

# 講演

## 特別講演

---

細胞ファイバ技術が拓く3次元組織工学

## 招待講演

---

Bidirectional Regulation of Extracellular Matrix and  
Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis

## 教育講演 1

---

本邦におけるゲノム情報統合データベース (MGeND) の  
必要性とその構築

## 教育講演 2

---

マトリクソーム研究が拓く次世代幹細胞培養技術

SL

## 細胞ファイバ技術が拓く3次元組織工学

竹内 昌治

東京大学 生産技術研究所 教授

統合バイオメディカルシステム国際研究センター センター長



微小な流路を用いて作製したハイドロゲルのファイバ内に、細胞を3次的に培養する細胞ファイバ技術について紹介する。細胞ファイバはコアシェル型の形態を所持しており、コアは細胞やコラーゲンなどの細胞外マトリックス、シェルはアルギン酸カルシウムから構成される。コア直径は100ミクロン程度であり、内部の3次元組織に養分を拡散によって供給できるため、中心壊死することなく、長期間の培養することができる。これにより、血管、神経、筋肉などのファイバ状の組織を細長く形成できたり、それら異種組織が結合された構造体もできるようになってきた。また、ファイバを編んだり巻いたりすることにより高次の組織を形成できることが分かった。さらに、豚島細胞などをファイバに内包すれば、糖尿病治療に有効な低侵襲の移植片として使えることも分かってきた。講演では、これら細胞ファイバの最近の成果について概説するとともにその応用可能性を議論する。

## 略 歴

2000年	東京大学大学院工学系研究科 機械情報工学専攻 博士課程 修了、博士(工学)
2001年	東京大学生産技術研究所 講師
2003年	同 助教授(2007年より准教授)
2014年	同 教授
この間、	
2004～2005年	ハーバード大学客員研究員
2005～2008年	JST さきがけ研究者
2010～2017年	JST-ERATO 竹内バイオ融合プロジェクト研究総括
2009年より	神奈川県立産業技術総合研究所(KISTEC)プロジェクトリーダー
2012年より	京都大学 iCeMS 客員教授
2017年より	生産技術研究所 統合バイオメディカルシステム国際研究センター長

## 学会活動・社会活動

Associate Editor: APL Bioengineering

Editorial Board: Scientific Reports, Biofabrication, Journal of Micromechanics and Microengineering, Micromachine, Micro Nano Letters

Editorial Advisory Board: Lab on a chip, Analytical Chemistry, ACS biomaterials Science and Engineering

Memberships and Fellowships: IEEE, the Japan Society of Mechanical Engineers, CHEMINAS, Japanese Society of Regenerative Medicine, Biophysical Society

Academic contributions:

International Conference Chairman: IEEE MEMS 2019

Technical Program Committee: IEEE MEMS, MicroTAS, Transducers

## 受賞歴

2008年4月	文部科学大臣表彰 若手科学者賞	2010年3月	日本学術振興会賞
2012年4月	読売テクノフォーラム21 ゴールド・メダル賞		
2015年10月	ACS Analytical Chemistry Young Innovator Award		
2017年2月	中谷賞	2017年4月	市村学術賞
2017年9月	永瀬賞	2019年3月	中辻賞

## 主要研究テーマ

3次元組織工学、マイクロ流体デバイス技術、MEMS、人工細胞

## 主たる発表論文

1. Yuya Morimoto, Hiroaki Onoe, [Shoji Takeuchi](#). Assembly biohybrid robot powered by an antagonistic pair of skeletal muscle tissues. *Science Robotics* 3: eaat4440, 2018
2. Koki Kamiya, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Kazunari Akiyoshi, [Shoji Takeuchi](#). Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nature Chem* 8: 881–889, 2016
3. Shigenori Miura, Koji Sato, Midori Kato-Negishi, Tetsuhiko Teshima, [Shoji Takeuchi](#). Fluid shear triggers microvilli formation via mechanosensitive activation of TRPV6. *Nature Commun* 6: 8871, 2015
4. Hiroaki Onoe, Teru Okitsu, Akane Itou, Midori Kato-Negishi, Riho Gojo, Daisuke Kiriya, Koji Sato, Shigenori Miura, Shintaro Iwanaga, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Yukiko Matsunaga, Yuto Shimoyama, [Shoji Takeuchi](#). Metre-long cellular microfibrils exhibit tissue morphologies and functions. *Nature Materials* 12: 584–590, 2013
5. Yun Jung Heo, Hideaki Shibata, Teru Okitsu, Tetsuro Kawanishi, [Shoji Takeuchi](#). Long-term *in vivo* glucose monitoring using fluorescent hydrogel fibers. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 13399–13403, 2011
6. Misawa N, Mitsuno H, Kanzaki R, [Takeuchi S](#). A highly sensitive and selective odorant sensor using living cells expressing insect olfactory receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 15340–15344, 2010

## Bidirectional Regulation of Extracellular Matrix and Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis



Ekihiro Seki (石 亦宏)

Associate Professor, Division of Digestive and Liver Diseases, Department of Medicine, Cedars-Sinai Medical Center

Adjunct Associate Professor, Department of Medicine, University of California Los Angeles, David Geffen School of Medicine

---

Liver fibrosis/cirrhosis is the most important determinant for the prognosis of patients with hepatitis B/C, alcoholic liver disease, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Liver fibrosis is characterized by hepatic stellate cell activation, and excessive production and deposition of extracellular matrix in the liver. Dr. Seki has reported that innate immune signal sensor TLR4 promotes TGF-beta signaling and liver fibrosis. In NAFLD and cirrhosis, intestine-derived LPS is translocated to the liver and activate hepatic immune and stellate cells. In addition to LPS, extracellular matrix can also be an activator for hepatic stellate cells. Here, we determined that extracellular matrix hyaluronan (HA) and its synthesizing enzyme HAS2, produced by hepatic stellate cells, are the drivers for stellate cell activation. In this study, we determined new regulatory mechanisms and previously unrecognized downstream effector(s) of HA-mediated signaling. This study suggests the bidirectional regulation between extracellular matrix HA and hepatic stellate cells in the progression of liver fibrosis. Dr. Seki will also discuss the potential of HA as a therapeutic target for liver fibrosis.

## 略 歴

Dr. Seki received his medical degree at Hyogo College of Medicine in 1994, followed by the residency and clinical training as a gastroenterological-hepatobiliary surgeon. After finishing his graduate study at Hyogo College of Medicine Graduate School, he started his postdoctoral training at Columbia University New York in 2004. Under the supervision of Dr. David A. Brenner, he conducted the basic research of liver fibrosis. He is a recipient of several postdoctoral fellowships from Uehara Memorial Foundation as well as American Liver Foundation (ALF). He is also an awardee of American Association for Study of Liver Disease (AASLD) /ALF Fellow Research Prize 2006. In 2007, he was recruited to University of California San Diego (UCSD). After he received AASLD/ALF Liver Scholar Award, Dr. Seki started his independent research laboratory at UCSD with two NIH research grants as a Principle Investigator. In 2014, Dr. Seki moved to Cedars-Sinai Medical Center in Los Angeles. Dr. Seki is Associate Editor of *Hepatology Communications*, and an editorial board member of *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, and *Gene Expression*. He is regularly serving as a member of NIH study section and ALF research award committees. Dr. Seki is also a member of the American Society for Clinical Investigation and the Chair of AASLD Liver Fibrosis Special Interest Group. His current research interests are Toll-like receptors, inflammasome, autophagy, and mitochondrial pathophysiology in liver fibrosis, alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis, and primary and metastatic liver cancer. He has published over 120 peer-reviewed articles in *Nature Medicine*, *Cell*, *Cancer Cell*, *Cell Metabolism*, *PNAS*, *Journal of Clinical Investigations*, *Gastroenterology*, *Hepatology*, and etc. and these papers were cited more than 9800 times by other scientists. His paper published in *Nature Medicine* 2007 has been cited more than 920 times by other papers. His h-index is 51.

## 主要研究テーマ

Liver fibrosis, Alcoholic hepatitis, Non-alcoholic steatohepatitis,  
Liver malignancy

## 主たる発表論文

1. Inokuchi-Shimizu S, Park EJ, Roh YS, Yang L, Zhang B, Song J, Liang S, Pimienta M, Taniguchi K, Wu X, Asahina K, Lagakos W, Mackey MR, Akira S, Ellisman MH, Sears DD, Olefsky JM, Karin M, Brenner DA, Seki E. TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis. *J Clin Invest* 124: 3566-3578, 2014
2. Yang L, Inokuchi S, Roh YS, Song J, Loomba R, Park EJ, Seki E. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in hepatocytes promotes hepatic fibrosis and carcinogenesis in mice with hepatocyte-specific deletion of TAK1. *Gastroenterology* 144: 1042-1054, 2014
3. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, Olefsky JM, Brenner DA, Seki E. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1 $\beta$  in mice. *Gastroenterology* 139: 323-334, 2010
4. Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miyai K, Akira S, Brenner DA, Seki E. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 844-849, 2010
5. Seki E, De Minicis S, Gwak GY, Kluwe J, Inokuchi S, Bursill CA, Llovet JM, Brenner DA, Schwabe RF. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest* 119: 1858-1870, 2009
6. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF- $\beta$  signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine* 13: 1324-1332, 2007

## EL1

## 本邦におけるゲノム情報 統合データベース (MGeND) の必要性と その構築



溝上 雅史

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター研究所  
ゲノム医科学プロジェクト プロジェクト長

2015年1月20日、オバマ前大統領は一般教育演説で Precision Medicine Initiative を提唱した。「今夜、私たちはがんや糖尿病などの病気を治すことに近づけるために、そして私たち全員が自分自身と私たちの家族をより健康に保つために必要な個別情報にアクセスできるようにするために、新しい Precision Medicine Initiative を開始します。ポリオを排除し、ヒトゲノムをマッピングし、医療の新時代を迎える国、つまり適切な治療を適切なタイミングで提供する国を求めています。」

それを受けて同年、日本では各省庁共同でゲノム医学実現推進協議会を設置した。その評議会は10の目標を設置し、そこに研究資源を集中するための国家プロジェクトを立ち上げた。その1つが日本癌研究プロジェクト (JCRP) で、その内訳はさらに5つのプロジェクトから成り立っており、その1つが臨床ゲノム情報統合データベース整備事業 (MGeND) です。

MGeND は、日本人の遺伝子的バリエーションを集積、データベース化し、臨床応用する National project と位置づけられ、

- ①ゲノム情報と疾患特異性や臨床特性等の関連について日本人を対象とした検証
- ②臨床および研究に活用することができる臨床情報と遺伝情報を統合的に扱うデータベースの整備
- ③それら研究基盤を活用した先端研究開発を一体的に推進すること

とされています。そして最終的には、臨床現場への還元、一クリニカル・シーケンスの実現一、を目指している。現在までに約23万個のゲノム情報とそれに付随する臨床情報がデータベース化され、2年後には約100万個の日本の臨床情報ゲノムが収集される予定である。さらに、アジア諸国や米国の ClinVer など他国とのデータベースとも連帯を確立する予定である。

