. 研究の目的

- 1) 急性肝不全に陥った肝の微小環境下で、IL-8 を中心とした肝細胞増殖関連因子の分子機構の解明を目的とした
- 2) 研究の過程で IL-8 が細胆管反応の原因となる可能性が認められたことから、細胆管増殖と血管新生との関連を形態学的に解析することを目的とした。

3. 研究の方法

I. IL-8がマウス成熟肝細胞、肝前駆細胞の増殖シグナルに与える影響

成熟肝細胞：マウス分化細胞株(AML12)およびマウス初代培養肝細胞（PHC）

肝前駆細胞：肝幹・前駆細胞株（HSPC）

- 1) 成熟肝細胞、肝前駆細胞の増殖に対する IL-8の増殖促進・抑制活性の確認
マウス IL-8として、Keratinocyte Chemoattractant (KC)および Macrophage inflammatory Protein-2 (MIP-2)を用い、AML12、PHC、HSPC各細胞を刺激し、細胞数の変化を MTT assay で評価。KC、MIP-2の各受容体 CXCR1、CXCR2の抗体を用いて、増殖促進、抑制活性の IL-8依存性を確認する。
上記実験を JNK阻害薬 SP600125存在下に実施。増殖促進・抑制活性が JNK依存性であることを確認する。
- 2) 成熟肝細胞、肝前駆細胞の IL-8の増殖促進・抑制活性とそのシグナルの確認
KC、MIP-2を用いて AML12、HPC、HSPC各細胞を刺激し、JNK c-jun, smad2, MKK4, MKK7, ATF, Cyclin D1 のリン酸化を計測する(BioPlex, Western blotting: WB)。また、Sry HMG box protein 9(Sox9)などの分化マーカーの遺伝子発現、蛋白発現を確認する。

II. マウス細胆管反応モデルによる細胆管反応機構の形態学的解析

0.1% DDC 給餌 C57BL/6J マウスの肝凍結標本の厚切り切片を用いて、臓器透明化手法と蛍光免疫染色を組み合わせることで胆管と血管の 3 次元構造解析を行なう。また、DDC 給餌中に血管新生阻害薬である vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) 阻害剤 (VEGFR-2 中和抗体) を投与し、血管新生抑制の影響も解析する。

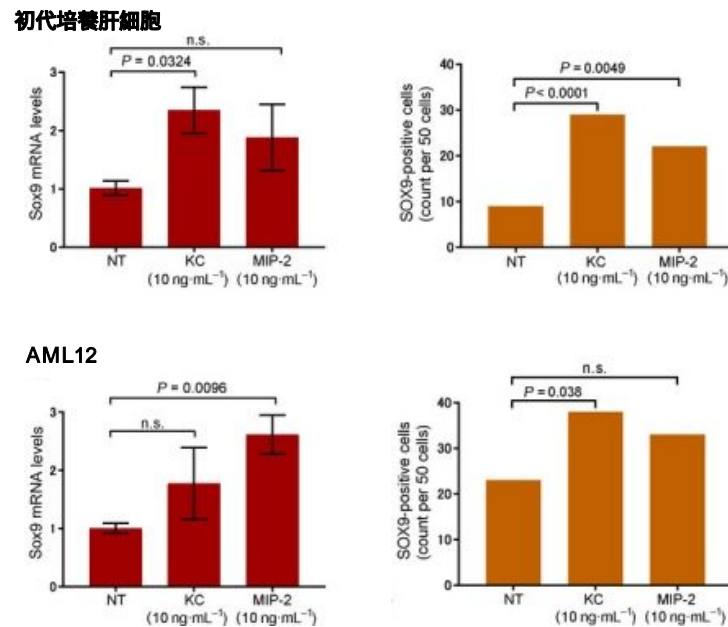
4. 研究成果

1) マウスの成熟肝細胞および肝前駆細胞の増殖に対する IL-8 の関与

- (1) 急性肝不全患者 37 検体の保存血漿を対象に、ヒトサイトカインスクリーニングパネルで同定した Interleukin(IL)-8 について、IL-8 がマウス成熟肝細胞株(AML12)と肝前駆細胞の増殖能に及ぼす影響を解析した。IL-8 のマウス homologue である、KC、MIP-2 は AML12 の

増殖を抑制する一方で、肝前駆細胞の増殖を促進した。また、AML12 と初代培養肝細胞に対して KC、MIP-2 を至適条件で添加培養した。その結果、AML12、初代培養肝細胞とも胆管上皮細胞のマーカーである Sox9 の遺伝子発現、蛋白発現が上昇することが明らかとなった(図 1)。この結果は、IL-8 は肝細胞の増殖を抑制するとともに、胆管上皮細胞への分化転換を誘導することを示している。