本講演では、ゲノム医療の実現に向けて本邦における MGeND の必要性・詳細・現状・将来像について述べたい。

## 略 歴

1976年3月	名古屋市立大学医学部 卒業
1976年4月	名古屋市立大学医学部第二内科 入局
1989年11月	英国 King's College Hospital, Liver Unit 留学
2000年11月	名古屋市立大学医学部 臨床検査医学教授、同 大学病院 中央検査部 部長
2001年11月	名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学分野 教授
2008年6月	名古屋市立大学病院 肝疾患センター長(兼任)
2008年10月	国立国際医療センター 国府台病院 肝炎・免疫研究センター センター長 名古屋市立大学大学院連携大学院 肝炎・免疫分野 教授
2010年10月	独立行政法人 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター長
2016年4月	国立国際医療研究センター研究所 ゲノム医科学プロジェクト長(至 現在)

## 学会活動・社会活動

日本内科学会(評議員、指導医、認定医)、日本消化器病学会(指導医、専門医)、  
日本肝臓学会(指導医、専門医)、日本感染症学会(評議員、指導医、専門医)、  
日本輸血学会(評議員、専門医)、日本臨床検査医学会(管理医、専門医)、  
日本消化器内視鏡学会(専門医)  
AMED 肝炎等克服緊急対策研究事業、B型肝炎創薬研究事業 研究代表者  
厚生労働省 肝炎対策推進協議会委員(会長代理)

## 受賞歴

1980年 ウイルス肝炎研究財団奨励賞  
2011年 織田賞(日本肝臓学会)  
2011年 Okuda Memorial Award (Asian Pacific Digestive Week)  
2012年 Okuda Oration (Asian Pacific Association for the Study of the Liver)

## 主要研究テーマ

肝炎(病原体と宿主の遺伝子変異と多型の分子進化学的解析とその臨床応用)

## 主たる発表論文

1. Nishitsuji H, Ujino S, Mizokami M, et al. Long noncoding RNA #32 contributes to antiviral responses by controlling interferon-stimulated gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 10388-10393, 2016
2. Nishida N, Ohashi J, Mizokami M, et al. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep* 6: 24767, 2016
3. Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M, et al. Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B. *Hepatology* 63: 83-94, 2016
4. Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, et al. Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naive and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: An open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis* 15: 645-653, 2015
5. Nishitsuji H, Ujino S, Mizokami M, et al. Novel reporter system to monitor early stages of the hepatitis B virus life cycle. *Cancer Sci* 106: 1616-1624, 2015

## EL2

## マトリクスーム研究が拓く 次世代幹細胞培養技術

関口 清俊

大阪大学蛋白質研究所 寄附研究部門 教授



生体から分離した細胞を培養するとき、培養器に接着出来ない細胞は増殖することができない。それどころかアポトーシスが起動して、自ら死滅してしまう。この現象は“細胞増殖の足場依存性”と呼ばれ、多細胞体制をとる動物細胞すべてに当てはまる基本的属性である。では、なぜ細胞は足場がないと増殖できず、生存を維持することができないのであろうか。

生体内での細胞の増殖と分化は周囲の環境から提供される様々な情報に基づいて制御されている。この情報の主たる担い手は、周囲の細胞から分泌される液性因子と細胞の足場となる細胞外マトリックスである。細胞外マトリックスは細胞表面の受容体と結合することにより、それ自身がシグナル分子として機能するだけでなく、様々な液性因子と結合することにより、それらの組織内での分布や濃度勾配の形成にも深く関わっている。私たちは多くの細胞が足場としている基底膜に着目し、細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子実体の解明に取り組んできた。具体的には、これまでに同定された約40の基底膜蛋白質に対する抗体ライブラリを作製し、マウス胚における基底膜蛋白質の発現を網羅的に解析した。その結果の一部は、染色標本の高解像度画像データベース「マウス基底膜ボディマップ」に収録し、ウェブ上で公開している (<http://www.matrixome.com/bm/>)。ここで得られた膨大な情報は、基底膜の分子組成が細胞ごとにカスタマイズされており、発生・器官形成の進行に伴って不可逆的に多様化することを示している。様々な幹細胞を生体外で培養・増幅する際、これらの情報は足場としてどのような接着基質が有効かを予測する上で極めて有用である。

私たちはマウス初期胚の多能性幹細胞がラミニン511を主成分とする基底膜を足場としていることに着目し、ラミニン511の活性をほぼ100%保持した組換えフラグメントがヒトES細胞/iPS細胞の培養基質として極めて有効であることを明らかにしてきた。このフラグメントをコーティングした培養器を用いると、他の株化細胞と同様、ヒトES細胞/iPS細胞を単一細胞に分散して安定に継代・維持することが可能である。一方、分化した細胞ではラミニン511とは異なるラミニンアイソフォームが足場として使われている。様々な細胞を分化誘導する際には、当該細胞が足場としているラミニンアイソフォームが培養基質として有効であると考えられ、実際、それを支持する結果が得られつつある。細胞ごとに最適化された接着基質は幹細胞を効率的に増幅あるいは分化誘導するための基盤技術として今後幅広く利用されることが期待される。

## 略 歴

昭和48年	東京工業大学 理学部化学科 卒業
昭和53年	大阪大学大学院 理学研究科 生物化学専攻修了(理学博士)
昭和54年	米国 Fred Hutchinson Cancer Research Center 博士研究員
昭和59年	米国ワシントン大学 病態生物学科 助教授(併任)
昭和61年	藤田保健衛生大学 医学部 講師
平成2年	藤田保健衛生大学 医学部 助教授
平成3年	大阪大学 微生物病研究所 助教授
平成3年	大阪府立 母子保健総合医療センター研究所 部長
平成4年	大阪府立 母子保健総合医療センター研究所 所長
平成10年	大阪大学蛋白質研究所 蛋白質化学構造研究部門 教授
平成28年	大阪大学蛋白質研究所 マトリクソーム科学(ニッピ)寄附研究部門教授
平成12年10月~平成18年3月	科学技術振興機構 創造科学技術推進事業(ERATO) 関口細胞外環境プロジェクト 総括責任者
平成27年8月	第13回産学官連携功労者表彰 文部科学大臣賞
平成28年4月	平成28年度科学技術分野・文部科学大臣表彰・科学技術賞(開発部門)
平成29年6月	日本結合組織学会学術賞

## 主要研究テーマ

- 細胞外マトリックスによる細胞機能制御の分子機構
- マトリクソーム研究を基盤とした幹細胞制御技術の開発

## 主たる発表論文

1. Sato, Y., Kiyozumi, D., Futaki, S., Nakano, I., Shimono, C., Kaneko, N., Ikawa, M., Okabe, M., Sawamoto, K., Sekiguchi, K. Ventricular-subventricular zone fractones are speckled basement membranes that function as a neural stem cell niche. *Mol Biol Cell* 30: 56-68, 2019
2. Sato-Nishiuchi R., Li S., Ebisu F, Sekiguchi K. Recombinant laminin fragments endowed with collagen-binding activity: a tool for conferring laminin-like cell-adhesive activity to collagen matrices. *Matrix Biol* 65: 75-90, 2018
3. Takizawa M, Arimori T, Taniguchi Y, Kitago Y, Yamashita E, Takagi J, Sekiguchi K. Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by  $\alpha 6\beta 1$  integrin. *Sci Adv* 3: e1701497, 2017
4. Morooka N, Futaki S, Sato-Nishiuchi R, Nishino M, Totani Y, Shimono C, Nakano I, Nakajima H, Mochizuki N, Sekiguchi K. Polydom is an extracellular matrix protein involved in lymphatic vessel remodeling. *Circ Res* 120: 1276-1288, 2017
5. Ozawa A, Sato Y, Imabayashi T, Uemura T, Takagi J, Sekiguchi K. Molecular basis of the ligand-binding specificity of  $\alpha v\beta 8$  integrin. *J Biol Chem* 291: 11551-11565, 2016
6. Yamada M, Sekiguchi K. Molecular basis of laminin-integrin interactions. *Current Topics in Membranes* 76: 197-229, 2015
7. Kiyozumi D, Sato-Nishiuchi R, Sekiguchi K. *In situ* detection of integrin ligands. *Curr Protoc Cell Biol* 65: 10.19.1-10.19.17, 2014
8. Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, Hayashi M, Kumagai H, Nakatsuji N, Sekiguchi K. Kawase E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nature Commun* 3: 1236, 2012
9. Kiyozumi D, Takeichi M, Nakano I, Sato Y, Fukuda T, Sekiguchi K. Basement membrane assembly of the integrin  $\alpha 8\beta 1$  ligand nephronectin requires Fraser syndrome-associated proteins. *J Cell Biol* 197: 677-689, 2012
10. Manabe R, Tsutsui K, Yamada T, Kimura M, Shimono C, Nakano I, Sanzen N, Furutani Y, Fukuda T, Oguri Y, Shimamoto K, Kiyozumi D, Sato Y, Sado Y, Senoo H, Yamashina S, Fukuda S, Kawai J, Sugiura N, Kimata K, Hayashizaki Y, Sekiguchi K. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 12849-12854, 2008.

A series of horizontal dashed lines spanning the width of the page, providing a template for writing or drawing.

# ランチョンセミナー

## ランチョンセミナー1

---

ポスト DAA 時代の肝臓病学 —胆汁酸研究の新展開

## ランチョンセミナー2

---

高学習能モデル動物 Tokai High Avoider (THA)  
ラットを規定するメタボローム特性

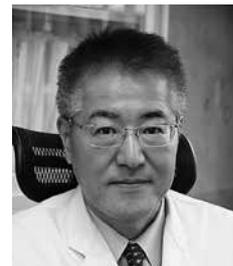
LS1

## ポスト DAA 時代の肝臓病学 —胆汁酸研究の新展開

加川 建弘

東海大学医学部内科学系消化器内科 教授

東海大学医学部附属病院 肝疾患医療センター センター長



C型肝炎ウイルスに特異的な経口抗ウイルス薬(DAA)の登場により、ほとんどのC型慢性肝炎、肝硬変患者においてウイルス排除が得られるようになった。DAA治療後に肝がんのリスクが高まるという報告があったが、この仮説もほぼ否定され、DAA治療により肝がんリスクが低下することが多くの臨床研究で確認されている。

DAAの普及とともに、2017年頃からアメリカ肝臓学会におけるC型肝炎関連の演題が減少し、基礎医学への回帰が見られる。特に、胆汁酸関連の演題が増加している。その要因としては、胆汁酸調節のフィードバック分子機構が明らかになったこと、胆汁酸がシグナル分子として脂質代謝、糖代謝に深く関与すること、胆汁酸が腸内細菌と相互作用することにより、腸管と肝を繋ぐ重要な因子として認識され始めたこと、などが挙げられる。

胆汁酸のレセプターとして、核内レセプター FXR、GPCR である TGR5 が発見された。さらに FGF19 といった腸管と肝の橋渡しをおこなう分子、各臓器に局在する胆汁酸トランスポーターの存在が明らかにされ、かかる分子を標的とした治療介入がさかんに行われている。対象となる疾患は原発性胆汁性胆管炎(PBC)、原発性硬化性胆管炎(PSC)などを代表とする胆汁うっ滞症のみならず、脂肪肝炎(NASH)、便秘異常など多岐にわたっており、その一部はすでに治療薬として承認されている。本セミナーでは現在行われている臨床研究を含め、胆汁酸研究の概略を紹介する。

## 略 歴

1986年3月 慶應義塾大学医学部 卒業  
 1986～1988年 慶應義塾大学医学部内科 研修医  
 1988～1992年 慶應義塾大学医学部内科 大学院  
 1992～1993年 慶應義塾大学医学部内科 助手  
 1993～2006年 東海大学医学部内科学系消化器内科 講師  
 1999年10月～2002年3月  
 アメリカ、タフツ大学 留学(Prof. Arias)  
 2007～2016年 東海大学医学部内科学系消化器内科 准教授  
 2017年～現在 東海大学医学部内科学系消化器内科 教授  
 【学 位】 医学博士(慶應義塾大学) 1996年2月

## 学会活動・社会活動

認定・専門医 日本内科学会総合内科専門医、指導医  
 日本消化器病学会専門医、指導医  
 日本肝臓学会認定医、指導医  
 日本消化器内視鏡学会認定医、指導医  
 学会活動 日本肝臓学会評議員、日本消化器病学会評議員  
 日本消化器内視鏡学会評議員(関東支部)  
 アメリカ肝臓学会会員、アメリカ生理学会会員  
 行政関連 神奈川県肝炎対策協議会委員  
 神奈川県肝疾患審査会委員  
 神奈川県肝がん・重度肝硬変認定審査会委員

## 賞 罰

1996年 日本消化器病学会奨励賞  
 2009年 Hepatology Research 賞

## 主要研究テーマ

胆汁うっ滞、胆汁分泌機能の解析、慢性肝炎、肝硬変、肝がんの臨床

## 主要論文

1. Kagawa T. Hepatobiliary transport of bile acids. *Bile Acids in Gastroenterology Basic and Clinical*. Springer, Tokyo, 2017: pp.9-25.
2. Kagawa T, et al. Loss of organic anion transporting polypeptide 1B3 function causes marked delay in indocyanine green clearance without any clinical symptoms. *Hepatology* 65: 1065-1068, 2017
3. Kagawa T, et al. No contribution of the ABCB11 p.444A polymorphism in Japanese patients with drug-induced cholestasis. *Drug Metab Dispos* 43: 691-697, 2015
4. Kagawa T, et al. Recessive inheritance of population-specific intronic LINE-1 insertion causes a Rotor syndrome phenotype. *Hum Mutat* 36: 327-332, 2015
5. Kagawa T, et al. Ursodeoxycholic acid stabilizes the bile salt export pump in the apical membrane in MDCK II cells. *J Gastroenterol* 49: 890-899, 2014
6. Kagawa T, et al. Transcatheter arterial chemoembolization plus radiofrequency ablation therapy for early stage hepatocellular carcinoma: comparison with surgical resection. *Cancer* 116: 3638-3644, 2010
7. Kagawa T, et al. Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G58-G67, 2008

LS2

## 高学習能モデル動物 Tokai High Avoider (THA) ラットを 規定するメタボローム特性



遠藤 整

東海大学医学部基盤診療学系 衛生学公衆衛生学

胎生期や発育期における化学物質などの曝露は、小児の健全な発育に影響を与えることが想定されている。特に神経系は、その形成過程の複雑さと脆弱さゆえに化学物質に対する感受性が高く、中枢神経発育期における曝露は、学習や記憶などの高次脳機能への障害として残存する可能性が高い。従来、母体を介した次世代影響を動物実験によって評価することは困難されてきた。それは、出生前に胎児の学習レベルを判定することが不可能であることや、出生後の学習能力には大きな個体差があるため、母体を介した曝露影響なのか、あるいは個体差によるものなのかを判断することが出来ないためである。すなわち、次世代の学習への影響を正確かつ鋭敏に評価するためには、出生児の学習能力に個体差が少なく安定した実験動物が必要となる。

私たちは、野生型の Wistar 系ラットをもとに、レバー押し電気刺激回避試験で好成績を示す個体同士を繰り返し自然兄妹交配させ、近交系の Tokai High Avoider (THA) ラットを確立・維持してきた。THA ラットは、生まれながらに高い学習能力と安定した情動性を示し、かつ個体差が極めて小さい実験動物であり、驚くべきことに他の学習試験においても高い学習能力を発揮する。これまで、THA ラットを用いて母体を介した次世代影響評価を行い、安全性試験に貢献してきた。現在に至るまで約40年にわたり途絶えることなく継代しており、120世代目を超えている。私たちは、高学習能モデル動物である THA ラットを規定している因子を解明するため、包括的な代謝産物の探索を可能とするメタボローム解析を行った。その結果、THA ラットの海馬組織中において、ある種の必須アミノ酸量が Wistar ラットと比較して著明に多く含まれていることが判明した。そのアミノ酸は、THA ラットの表現型を支える上で必要なアミノ酸であることが示唆された。

代謝産物は、遺伝子発現の最終生成物であるだけでなく、その生物種の表現型変化を最も反映しているものと考えられている。本セミナーでは、THA ラットの特徴と有用性、メタボローム解析により得られた代謝ネットワークの全体像から個体の表現型を考察すること、などについて発表させて頂きたい。

## 略 歴

2003年3月	北里大学 医療衛生学部衛生技術学科 卒業(学士 衛生技術学)
2005年3月	東海大学大学院 医学研究科修士課程 卒業(修士 医科学)
2009年3月	旭川医科大学大学院 医学系研究科博士課程 卒業(博士(医学))
2009年4月	旭川医科大学 健康科学講座 特任助教
2009年10月	東海大学医学部 基盤診療学系 公衆衛生学 助教
2014年4月	東海大学医学部 基盤診療学系 公衆衛生学 講師
2017年4月～現在	改組により同 基盤診療学系 衛生学公衆衛生学 講師

## 学会活動

日本癌学会、日本酸化ストレス学会、日本衛生学会、がんと代謝研究会、分子予防環境医学研究会

## 受 賞

Young Travel Award, 10th World Congress for Microcirculation, 2015.

## 主要研究テーマ

がんの微小環境適応と悪性化の解明、環境因子と生体影響、生活習慣病

## 主たる発表論文

1. Endo H, Owada S, Inagaki Y, Shida Y, Tatemichi M. Glucose starvation induces LKB1-AMPKmediated MMP-9 expression in cancer cells. *Sci Rep* 8: 10122, 2018
2. Owada S, Endo H, Shida Y, Okada C, Ito K, Nezu T, Tatemichi M. Autophagy mediated adaptation of hepatocellular carcinoma cells to hypoxia mimicking conditions constitutes an attractive therapeutic target. *Oncol Rep* 39: 1805-1812, 2018
3. Endo H, Eto T, Yoshii F, Owada S, Watanabe T, Tatemichi M, Kimura M. The intrauterine environment affects learning ability of Tokai high avoider rat offspring derived using cryopreservation and embryo transfer-mediated reproduction. *Biochem Biophys Res Commun* 489: 211-216, 2017
4. Endo H, Niiooka M, Kobayashi N, Tanaka M, Watanabe T. Butyrate-producing probiotics reduce nonalcoholic fatty liver disease progression in rats: New insight into the probiotics for the gut-liver axis. *PLoS One* 8: e63388, 2013

A series of horizontal dashed lines spanning the width of the page, intended for handwritten notes or a list.

# テクニカルセミナー

## テクニカルセミナー1

---

IncuCyte による生細胞リアルタイム解析の提案

## テクニカルセミナー2

---

NASH モデル作製  
マウス・ラット用飼料のトレンド

TS1

## IncuCyte による生細胞リアルタイム解析の提案

下西 祥平

エッセンバイオサイエンス株式会社

近年、がん領域や再生医療分野の培養細胞をもちいた実験系では、正確性や再現性の担保や、効率の改善のため、ライブセルイメージングを用いた経時的な観察および定量評価の重要性が高まっています。弊社 IncuCyte は、その経時的な細胞の変化を定量できるアプリケーション(細胞増殖や細胞死、スフェロイド、遊走および Immune cell killing など)を多数そろえており、一度の実験から効率よく多くの洞察を得ることが可能です。本セミナーでは、ライブセルイメージング及びその定量解析の重要性及び、弊社 IncuCyte によるソリューション例をご紹介します。

## 【参考文献】

1. Nersesian S, Williams R, Newsted D, et al. Effects of modulating actin dynamics on HER2 cancer cell motility and metastasis. *Sci Rep* 28: 17243, 2018  
DOI:10.1038/s41598-018-35284-9
2. Weber EW, Lynn RC, Sotillo E, et al. Pharmacologic control of CAR-T cell function using dasatinib. *Blood Advances* 3: 711-717, 2019  
DOI:10.1182/bloodadvances.2018028720
3. Tang B, Raviv A, Esposito E, et al. A flexible reporter system for direct observation and isolation of cancer stem cells. *Stem Cell Rep* 4: P155-169, 2015  
DOI:10.1016/j.stemcr.2014.11.002

## TS2

## NASH モデル作製 マウス・ラット用飼料のトレンド

後藤 泉

EP トレーディング株式会社

【背景・歴史】 NASH モデル作製用飼料として古くから使用されていたメチオニン・コリン欠乏飼料(MCD 飼料)は激しい体重減少を伴い使用しづらかった。また単純な高脂肪飼料ではモデル作製まで長期かかり、なかなか理想的な飼料が無かった(特にマウス用)。

各社独自にマウス用 NASH モデル作製用飼料を比較検討しモデルを確立してきた数年を経て、大きく2種の飼料にトレンドが集中してきた。この2種のマウス飼料について主に紹介する。

### ① メチオニンとコリンの量を調整する方法 ~ CDAHFD 飼料~

MCD 飼料のようにメチオニンを完全欠乏させるのではなく一部残し減量する事により、体重減少を伴わず早期の肝線維化を惹起する事が可能。炎症は負荷3週位から、線維化は6週位から見られる。

### ② 高脂肪飼料でモデルを作製する方法 ~アミリン(AMLN)飼料・GUN 飼料

ヒトの食事ではメチオニンとコリンの摂取量を調整するという事は現実的ではない為、メチオニン・コリン量の調整(欠乏や減量)をせず高脂肪+ $\alpha$ の要素を加え、よりナチュラルな方法で NASH モデルを作製する方法も人気のあるトレンドの1つ。

### ③ ラットでの NASH モデル作製 ~ CDAA 飼料~

ラットでは従来からある CDAA 飼料が現在もよく使用される。

### 【参考文献】

1. Trevaskis JL, Griffin PS, Wittmer C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonism improves metabolic, biochemical, and histopathological indices of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302, G762-G772, 2012
2. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 94, 93-103, 2013
3. Chiba T, Suzuki S, Sato Y, et al. Evaluation of methionine content in a high-fat and choline-deficient diet on body weight gain and the development of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *PLoS One* 11, e0164191, 2016
4. Ayaie Ikawa-Yoshida, Saori Matsuo, Atsuhiko Kato, et al. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int J Exp Pathol* 98, 221-233, 2017

A series of horizontal dashed lines spanning the width of the page, intended for handwritten notes or a list.