図 1. IL-8 による Sox9 の発現誘導



(2) ヒト急性肝障害患者の肝生検組織の解析では、肝生検時に IL-8 が高値であったことを確認した症例で、肝細胞マーカーである HNF4 と SOX9 両陽性の細胞が増加していることが明らかとなった。以上の結果から、急性肝不全における肝細胞再生不全の特徴とされる細胆管反応の機序として、IL-8 をはじめとした局所の炎症性サイトカインの関与が明らかとなった。

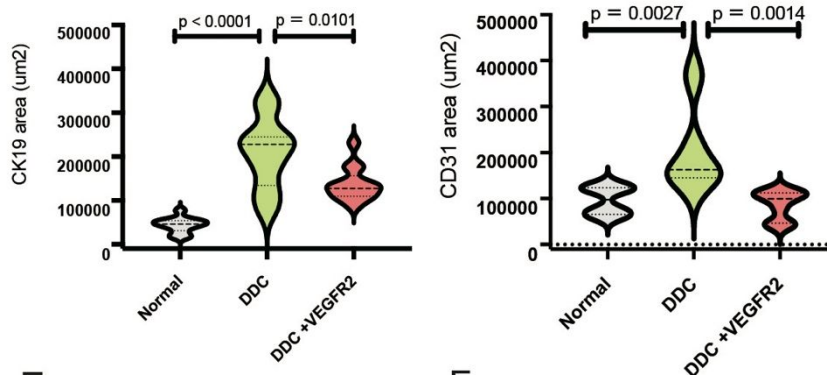
2) 細胆管反応における胆管増生と血管新生の構造解析

本研究の最終目的である肝局所の肝細胞増殖環境を人工肝補助により達成するために、次の段階として、動物実験で細胆管増殖を支持していると想定される血管構築を形態学的に解析した。細胆管反応モデルとして DDC 投与マウスを用いて、臓器透明化手法と免疫組織化学染色を組み合わせ、3 次元的構造解析を行った。

- (1) 200 μ m の厚切り切片で 3 次元的構造解析を行うことで、胆管および血管の連続性を明瞭に描出し、それぞれの構造および位置関係を詳細に観察することが可能となった。
- (2) DDC 障害肝において、門脈系の血管が肝小葉内に伸長し、胆管増生は形成された血管に伴走して存在していた。
- (3) VEGFR-2 中和抗体投与下における DDC 障害肝では血管新生の抑制と共に、胆管増生も抑制された。
- (4) NIS-Elements AR ソフトウェアを用いた定量解析では、DDC 障害肝群は正常肝群と比較し、胆管面積の増加に加えて、血管面積、血管分岐点および血管分枝数のいずれにおいても有意差をもって増加した。

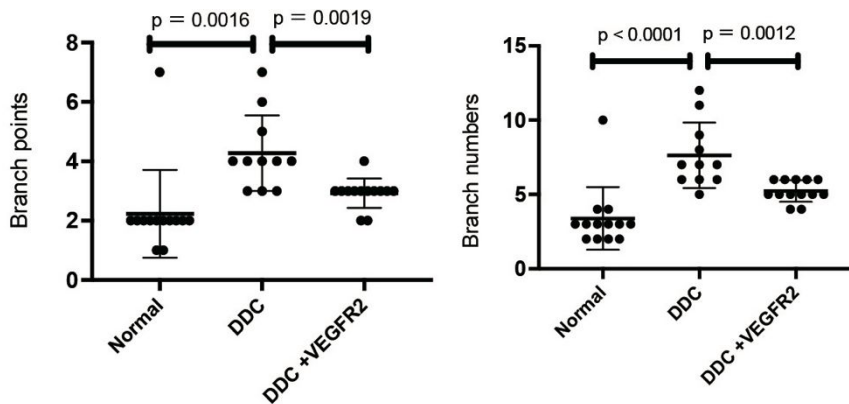
- (5) VEGFR-2 中和抗体投与下における DDC 障害肝群は DDC 障害肝群と比較して、胆管面積の減少に加えて、血管面積、血管分岐点および血管分枝数のいずれにおいても有意差をもって減少した。その結果、新生胆管には CD31 陽性の新生血管が伴走し、しかも、VEGFR-2 受容体阻害を用いて血管新生を抑制すると細胆管増生も抑制されることが明らかとなった（図 2,3）。