# シンポジウム

エクソソームを介した  
肝病態の制御機構

基調  
講演STEM細胞に由来するエクソソームの  
肝疾患治療の可能性

落谷 孝広

東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門 教授



世界中の創薬・再生医療の研究者がエクソソームに注目している。なぜなら、がん研究が解き明かしているように、疾患エクソソームの存在は、疾患の原因から病態の維持にまで、様々な過程で作用しているからである。事実、がんの転移においては、エクソソームの分泌に関わる分子を阻害することでエクソソーム分泌を制限すると、他臓器への転移能が顕著に阻害されることがわかっている。がん以外の疾患領域では、WHOの統計では2020年には世界の死亡原因の第3位に浮上する慢性閉塞性肺疾患(COPD)や特発性肺線維症(IPF)も、喫煙刺激を受けた気道上皮細胞からのエクソソームがその病態の一因となりうることを我々は世界に先駆けて示した。さらに米国のグループは、異なる種類の組織幹細胞の分泌するエクソソームに、細胞治療と同等あるいはそれ以上の疾患治療効果があることを知り、創薬開発に着手している。本講演では、間葉系幹細胞のみならず、こうした新たな組織細胞、組織幹細胞の有用なエクソソームを、慢性疾患の病態をコントロールする方策として開発する世界的な現状を紹介するとともに、肝疾患領域におけるエクソソーム創薬の可能性を議論したい。

## 略 歴

- 1988年 大阪大学大学院博士過程修了(医学博士)、  
同年大阪大学細胞工学センター文部教官助手(肝細胞がん、肝炎の研究)
- 1991年 米国ラホヤがん研究所(現・SF バーナム医学研究所)ポストドク
- 1993年 国立がんセンター研究所主任研究員、  
その後、同分子腫瘍学部室長、がん転移研究室独立室長

2010年から分子細胞治療研究分野、主任分野長を経て、2018年から現職。

早稲田大学、東京工業大学、星薬科大学、昭和大学歯学部、慶應大学薬学部、国立台湾大学などの客員教授を兼任。

現在、日本癌学会評議員、日本 RNAi 研究会運営委員、JSEV(日本エクソソーム協会)の会長、JEV の Associate Editor, Cancer Science の Associate Editor などの学会・研究会の役員を務める。

## 受賞歴

- 昭和63年 井上財団若手研究奨励賞
- 平成7年 国立がんセンター 田宮賞
- 平成12年 日経BP 技術賞 バイオ医学部門賞
- 平成15年 再生医療学会 優秀演題賞
- 平成16年 再生医療学会 優秀演題賞
- 平成18年 日本人工臓器学会 オリジナル賞
- 平成19年 IFAT 国際学会 優秀演題賞受賞
- 平成20年 BMS Award 受賞
- 平成22年 日本薬物動態学会 ベストポスター賞
- 平成22年 MNC2012Award (Outstanding Paper)

## 主な業績(2010年以降)

- Asano N, et al., A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes. *Nat Commun* (in press)
- Ageta H, et al., UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles. *Nat Commun* 2018
- Yokoi A, et al., Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA cause mesothelial cell damage facilitating peritoneal dissemination in ovarian cancer. *Nat Commun* 2017
- Katsuda T, et al., Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity. *Cell Stem Cell* 2017
- Kosaka N, et al. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest* 2016
- Akimoto M, et al. Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment, *Nat Commun* 2016
- Tominaga N, et al. Brain metastatic cancer cells release microRNA-181c-containing extracellular vesicles capable of destructing blood-brain barrier. *Nat Commun* 2015
- Ono M, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2014
- Yoshioka Y, et al. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* 2014
- Kosaka N, et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010

## S-1

## 肝細胞由来 Extracellular vesicles は肝星細胞を活性化することでアルコール性肝障害の病態進行に寄与する

江口 暁子<sup>1)</sup>、岩佐 元雄<sup>1)</sup>、竹井 謙之<sup>1)</sup>、塚本 秀和<sup>2)</sup>

1) 三重大学大学院 医学系研究科 消化器内科

2) 南カリフォルニア大学

**【目的】**我々は軽度の肝障害を有するアルコール性肝炎マウスを用いた先行研究から、Hepatocyte-derived EV (HC-EV) がクッパー細胞を活性化することや、EV に封入される miRNA がバイオマーカーとして有用であることを報告した。本研究では、肝線維化や炎症等の重篤な肝障害を呈する alcoholic hepatitis (AH) マウスを用いて、AH-HC-EVs による標的細胞への関与について検討した。

**【方法】**French-Tsukamoto モデルを用いてエタノール 8週間投与に1週間に一度 binge drinking を付加することにより、人 AH に類似したアルコール性肝障害 (AH) マウスを作製した。分離肝細胞から HC-EV を回収し、HC-EV に封入された microRNA を次世代シーケンシングにより同定した。HC-EVs を初代培養肝星細胞に添加し、肝星細胞の活性化を qPCR により検討した。また AH やコントロールマウスから肝星細胞を分離し、mRNA-sequencing により AH の肝星細胞特異的に変化する遺伝子を同定し、AH-HC-EVs-miRNA により影響をうける遺伝子について検討した。

**【成績】**AH マウスの血中 EV 数や HC-EV 数は顕著に増加した ( $p < 0.01$ )。コントロール HC-EV と比較して AH-HC-EV には、有意に変化する 24 個の miRNA が封入されており ( $p < 0.001-0.05$ )、この中には pro fibrogenic miRNA が含まれていることが分かった。AH-HC-EVs は初代培養肝星細胞に効率よく導入され、肝星細胞の  $\alpha$ -SMA ( $p < 0.001$ ) や collagen 1 ( $p < 0.01$ ) 遺伝子を活性化した。AH マウスの肝星細胞に特異的に変化する 344 遺伝子のうち、発現が低下した 67 遺伝子が AH-HC-EVs 中の 17 個の miRNA で制御されている可能性が示唆された。この中には肝星細胞の活性化に関与する Smad7 や Nr1d2 が含まれていた。

**【結語】**AH マウスにおいて、障害肝細胞由来の EV が非実質細胞の活性化を通してアルコール性肝障害の進行に寄与していることを明らかにした。今回同定できた EV 成分はアルコール性肝障害の病態進行の制御に役立つことが期待される。

## S-2

## DAAs 治療後の血清 Exosome 中 miRNA の変化が肝病態に与える影響の解析

渡邊 丈久<sup>1)</sup>、長岡 克弥<sup>1)</sup>、榎原 哲史<sup>1)</sup>、田中 健太郎<sup>1)</sup>、徳永 堯之<sup>1)</sup>、吉丸 洋子<sup>1)</sup>、川崎 剛<sup>1)</sup>、立山 雅邦<sup>1)</sup>、直江 秀昭<sup>1)</sup>、田中 基彦<sup>1)</sup>、佐々木 裕<sup>1)2)</sup>

1) 熊本大学院生命科学研究所 消化器内科学分野

2) 市立貝塚病院

**【背景】**C 型慢性肝炎の治療は DAAs の出現により近年めざましい進歩を遂げた。その結果、治癒に相当する SVR 患者数が急激に増えている。この DAAs 治療後 SVR 患者については免疫系や脂質代謝への影響が生じることが報告されており、脂肪肝の改善が多くみられる。このように DAAs 治療は HCV の排除以外に生体に様々な影響を与えることが示唆されているが、その原因は分かっていない。一方、miRNA は様々な生命現象に関与する遺伝子発現調節の主要な機序の一つであり、特に Exosome に内包される miRNA は疾患のバイオマーカーや創薬標的として注目されている。

**【目的・手法】**我々は C 型慢性肝炎患者の DAAs 治療前後での血清 exosome 中の miRNA の profile の変化に着目し、生命現象との関係を検討した。まず予備実験として、当院で治療を行った 5 症例の治療前後の血清を用いて qPCR array を行い、治療による miRNA の発現 profile の変化を網羅的に解析した。その結果、発現量の変化が有意かつ 2 倍以上と特に大きいものを候補 miRNA として選択した。次に、42 症例の DAAs 治療前後の血清 Exosome 中の候補 miRNA を qPCR で定量し、治療前後で有意な変化が見られるか検討した。またこれらの miRNA が肝細胞に与える影響について、バイオインフォマティクスおよび選出した miRNA に対する特異的阻害剤を HepG2 細胞に用いることで解析した。

**【結果・考察】**予備実験の結果選択した複数の候補 miRNA に対し、症例数を増やして qPCR で検討を行った結果、miR-122, miR-34a, miR-483b などが DAAs 治療により有意に減少していた。これらの miRNA が肝細胞へ与える影響を検討するため、HepG2 細胞に各 miRNA 特異的な阻害剤を用いた後にオレイン酸負荷を行い、脂肪蓄積に与える影響を検討した。その結果、miR-122, miR-34a を阻害するとオレイン酸負荷による脂肪蓄積が有意に減少した。このことから DAAs 治療による miRNA の変化は、DAAs 治療後の肝病態を反映している可能性が示唆された。

## S-3

障害肝由来 Thy1陽性間葉系細胞と  
骨髄由来間葉系細胞のエクソソーム  
による肝前駆細胞誘導機序

市戸 義久、谷水 直樹、三高 俊広

札幌医科大学 医学部 フロンティア医学研究所 組織再生学部門

障害肝由来 Thy1陽性細胞を Retrorsine/部分肝切除 (Ret/PH) モデルラットに移植すると、ドナー細胞は Extracellular vesicles (EVs) を分泌し、類洞内皮細胞やクッパー細胞を介して、内在性肝前駆細胞 (SHPCs) の増殖を促進する (Ichinohe et al, STEM CELLS 2017)。また骨髄間葉系細胞 (BM-MCs) の大部分は Thy1 を発現しており、同様に SHPCs 増殖促進作用がある。我々は、Thy1陽性細胞ではあるが、障害肝由来細胞と BM-MCs の肝前駆細胞誘導機序に違いがあることに気づき、その違いを明らかにするために解析を行っている。

内在性クッパー細胞の影響を検討するため、Ret/PH モデルに塩化ガドリニウム (Gd) を投与し活性を抑制した。障害肝由来細胞と BM-MCs 移植による SHPCs の挙動を検討すると、Gd 投与により障害肝由来細胞移植群では SHPCs は縮小し、BM-MCs 移植群では増大した。この結果は、障害肝由来細胞移植群ではクッパー細胞の活性化を介して SHPCs を増殖させているのに対し、BM-MCs ではクッパー細胞は関与せず、EVs の直接作用により SHPCs の増殖を促進している可能性を示している。

両細胞の EVs に含まれる miRNA を網羅的に解析したところ、障害肝由来細胞と BM-MCs に含まれる miRNA は異なり、障害肝由来細胞で有意に高いものが 7 因子、BM-MCs で 6 因子あった。mimic を小型肝細胞培養に添加し、肝前駆細胞に対する増殖活性を検討したところ、BM-MCs で 1 因子、障害肝由来細胞で 2 因子に増殖促進作用があることが分かった。EVs に含まれる他の増殖因子の解析も進めている。

本発表では、EVs の内在性肝前駆細胞に対する作用についての最新の研究結果を報告し、ご批判を受けたいと考えている。

## S-4

培養自己骨髄間葉系幹細胞を用いた  
肝臓再生療法におけるエクソソーム  
(細胞外小胞)高見 太郎<sup>1)2)</sup>、藤澤 浩一<sup>1)2)</sup>、松本 俊彦<sup>2)3)</sup>、  
坂井田 功<sup>2)4)</sup>

1) 山口大学大学院医学系研究科 肝臓再生基盤学

2) 山口大学研究推進機構 再生・細胞治療研究センター

3) 山口大学大学院医学系研究科 臨床検査・腫瘍学

4) 山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学

我々は全身麻酔下に採取した自己骨髄細胞 (非培養・骨髄単核球) を点滴投与する「自己骨髄細胞投与療法」を臨床実施し、先進医療 B として認可されている。その後、四塩化炭素反復投与イヌ肝線維化評価モデルで培養自己骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 肝動脈投与の安全性および有効性を確認し、現在は再生医療等安全性確保法の下、臨床研究として「非代償性肝硬変に対する培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与療法」を実施中である。

これまでに骨髄 MSC を用いた肝臓再生療法におけるエクソソーム (細胞外小胞) の役割について検討してきた。改良コリン欠乏食マウス脂肪肝炎モデルでは、マウス骨髄 MSC 脾臓投与 (肝臓直接投与を想定) 後に肝内の iNOS 陽性細胞の減少と CD206 陽性細胞の増加を認め、末梢静脈投与に比して肝線維化は改善した。そこで、LPS 添加マウス骨髄由来マクロファージ (MΦ) / マウス骨髄 MSC の非接着共培養系で MΦ由来 Matrix metalloproteinase (MMP) および炎症性サイトカイン変化を評価したところ、MΦ由来 MMPs (MMP12, 13) は有意に増加し TNF $\alpha$  は有意に低下した。骨髄 MSC/MΦ非接着共培養系の培養上清エクソソーム由来 miR のうち、miR6769b-5p を MΦに導入すると MMP9 上昇と TNF $\alpha$  低下を認め、miR8113 を肝星細胞に導入すると COL1A1 低下を認めた。

次に、骨髄細胞由来エクソソームの骨髄 MSC に対する作用について検討した。ラット骨髄 MSC を全骨髄細胞由来因子添加培地で培養したところ、骨髄 MSC のコロニー形成能は維持され、抗炎症性サイトカイン TNF-stimulated gene 6 (TSG6) 発現は増強されたが、エクソソーム除去全骨髄細胞由来因子添加培地ではこれらの効果は減弱した。

このように骨髄 MSC を用いた肝臓再生療法において、エクソソームは miR を介して MΦや肝星細胞との細胞間相互作用による肝線維化改善効果に寄与するだけでなく、骨髄 MSC 培養添加剤としての活用も期待できる。

## S-5

四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウス  
での間葉系幹細胞由来 exosome の  
線維化改善効果の検証

土屋 淳紀、竹内 卓、寺井 崇二

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 消化器内科学分野

**【目的】** 間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell ; MSC) は四塩化炭素 (Carbon Tetrachloride ; CCl<sub>4</sub>) 誘導肝硬変モデルマウスに対して線維化改善効果がありうると報告してきた一方、我々は多くの静注 MSC は肺にトラップされることも報告しており、その効果を発揮するメカニズムに trophic factor や exosome などの関与を推定している。今回我々は、マウス exosome に細胞同等の治療効果があるかを検証し、その効果を及ぼすメカニズムの解析を始めたので紹介する。

**【方法】** マウス MSC 由来の exosome は48時間の無血清培地上で採取を行い、超遠心法にて採取を行った。一連の採取法で exosome が採取できていることを NANOSIGHT 及び電子顕微鏡で確認した。採取された exosome は Qubit3.0 Fluorometer を用いて採取タンパク量を測定し、CCl<sub>4</sub> 誘導肝硬変モデルマウス (12週間継続週二回投与 ; 8週目に治療単回投与) に 2 μg/mouse で尾静脈より投与を行った。対象としてマウス MSC 1 × 10<sup>6</sup> cells/mouse を行い効果の検証を行った。

**【結果】** MSC 由来 exosome は肺塞栓などを生じず安全に投与でき、肝細胞障害軽減を反映する ALT 値の低下を MSC 投与よりも得ることができた。また線維化改善もシリウスレッド染色、Hydroxyproline 定量で細胞同等の効果を得ることができた。現在、影響を及ぼした exosome 内に含有されるタンパク、miRNA について解析を同時進行で解析中で、多くのタンパクや miRNA が含有され多機能性を持つことが推定された。

**【結論】** exosome は MSC 細胞投与と比較し、肝細胞障害軽減、線維化改善に関しては投与量にもよると推定されるが、同等の効果を得られることがわかった。今後さらなる詳細なメカニズム解析を行うことで、exosome の全身、そしてターゲット臓器での影響を検証することで細胞治療に代わりうるのかを検証していきたい。

## S-6

造血系細胞が分泌する  
エクソソームを介した肝発生と  
傷害肝修復の制御機構柳川 享世<sup>1)2)</sup>、住吉 秀明<sup>1)2)</sup>、中尾 祥絵<sup>1)2)</sup>、  
松木 勇樹<sup>1)2)</sup>、紙谷 聡英<sup>1)3)</sup>、近田 裕美<sup>1)3)</sup>、  
大塚 正人<sup>1)3)</sup>、三浦 浩美<sup>1)3)</sup>、横森 弘昭<sup>4)</sup>、  
高木 孝士<sup>5)</sup>、稲垣 豊<sup>1)2)</sup>

1) 東海大学大学院 医学研究科 マトリックス医学生物学センター

2) 東海大学 医学部 再生医療科学

3) 東海大学 医学部 分子生命科学

4) 北里大学 メディカルセンター 総合内科

5) 昭和大学 医学部 解剖学講座

肝発生においては、共存する造血系細胞によって肝前駆細胞の分化が促進されることが知られている。また、線維肝組織中には骨髄から動員された多数の血球細胞が浸潤することから、造血系細胞と肝実質細胞とのクロストークが肝の病態制御においても重要な役割を担っていることが示唆される。

演者らはこれまで、新規の線維肝再生促進因子として opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1) を同定し、OGFRL1 が造血系細胞、とりわけ単球系細胞において高発現するエクソソーム内包タンパク質であることを見出した。さらに、四塩化炭素投与による肝傷害に際して、血球細胞から一過性に分泌された OGFRL1 内包エクソソームが傷害局所の肝実質細胞に取り込まれること、また OGFRL1 発現細胞を外来的に投与した肝線維症マウスでは肝前駆細胞の動員と増殖を介して70%部分切除後の肝再生が促進することを明らかにした。OGFRL1 内包エクソソームを培養上清中に添加したマウス初代肝細胞では、BrdU の取り込みが増加する傾向も認められた。

OGFRL1 はまた、胎生13.5日目 (E13.5) におけるマウス胎仔肝内の骨髄芽球系ならびに赤芽球系の造血細胞に顕著に発現しており、肝前駆細胞にも少量の OGFRL1 タンパク質の局在を認めた。レトロウイルス感染による OGFRL1 の強制発現もしくは OGFRL1 内包エクソソームの添加により、E13.5 の肝前駆細胞では *Hnf4a*、*Cyp2f2*、*Fabp1* といった肝細胞特異的な遺伝子の発現が上昇し、OGFRL1 が成熟肝細胞への分化を促進することが示唆された。肝発生が進んだ E18.5 になると、肝組織中の造血系細胞数の減少とともに造血系細胞内の OGFRL1 発現自体も低下した。

以上の所見から、肝の発生や傷害肝の修復に際して造血系細胞から分泌されるエクソソーム内包 OGFRL1 は、肝実質細胞とのクロストークを担い、肝発生における胎仔肝前駆細胞の分化や線維肝修復における肝前駆細胞の動員を促進する共通因子であることが明らかになった。

プログラム

講演

ランチョンセミナー

テクニカルセミナー

シンポジウム

ワークショップ

一般口演

ポスター発表

索引

# ワークショップ

肝臓研究における新機軸

## WS-1

肝脂質代謝に関わる PPAR $\alpha$ -制御性 microRNA の新規機能の解析

谷貝 知樹<sup>1)</sup>、Chad Brocker<sup>1)2)</sup>、Donghwan Kim<sup>1)</sup>、高橋 昌悟<sup>1)3)</sup>、Oksana Gavrilova<sup>4)</sup>、Frank Gonzalez<sup>1)</sup>

- 1) 米国国立衛生研究所 国立癌研究所 Laboratory of Metabolism
- 2) 米国食品医薬品局 Center for Tobacco Products Office of Science Division of Nonclinical Science
- 3) 米国ジョージタウン大学 Department of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology
- 4) 米国国立衛生研究所 国立糖尿病・消化器・腎臓病研究所 Mouse Metabolism Core

Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) は肝細胞に豊富に発現しているリガンド活性化型核内受容体の一つであり、多くの脂質代謝や輸送に関わる遺伝子の発現を制御することが知られている。これまでの我々の研究により、活性化した PPAR $\alpha$  は Let-7 microRNA (miRNA) ファミリーの発現を下方制御することが明らかとなった。PPAR $\alpha$  が担う脂質代謝と Let-7 miRNA の関連性を解析するため、Alb-Cre マウスと Let-7b/c2 flox マウスを掛け合わせて肝細胞特異的 Let-7b/c2 ノックアウト (Let-7b/c2 LKO) マウスを作製し、高脂肪食を投与した。その結果、このマウスは肥満が劇的に抑制されることが明らかとなった。RNA-seq により網羅的に遺伝子発現解析を行ったところ、Let-7b/c2 LKO マウスの肝臓では PPAR $\alpha$  が上方制御すべき遺伝子の発現が強く抑制されていることが明らかとなった。この PPAR $\alpha$  経路が抑制される原因を解析したところ、活性化した PPAR $\alpha$  の共役因子である Retinoid X Receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) のタンパク質が Let-7b/c2 LKO マウスの肝臓において大きく減少していることが明らかとなった。RXR $\alpha$  の mRNA は変化していないにも関わらず、タンパク質のみ減少していたことから、ユビキチン-プロテアソーム系による RXR $\alpha$  タンパク質の分解が考えられた。実際に RXR $\alpha$  に対する結合能があることが知られている E3 ユビキチンリガーゼの一つである RNF8 は mRNA の 3'UTR に Let-7 miRNA の結合配列を持っており、3'UTR レポーターアッセイにより RNF8 が Let-7 miRNA の標的であることが確認された。これらの結果から、Let-7 miRNA と PPAR $\alpha$  の間には Let-7 - RNF8 - RXR $\alpha$  経路を介した Negative feedback loop が存在することが明らかとなった。

## WS-2

## ヒト iPS 細胞疾患モデルに基づく先天性肝線維症の病態と分子標的の解明

柿沼 晴<sup>1)2)</sup>、角田 知之<sup>1)</sup>、三好 正人<sup>1)</sup>、紙谷 聡英<sup>3)</sup>、土屋 淳<sup>1)</sup>、佐藤 綾子<sup>1)</sup>、新田 沙由梨<sup>1)</sup>、井津井 康浩<sup>1)</sup>、東 正新<sup>1)</sup>、朝比奈 靖浩<sup>1)2)</sup>、渡辺 守<sup>1)</sup>

- 1) 東京医科歯科大学 消化器内科
- 2) 東京医科歯科大学大学院 肝臓病態制御学
- 3) 東海大学医学部 分子生命科学

**【目的】** 先天性肝線維症は PKHD1 を責任遺伝子とする遺伝性肝疾患であり、進行性の肝線維化と細胆管の増生を特徴とする。肝線維化は門脈域周囲にのみ広範に生じ、炎症細胞浸潤は乏しいなど、肝硬変とは異なる線維化のパターンを呈し、本症の病態には多くの不明点が残されている。我々は、ゲノム編集により PKHD1 を完全欠損させたヒト iPS 細胞株を樹立し、これを利用して本症の特異な病態を解明し、分子標的を探索することを目的に検討を行った。

**【方法】** 健常者由来ヒト iPS 細胞株に対して CRISPR/Cas9 法を用いて PKHD1 を完全欠損させた PKHD1-KO iPS 細胞株、及びコントロールとして Hetero 欠損株を樹立した。これらの iPS 細胞株を既報に基づき in vitro で胆管細胞系譜への分化誘導を行い、その形質を解析した。さらに本症患者の血清及び肝生検検体を用いて検証解析を行った。