図 2. VEGF 受容体阻害による胆管、血管増生の抑制



CK19 area は、胆管面積を、CD31 area は血管面積を示す。

図 3. CD31 免疫組織化学染色で認識した血管の分岐点と分枝数の差



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kuroda Hidekatsu, Abe Tamami, Fujiwara Yudai, Nagasawa Tomoaki, Suzuki Yuji, Kakisaka Keisuke, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 73
2. 論文標題 Contrast Enhanced Ultrasonography?Based Hepatic Perfusion for Early Prediction of Prognosis in Acute Liver Failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 2455 ~ 2467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31615	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kakisaka Keisuke, Suzuki Yuji, Abe Hiroaki, Eto Hisashi, Kanazawa Jo, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Serum alpha-fetoprotein increases prior to fibrosis resolution in a patient with acute liver failure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-021-01467-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kakisaka Keisuke, Suzuki Yuji, Takahashi Fumiaki, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Referral system has a diminished difference in the risk for hepatic encephalopathy development among each etiology in patients with acute liver injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 401 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13744	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Yuji, Kakisaka Keisuke, Sato Takuro, Mikami Ryouichi, Abe Hiroaki, Sasaki Tokio, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Tc-99m GSA scintigraphy within the first 3?days after admission as an early predictor of outcome in severe acute liver injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92058-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 阿部弘昭, 鈴木悠地, 村嶋亜紀, 柿坂啓介, 宮坂昭生, 佐々木登希夫, 木村英二, 人見次郎, 滝川康裕	4. 巻 -
2. 論文標題 肝障害時における胆管増生と血管新生の3次元的構造解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takikawa Yasuhiro, Kakisaka Keisuke, Suzuki Yuji, Ido Akio, Shimamura Tsuyoshi, Nishida Osamu, Oda Shigeto, Shimosegawa Tooru	4. 巻 51
2. 論文標題 Multicenter study on the consciousness regaining effect of a newly developed artificial liver support system in acute liver failure: An on line continuous hemodiafiltration system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 216 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kakisaka Keisuke, Suzuki Yuji, Abe Hiroaki, Watanabe Takuya, Yusa Kenji, Sato Hiroki, Takikawa Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Early identification using the referral system prolonged the time to onset for hepatic encephalopathy after diagnosing severe acute liver injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74466-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki T, Suzuki Y, Kakisaka K, Wang T, Ishida K, Suzuki A, Abe H, Sugai T, Takikawa Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 IL-8 induces transdifferentiation of mature hepatocytes toward the cholangiocyte phenotype.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 2105-2116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kakisaka K, Suzuki Y, Jinnouchi Y, Kanazawa J, Sasaki T, Yonezawa T, Yoshida Y, Kuroda H, Takikawa Y.	4. 巻 49
2. 論文標題 Unfavorable prognosis of patients with acute liver injury due to drug-induced liver injury and acute exacerbation of hepatitis B virus infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res.	6. 最初と最後の頁 1286-1293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wang T, Suzuki K, Kakisaka K, Onodera M, Sawara K, Takikawa Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 L-carnitine prevents ammonia-induced cytotoxicity and disturbances in intracellular amino acid levels in human astrocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol Hepatol.	6. 最初と最後の頁 1249-1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jgh.14497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 柿坂 啓介, 鈴木 悠地, 滝川 康裕
2. 発表標題 肝移植の現状と課題 肝移植医療における急性肝障害患者の施設間共同管理の効果
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 悠地, 柿坂 啓介, 滝川 康裕
2. 発表標題 肝移植の現状と課題 重症アルコール性肝炎に対する早期生体肝移植の適応と倫理的評価
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柿坂 啓介, 鈴木 悠地, 滝川 康裕
2. 発表標題 消化器領域の救急医療、急性肝不全 急性肝不全の予後不良となる病態解明の試み
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木登希夫, 鈴木悠地, 王挺, 柿坂啓介, 滝川康裕.
2. 発表標題 IL-8は成熟肝細胞において胆管上皮細胞の表現型を誘導する.
3. 学会等名 第45回日本急性肝不全研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿坂啓介、鈴木悠地、滝川康裕.
2. 発表標題 急性肝障害の予後不良要因としての薬物性肝障害の特徴
3. 学会等名 第23回肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柿坂啓介、鈴木悠地、滝川康裕.
2. 発表標題 病診連携による急性肝不全の内科治療向上の試みと今後の展望
3. 学会等名 第55回日本腹部救急医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木悠地、柿坂啓介、滝川康裕 .
2. 発表標題 昏睡型急性肝不全に対するOn-line CHDFの昏睡覚醒効果に関する前向き国内多施設共同研究結果報告
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 悠地 (Suzuki Yuji) (00779332)	岩手医科大学・医学部・特任講師 (31201)	
研究分担者	柿坂 啓介 (Kakisaka Keisuke) (40583563)	岩手医科大学・医学部・講師 (31201)	
研究分担者	王 挺 (Wang Ting) (70416171)	岩手医科大学・医歯薬総合研究所・特任講師 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------