**【成績】** 誘導した iPS 由来胆管系譜細胞は、細胞極性をもった一層の CK7 陽性細胞から形成される球状構造を呈し、内腔には電顕で primary cilia を認めるなど、胆管細胞の形質を呈する胆管上皮構造体 (CC: cholangiocytic cysts) であることが示された。PKHD1-KO CC では PKHD1 がコードする Fibrocystin の発現が欠損し、PKHD1-Hetero CC に比べて primary cilia が短縮し、細胞増殖は亢進していた。Microarray 解析では、PKHD1-KO CC で IL-8 の発現が有意に亢進しており、PKHD1-KO CC での細胞増殖亢進は IL-8 依存적だった。さらに PKHD1-KO CC では CTGF 発現が亢進し、その発現も IL-8 依存적だった。PKHD1-KO CC では MAPK 経路の亢進が認められ、MEK/ERK 阻害剤により IL-8 および CTGF の発現は抑制された。CHF 症例検体の解析では、肝内 IL-8、CTGF 発現量、血清 IL-8 は対照群より有意に高値だった。

**【結語】** Fibrocystin が欠損した胆管細胞における自律的な IL-8 と CTGF の発現上昇が、本疾患の胆管増生と特異な線維化に関与していることが示唆され、IL-8 と CTGF は本症の治療標的となる可能性が示された。

## WS-3

iPS細胞由来星細胞を用いた  
肝線維症治療薬スクリーニング系の  
開発

厚井 悠太、宮島 篤、木戸 丈友  
東京大学 定量生命科学研究所

肝線維症に対する有効な治療薬は未だに存在せず、治療薬の開発が望まれている。星細胞は肝障害時に活性化し、肝線維症の発症に主要な役割を果たすことから、新たな肝線維症治療薬の開発には星細胞の活性化過程を定量的に解析可能な創薬スクリーニング系の開発が不可欠である。しかしながら、ヒト生体から大量に星細胞を得ることは不可能であり、市販のヒト星細胞や株立星細胞はいずれも既に活性化していることから、創薬スクリーニング系には利用できない。そこで本研究では、新規にヒト iPS 細胞から静止期星細胞を作製し、それらを用いた創薬スクリーニングモデルを構築することを目的とした。

新たに樹立した iPS 細胞由来静止期星細胞は、従来法で作製した iPS 細胞由来星細胞やヒト初代培養星細胞と比較して、ACTA2 (αSMA) や各種コラーゲン等の発現が非常に低かった。また、iPS 細胞由来静止期星細胞をプラスチックシャーレ上で培養すると、活性化星細胞マーカー遺伝子の発現が経時的に上昇し、in vitro で活性化を誘導することができた。

そこで次に、星細胞の活性化を定量的に評価するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて ACTA2-RFP レポーター iPS 細胞を作製した。レポーター iPS 細胞から分化誘導した静止期星細胞を 384 ウェルプレートで培養して活性化を誘導すると、RFP の蛍光発現が経時的に上昇し、星細胞の活性化を可視化することができた。さらに、各ウェル内の全細胞数と活性化星細胞 (RFP 陽性細胞) の自動検出システムを開発し、活性化を抑制する TGFβ シグナル阻害剤や WNT シグナル阻害剤の効果を確実に検出することを可能にした。現在、本システムを用いたドラッグリポジショニングを実施しており、新たな線維症治療薬の同定が期待される。

## WS-4

階層的共培養肝組織を用いた  
肝線維化モデル作製にむけて

篠原 満利恵、ラオ シャオユウ、前田 夏希、  
酒井 康行

東京大学工学系研究科

肝星細胞は肝線維化における中心的な役割を担っており、肝傷害時に活性化され、筋線維芽細胞へと変化することで、多量のコラーゲン線維や TGF-β を産生する。

本研究では in vitro 肝線維化モデル構築にむけて、肝細胞・肝星細胞・類洞内皮細胞を共培養し、TGF-β 添加による線維化マーカーの変化を確認した。また、異なる酸素濃度雰囲気下における星細胞の活性化について検討した。

まず、酸素透過性の polydimethylsiloxane (PDMS) を底面とするプレートを用い、ヒトまたはラット肝細胞・ヒト由来肝星細胞・ヒト由来類洞内皮細胞の階層的な重層共培養組織を形成した。形成した共培養組織を培養酸素濃度 2.5 または 10% で維持し、また、TGF-β を添加した場合の機能と星細胞の活性化について検討した。さらに、各条件におけるアルブミンおよびコラーゲン 1A/3A の遺伝子発現量を比較した。

10% 酸素濃度雰囲気下では、共培養を 2 週間維持でき、2.5% 酸素濃度雰囲気下では細胞層の剥離が見られた。また、TGF-β の刺激によりアルブミンやシトクロムの発現量は低下した一方で、コラーゲン線維産生にかかわる遺伝子発現量は増加した。また、酸素濃度 2.5% で 10% に比べてコラーゲン線維産生にかかわる遺伝子発現量の増加が見られたことは、低酸素による星細胞の活性化を再現していると考えられた。以上より、構築した階層的共培養肝組織は、生理的な安定・低炎症状態と、刺激に応じた炎症応答 (星細胞の活性化) を再現し得ることから、肝線維化モデル組織としての利用が期待される。

## WS-5

CD147は肝線維芽細胞に発現する  
Endo180との結合を介して  
コラーゲン取り込み及び  
分解を阻害する

前田 仁志<sup>1)2)</sup>、鍋島 一樹<sup>3)</sup>、北条 裕信<sup>4)</sup>、丸山 徹<sup>1)</sup>、  
岩切 泰子<sup>2)</sup>

- 1) 熊本大学 薬学部  
2) イェール大学 医学部  
3) 福岡大学 医学部  
4) 大阪大学 理学部

**【目的】** CD147 (EMMPRIN) は肝細胞に発現し、細胞外領域に2つの Ig 様ドメインを持つ膜貫通型糖タンパク質である。肝線維症を促進するが、その機序は完全には解明されていない。線維芽細胞に発現する Endo180 は、コラーゲンの取り込みとリソソームでの分解を担う糖タンパク質受容体である。加えて肝線維化時にその発現は劇的に上昇し、抗線維化作用を発揮する。本研究では両者の相互作用と肝線維化に及ぼす影響について検討した。

**【方法】** 8週齢のSDラット(雄性)に胆管結紮(BDL, 4週間)の施術またはガス化した四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>, 12週間)を吸引させ肝硬変モデルを作成した。肝線維芽細胞株として、ラット由来初代培養肝星細胞及び門脈線維芽細胞を用いた。

**【成績】** 肝硬変ラットの肝ホモジネートを用いたウエスタンブロット解析から、肝細胞に発現するCD147はMT1-MMPの働きによりN末端領域において切断されることが明らかになった。そのN末端フラグメントは、細胞外液を介して肝線維芽細胞のEndo180に結合すると仮説を立て、糖鎖含量の異なる3種類のN末端CD147ペプチド(糖鎖含量の順にIg, GN, 11G)を作成した。肝線維芽細胞へIg, GN, 11G(1 $\mu$ M)を添加したところ、糖鎖含量依存的なEndo180への結合を示し、CD147とEndo180の結合はBDLラット由来肝ホモジネートを用いた抗CD147抗体による免疫沈降でも確かめられた。次に、TGF- $\beta$ 処理(5ng/ml)によりEndo180高発現肝線維芽細胞を調製し、Ig, GN, 11G(1 $\mu$ M)の添加を行った。その結果、糖鎖を含有するGN, 11G処理ではコラーゲンの取り込み減少が見られ、リソソームと共局在するコラーゲンの割合が減少した。一方で、Endo180 siRNAを導入した肝線維芽細胞では、いずれのペプチド処理においてもコラーゲンの取り込みが変化しなかった。

**【結論】** CD147が自身の糖鎖とEndo180との結合を介して肝線維芽細胞のコラーゲン取り込み及び分解を阻害し、肝線維化を促進する新規病態進展機序の可能性を見出した。

## WS-6

肝星細胞におけるI型コラーゲンの  
分泌およびプロセッシング過程の  
ライブイメージング解析

田中 利明<sup>1)</sup>、守矢 恒司<sup>1)</sup>、柳川 享世<sup>2)</sup>、稲垣 豊<sup>2)</sup>、  
生駒 俊之<sup>3)</sup>

- 1) 東京工業大学 生命理工学院 生命工学系  
2) 東海大学大学院 医学研究科 マトリックス医学生物学センター  
3) 東京工業大学 物質理工学院 材料系

**【目的】** コラーゲンは、真皮、骨、靱帯、軟骨などの全身組織に存在し、全タンパク質の約30%といった高い割合を占めるが、生合成過程に関する分子レベルでの情報は未だ乏しい。肝硬変などの組織線維症ではコラーゲンの量的・質的な異常が報告されているものの、コラーゲン生合成過程の情報不足が発症機構の解明を難しくしている原因の1つになっている。我々は、コラーゲンの分泌およびプロセッシングといった生合成過程の解明を目的として、I型コラーゲンのライブイメージングシステムを開発した。本発表では、本システムにより肝星細胞を解析した結果を報告する。

**【方法】** Preprocollagen $\alpha$ 1鎖にEGFPおよびmCherryタグを付加し、内在性コラーゲン同様に線維化する可視化I型コラーゲンを構築した。これを細胞に導入し、生化学的解析およびライブイメージング解析を行った。

**【結果・考察】** 本可視化I型コラーゲンは、細胞内で3重鎖以上を形成すると共に、細胞外でコラーゲン線維を形成することを確認した。まずは、線維芽細胞を用いたライブイメージング解析により、これまでに報告のあるcis-Goldi networkと同サイズ程の分泌顆粒により、trans-Goldi Networkをコラーゲンが仮足に沿って細胞外まで運ばれる様子が観察された。一方、プロセッシングの過程については、既存情報とは異なり、プロコラーゲンのN末端およびC末端のプロペプチドが、それぞれ異なる様式で切断され、異なる運命をたどることが明らかとなった。また、コラーゲンのプロセッシングおよび輸送過程では、細胞の鉛直軸に沿った位置による新たな機能分担を見出した。本コラーゲン・ライブイメージングシステムを肝星細胞に適用することにより、活性化に伴って生じるコラーゲン生合成過程の変化が見えてきた。この変化と線維化とのリンクを探ることで組織線維化の原因に迫ることが期待される。

**WS-7**

**CYP3A4高発現 HepaRG 由来  
肝細胞様細胞を用いたハイコンテ  
ンツスクリーニング系の確立**

多田 政子、山下 茉央、奥山 翔太

東邦大学 理学部 生物学科 幹細胞リプログラミング研究室

化合物の多くは肝臓で代謝され、その約8割の反応にP450 (CYP) 酵素が関与している。創薬開発の費用と時間の削減には、早い段階での効率的な候補化合物の毒性を含む特性評価が欠かせない。肝細胞を用いたハイコンテンススクリーニング(HCS)は、マルチウェルプレートの各ウェルに添加した化合物に対する細胞の平均応答を、リアルタイムに多色蛍光や発光量に基づき分析できるプラットフォームを提供する。この特徴を生かしたHCSは、創薬研究における候補薬の有効性と安全性のスクリーニングを加速化できる。蛍光を指標としたHCSでは、顕微鏡から得たマルチパラメータ画像を評価し、定量的データを抽出する。この実現には、均質なヒト肝細胞様細胞(HLCs)をマルチウェルプレートで二次元(2D)培養する方法の開発が不可欠である。しかし、生体における応答を示すHLCsを生成するには、3D培養が有効であると考えられている。本研究では、HLCsへの分化能をもつヒト肝癌細胞株 HepaRG 細胞の成熟度を高められる2Dマルチウェル細胞培養法の改善を実施した。さらに、均質なHLCsを大量かつ容易に提供できる拡大培養法を開発した。CYP3A4プロモーター下で制御を受けて緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現するトランスジェニック HepaRG 細胞を用い、特定のタイプのガラス底プレート上の2D培養方法が細胞成熟および代謝活性の増加を有意に促進することを見出した。さらに、運搬が容易なカルチャーバック上で均質なHLCsを取得し、閉鎖系での培養と通常の培養皿での培養との違いを数的・質的に評価した。この解析結果を報告する。2Dマルチウェル細胞培養条件下での機能的なHepaRG由来HLCsは、CYP3A4発現のレポーターとの併用により、さまざまな種類の実用研究に大きく貢献すると期待される。

A series of horizontal dashed lines spanning the width of the page, providing a template for writing or drawing.

# 一般講演

一般講演Ⅰ [ 肝の発生と胆管形成 ]

一般講演Ⅱ [ 肝組織構築 ]

一般講演Ⅲ [ NASH の病態と治療 ]

一般講演Ⅳ [ 肝炎と線維化 ]

一般講演Ⅴ [ 肝発癌 ]

## O-01

妊娠期母体肝臓における肝細胞の  
ダイナミクス解析上月 智司<sup>1)2)</sup>、豊島 文子<sup>1)2)</sup>1) 京都大学 ウィルス・再生医科学研究所 組織恒常性システム分野  
2) 京都大学 生命科学研究所 高次生命科学専攻 細胞増殖統御学分野

肝臓は代謝や解毒作用、胆汁の生産・分泌など多数の生理機能を持ち、体内の恒常性を維持している。これらの機能は肝臓内の細胞が協調して働くことで維持される。これまで、定常状態や種々の障害における、肝臓内に存在する細胞のダイナミクスやその活性化機構について多数の報告がなされてきた。しかし、これらの細胞が体の生理的变化にどのように応答するのかは、まだ明らかになっていない。

妊娠期には母体の臓器で形態的、機能的に変化が見られ、代謝状態が大きく変化する。特に肝臓は顕著に肥大する。この現象は、妊娠期特異的な代謝状態の維持に深く関与し、正常な妊娠・出産に必須と予見される。さらに、その破綻により妊娠期に特異的な疾患がもたらされると考えられる。妊娠期に肝臓が肥大し、特異的な代謝状態を維持する機構として、肝機能を担う実質細胞である肝細胞および、肝前駆細胞の起源とされる胆管上皮細胞が関与する可能性が考えられた。そこで、本研究では妊娠期における肝細胞、胆管上皮細胞のダイナミクスについて解析を行った。

まず、肝細胞および胆管上皮細胞の増殖率を検証したところ、ゾーン1肝細胞および胆管上皮細胞の増殖率は妊娠8日目で上昇しており、以降は減少していた。一方、ゾーン3肝細胞の増殖率は妊娠16日目で上昇していた。また、細胞サイズも同様に、ゾーン1肝細胞は妊娠8日目に、ゾーン3肝細胞は妊娠16日目に肥大化していた。次に、Sox9CreERT2および、Axin2CreERT2マウスを用いて細胞系譜解析を行ったところ、ゾーン1、3に存在するこれらの増殖性の高い肝細胞が妊娠期に優位に増殖しないことが明らかとなった。また、K19CreERT2マウスを用いた細胞系譜解析より、胆管上皮細胞は妊娠中に、肝細胞へ分化しないことが明らかとなった。現在AAV8を用いて肝細胞をランダムかつスパースに標識し、各ゾーンの細胞系譜解析を行っている。

## O-02

三次元培養系を用いた  
転写因子 Klf5 による  
胆管リモデリング制御機構の解析

伊藤 暢、山田 みなみ、宮島 篤

東京大学 定量生命科学研究所 幹細胞創薬社会連携部門

重篤・慢性的な障害をうけた肝臓では、胆管上皮組織が実質領域中の障害部位へと進展する組織リモデリング(胆管増生)が誘導され、肝再生に寄与している。転写因子 Krüppel-like factor 5 (Klf5) を欠損するマウスでは、胆汁うっ滞性肝障害にともなう胆管増生の誘導が顕著に抑制される。とりわけ、増生した胆管組織構造の一部が分離するという特徴的な表現型が認められ、Klf5 がリモデリングにより生じた胆管組織構造の維持に関わる可能性が強く示唆される。本研究では、Klf5 の機能と作用機序の詳細を明らかにするための In vitro 解析系の構築をおこなった。

*Klf5*<sup>lox/lox</sup> マウス肝臓より EpCAM<sup>+</sup> 胆管上皮細胞を分取してクローン増殖性の細胞株を樹立し、レトロウイルスベクターをもちいて Tamoxifen 誘導型 Cre 組換え酵素 (CreERT2) 遺伝子を導入した。こうして作成した細胞株は、野生型のマウス胆管上皮細胞株と同様に、コラーゲンゲル中での3次元培養条件下で樹状組織構造を形成した。この状態で、培地への4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) 添加により CreERT2 の活性化を誘導すると、*Klf5* 遺伝子の発現量は添加後12時間 (h) には1/20以下に減少し、24h までにはほぼ完全に消失することを確認した。胆管の樹状組織構造を観察すると、4-OHT 添加後24h で細胞間隙ならびに細胞の形態に著明な変化が認められた。さらに、30h 以降には組織構造の崩壊がはじまり、遊離した胆管細胞塊が生じていた。以上により、生体マウス肝組織中で認められた *Klf5* 遺伝子欠損にともなう胆管組織構造維持の不全という現象を、本培養系においても再現できたと考えられた。現在、Klf5 下流の機能遺伝子の探索を中心に、胆管樹状組織構造の維持あるいは崩壊を制御する分子機構の解析を進めている。

O-03

## 神経伝達物質による胆管増生の制御

谷水 直樹、三高 俊広

札幌医科大学 医学部 フロンティア医学研究所 組織再生学部門

肝臓組織内の自律神経は、代謝や血流、部分肝切除後の肝再生などを制御することが知られている。一方で、慢性的な肝疾患や再生における自律神経の役割は不明な点が多い。また、肝臓組織内での交感神経と副交感神経の分布は明確ではない。

まず、肝内の交感神経と副交感神経の自律神経の分布を明らかにするために、Tyrosine hydroxylase (TH) と Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) に対する抗体を用いた免疫染色を行ったところ、肝臓組織内の神経線維の大部分が TH (+) であった。次に、神経末端が形成されている細胞を特定するために、Synaptic vesicle に局在する Synaptophysin に対する抗体を用いた免疫染色を行い、超解像顕微鏡を用いた観察を行った。その結果、胆管上皮細胞の近傍に Synaptophysin (+) の神経末端が存在していることも明らかになった。

次に、慢性肝疾患における自律神経の役割を検討するために、マウスに交感神経の神経伝達物質である Adrenaline 受容体のアゴニストである Isoproterenol を皮下注射し、3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocolidine (DDC)-diet を与えた。Isoproterenol 投与群では、胆管増生が促進されていた。自律神経が胆管上皮細胞に直接作用した可能性を検討するために、Adrenaline および Isoproterenol を添加して、EpCAM (+) 胆管上皮細胞の3次元培養を行った。その結果、Adrenaline、Isoproterenol ともに胆管上皮細胞によるシスト形成を促進した。

以上の結果より、肝内の自律神経は、胆管上皮細胞に作用して胆管増生を促進する効果を示すことが明らかになった。

O-04

## ゲノム編集を用いたヒト iPS 細胞由来胆管疾患解析系の構築

紙谷 聡英<sup>1)</sup>、近田 裕美<sup>1)</sup>、鶴谷 康太<sup>2)</sup>、加川 建弘<sup>2)</sup>

1) 東海大学 医学部 分子生命科学

2) 東海大学 医学部 消化器内科学

**【目的・方法】** 肝発生過程において、肝細胞・胆管細胞は肝前駆細胞から分化し肝臓を形成する。我々は、ヒト iPS 細胞から誘導した肝前駆細胞の長期培養系を樹立している。そこで本研究では iPS 細胞由来肝前駆細胞から胆管前駆細胞へと分化させた後に、三次元ゲル包埋培養することで胆管様の Cyst 構造を誘導した。さらに難治性胆管疾患である多能性肝のう胞の原因遺伝子を変異させた疾患 iPS 細胞をゲノム編集によって樹立したのちに、この胆管構造培養系で解析することで疾患病態の *in vitro* 再現が可能か検討した。

**【結果】** ヒト iPS 細胞から CD13<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> 肝前駆細胞の誘導に成功している。この細胞の継代培養中に CD13 陰性になった細胞が出現する。この CD13 陰性細胞は、CD13 陽性細胞と比べて肝細胞系の遺伝子発現が抑制される一方で一部の胆管関連遺伝子の発現が上昇するなど胆管様の性質を持つ。そこで細胞外マトリクスに包埋培養を行った結果、胆管マーカー(サイトケラチン7, 19) 陽性・肝細胞マーカー( $\alpha$ フェトプロテイン) 陰性で細胞極性を持つ胆管様構造体を誘導できることを見出した。

肝臓内に胆管由来のう胞が多数発生する多能性肝のう胞症は、家系解析から絨毛等に関係する遺伝子異常が原因と報告されたが、その詳細や根治療法は未だ明らかでない。そこで、原因遺伝子の一つである PRKCSH 遺伝子座を CRISPR/Cas9 を用いて変異させたヒト iPS 細胞を作製し、上記の胆管構造誘導系で培養した。その結果、PRKCSH 変異 iPS 細胞からは野生型と比べて多数の胆管様構造を誘導できることがわかり、PRKCSH 変異が胆管系への分化促進等に関わる可能性を示した。

**【考察】** ヒト iPS 細胞から胆管構造の誘導系を構築し、病態解析へと応用できることを示した。

O-05

三次元スフェロイド培養による  
ヒト iPS 細胞由来肝細胞  
ReproHepato™ の機能向上

田尾 文哉、赤間 剛、小島 伸彦

横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科  
生命環境システム科学専攻

**【背景・目的】** 現在、創薬プロセスにおける医薬品候補化合物の薬効・毒性評価試験にはヒト初代肝細胞を用いているが、供給の不安定さやロット差が問題となっている。ヒト iPS 細胞由来肝細胞の利用は初代肝細胞の問題点を克服することが期待されている。しかし、iPS 細胞由来肝細胞は初代肝細胞と比べ薬物代謝能が低く、成人肝細胞よりも胎児肝細胞に類似した性質を示す。そこで本研究では、市販のヒト iPS 細胞由来肝細胞 ReproHepato™ を用いて、一般的な二次元平面培養に比べてより生体肝組織に近い機能を維持する三次元細胞凝集体(スフェロイド)培養を実施し、iPS 細胞由来肝細胞の肝機能を向上することを目的とした。

**【方法】** ヒト iPS 細胞由来肝細胞 ReproHepato™ を解凍後、 $2 \times 10^6$  cells/ml に調整した細胞懸濁液を 3% メチルセルロース (MC) 培地中に  $1 \mu\text{l}$  吐出し、肝スフェロイドを作製した。MC 培地中で 2 日培養後、最長 12 日間の静置培養を行った。機能評価について、定量 PCR による薬物代謝酵素 CYP3A4、1A2、2B6 の遺伝子発現量の解析および luciferase assay を用いた CYP3A4 活性の測定を実施した。

**【結果】** 一般的なスフェロイド形成法 (U-bottom plate culture, Hanging-drop culture) ではスフェロイドが形成されなかったのに対して、3% MC 培地を用いることでスフェロイドを作製できた。スフェロイド培養を開始し、6 日目から 14 日目で継時的な CYP 遺伝子発現量の解析を行なった結果、6 日目から 14 日目にかけて CYP 遺伝子の発現が向上することを見出した。14 日目のスフェロイドにおける CYP3A4、1A2、2B6 の遺伝子発現は 6 日目の平面培養と比較して、それぞれ約 100 倍、約 450 倍、約 15 倍向上した。また、14 日目でスフェロイドの CYP3A4 活性は、平面培養と比べ約 30 倍増加した。

**【結論】** 3% MC 培地によってヒト iPS 細胞由来肝細胞の三次元スフェロイド培養が可能であること、さらに、培養期間を延長することで CYP の発現および活性が向上することが示された。

O-06

細胞認識性マトリックス工学から  
見た幹細胞オルガノイドの問題点

後藤 光昭、赤池 敏宏、関 禎子

国際科学振興財団バイオマテリアル研究所

再生医療の実現に向け、幹細胞の標準化が重要視されている。現在、①細胞ソース、②作成方法、③細胞培養方法、④細胞純化、など細胞培養の方法論を中心に議論が進んでいる。しかしながら、細胞培養する際に細胞が長時間にわたり接触し、増殖していくマテリアルに注目している研究は皆無である。特に、細胞接着性シャーレは広く細胞培養に使用されているが、その特性や会社間での差異に全くと言って良いほど注意されていない。細胞接着性シャーレは、プラズマ処理され、水酸基、カルボキシル基、アミノ基などの官能基が付与されている。特に、水酸基は、ポリスチレンに付与された場合ポリフェノール型の官能基が作成されることになり、細胞に取ってどのような影響が出ているか全く不明である。

我々は細胞認識性バイオマテリアル設計・開発を長年研究してきた。我々の AFM でのナノレベルでの解析から、このような官能基を持つシャーレ表面は、作成時期、作成会社によって顕著な表面構造が大きく異なることが明らかになっている。加えて、固定化されている細胞認識性官能基が、細胞の機能発現、増殖など様々に非常に大きな影響を及ぼすことを示してきた。従って、上記の様な、官能基が幹細胞培養時に大きな影響を及ぼしていることは、自明で有り、さらに各社製品によって異なることは非常に大きな問題であると認識する。

さらに、我々は、糖鎖高分子からなるバイオマテリアルを用いて肝細胞スフェロイドを作成し、評価してきた。細胞は、生体組織内においても何らかのマトリックスに接着し、さらに近隣の細胞同士で相互作用することで機能を発揮している。現在議論されている幹細胞オルガノイドは、これまでの我々の知見やこれらマトリックスの問題点を全てネグレクトして研究されていることに関する我々の見解を報告したい。

O-07

肝線維症モデルマウスに対する  
ヒト iPS 細胞由来肝細胞様細胞及び  
血管内皮細胞を用いた  
新たな治療法の開発

中村 徹<sup>1)2)</sup>、古賀 浩徳<sup>1)2)</sup>、増田 篤高<sup>1)2)</sup>、  
岩本 英希<sup>1)2)</sup>、安倍 満彦<sup>1)2)</sup>、鈴木 浩之<sup>1)2)</sup>、  
鳥村 拓司<sup>1)</sup>

1)久留米大学 医学部 内科学講座 消化器内科部門  
2)久留米大学先端癌治療研究センター 肝癌部門

【目的】我々はこれまで CD34<sup>+</sup> 細胞を用いた肝再生療法に関する基礎的・臨床的研究成果を数多く報告してきた。さらに治療効果を高めるためには、投与した細胞の標的組織への生着率向上と異なる種類の細胞投与による相加・相乗効果を評価することは大きな課題である。我々は足場材料として3次元的環境を初めて可能にした自己組織化ペプチド(PuraMatrix)を用いた肝再生治療の臨床応用を目指すこととし、今回肝線維症モデルマウスに対するヒト iPS 由来肝細胞様細胞 (iHep) 及び iPS 由来血管内皮細胞 (iEC) 移植による治療効果を検証したので報告する。

【方法】*In Vitro* : ヒト iHep (ReproHepato) は ReproCELL より購入し、ヒト iEC (MiraCell) は Takara Bio より購入した。両細胞の細胞特性を FACS 解析した。*In Vivo* : 免疫不全マウス腹腔内に4週間四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>) を投与し肝線維症を作製した。その後以下の8群に群別した: 生食水、PuraMatrix のみ、2 × 10<sup>6</sup> cells/kg の iHep、iEC 或いは2種類の細胞を同量含む細胞 (iMix) を PuraMatrix 併用の有無で脾注し移植した。その間も CCl<sub>4</sub> は投与継続し、投与開始後57日目に屠殺した。線維化の評価は Azan 染色及び αSMA に対する免疫組織化学、Real-time PCR で評価した。肝細胞の増殖活性は抗 PCNA 抗体を用いた免疫組織化学で検討した。

【成績】*In Vitro* : FACS 解析にて、iHep は albumin 及び CYP3A4 が陽性、iEC は CD31、CD34 が陽性であった。*In Vivo* : 肝線維化及び αSMA 陽性面積率は、対照群と比較し PuraMatrix 併用 iHep、iEC、iMix 移植群及び PuraMatrix 非併用 iMix 移植群において有意に減少した。Real-time PCR による *Coll1a1* 遺伝子発現は、iHep 移植群においてのみ PuraMatrix 併用の有無で両群間に有意差を認めた。PCNA 陽性肝細胞率は、対照群と比較し PuraMatrix 併用 / 非併用 iHep 及び iMix 移植群において有意に増加した。

【結論】PuraMatrix 併用の有無に関わらず、iMix 移植が肝線維症に対しより良い治療効果を得られることが示唆された。

O-08

## 肝脂肪化、オートファジー機能障害による非可溶性核蛋白の発現変化を利用した血清オートファジーマーカーの開発

山科 俊平、泉 光輔、深田 浩大、内山 明、今 一義、池嶋 健一

順天堂大学 医学部 消化器内科

【目的】細胞内蛋白分解機構の一つであるオートファジーは非アルコール性脂肪性肝疾患や肝癌など多くの肝疾患において病態進展に寄与すると考えられている。一方、非可溶性核蛋白(核マトリクス蛋白)の発現変化が細胞増殖・腫瘍化と密接に関与することが報告され、細胞死の際に血中に流出されることから腫瘍診断マーカーとして利用されている。本研究ではオートファジー機能不全モデルや脂肪肝モデルの肝核蛋白不溶画分解析を行い血清オートファジーマーカー同定の可能性について検証した。

【方法】Atg7f/f(WT), Atg7f/f: Alb-Cre (Atg7KO), C57B6J (B6J), NAFLD モデル (KKAy) の肝組織より核蛋白を抽出した。核蛋白不溶画分の二次元電気泳動を行い銀染色後に蛋白発現を比較した。発現変化を認めた蛋白は LC-MS/MS 解析によって同定された。組織並びに血清中の同定蛋白発現をウエスタンブロット (WB) 法にて確認した。またマウス肝組織切片の免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて蛋白の細胞内局在を評価した。

【結果】マウス肝より抽出した不溶性核蛋白の二次元電気泳動では WT 637, Atg7KO 745, B6J 639, KKAy 632 の発現スポットを得た。Atg7KO (vs WT) と KKAy (vs B6J) で発現が増加した不溶性核蛋白のうち WB 法にて発現が上昇し、免疫染色にて肝細胞核への局在を確認できたものは 14-3-3ζ, Importinα4, Importinβ の 3 つであった。これら 3 つの蛋白は Atg7KO マウスと KKAy マウスの血清においても発現増加を認めた。

【結論】肝細胞における核蛋白の品質管理にもオートファジーが関与しているものと考えられた。一方、オートファジー機能不全や肝脂肪化によって発現が増加した 3 つの非可溶性核蛋白は血清オートファジーマーカーとして有用である可能性が示唆された。

O-09

## 3次元還流培養法における 13C-glucose 呼気試験による培養モニタリング

松浦 知和<sup>1)</sup>、中村 まり子<sup>1)</sup>、政木 隆博<sup>1)</sup>、目崎 喜弘<sup>1)</sup>、工藤 陽香<sup>1)</sup>、白井 美佐子<sup>1)</sup>、相澤 守<sup>2)</sup>

1) 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座

2) 明治大学 理工学部 材料工学

【目的】3次元高密度還流培養法は、細胞から組織・臓器の再構築、固形がん研究、ウイルス感染・増殖研究、薬物毒性評価など多岐に渡る基礎研究・開発研究・実用化研究で必要とされている。培養状態のモニタリングには、培養液のグルコース消費量や乳酸産生量の測定や溶存酸素量の測定を行うことが多い。今回は、バイオ人工肝臓(肝臓オルガノイド)の viability や機能の状態をモニタリングする 13C-glucose 呼気試験について実例を紹介し、その有用性について発表する。

【方法】高密度3次元還流培養装置は、ラジアルフロー型バイオリアクター(Radial-Flow Bioreactor: RFB、株バイオット)を用いた。RFBは細胞充填型リアクターで、細胞が付着する多孔質ビーズには、多孔質ハイドロキシアパタイトビーズ(アパセラム、HOYA-PENTAX)、Apatite Fiber Scaffold (AFS、明治大学)等を用いた。培養装置は、RFBの他に、混合ガス供給装置、リザーバー、還流ポンプから構成され、リザーバーの培養液に混合ガスを注入し、リザーバーの気層から排気される。培養液に 13C-glucose を添加し、細胞によって 13CO<sub>2</sub> が産生され、培養液に溶存する。リザーバーからの排気を呼気バックで集めて、13CO<sub>2</sub>測定用赤外分光光度計(POCone、大塚電子)を用いて排気中の 13CO<sub>2</sub> を測定した。

## 【結果】

- 1) 肝癌細胞株 (FLC-4, FLC-7) の培養
- 2) 不死化肝細胞・内皮細胞・星細胞共培養
- 3) 薬物投与による影響
- 4) 肝臓以外の細胞の培養

について、13C-glucose 呼気試験による培養モニタリングの結果を示す。

【結論】13C-glucose 呼気試験は細胞の形態を直接観察することができない3次元還流培養において有用な培養モニタリング法であるとともに、機能変化・毒性を評価できる。さらに、動物やヒトでも安全な糖代謝試験(肝臓インスリン抵抗性の判定)として応用可能である。

O-10

### 肝星細胞のオートファジーが NASH 肝癌の発育進展に与える 影響の検討

明神 悠太、疋田 隼人、小玉 尚宏、竹原 徹郎

大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学

**【目的】** 肝癌細胞のオートファジーは癌の発育進展に寄与するとされているが、星細胞のオートファジーが与える影響は未だ明らかではない。そこで、肝星細胞のオートファジーが、肝癌発育進展に与える影響を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 肝癌細胞株として HepG2、Hep3B を、肝星細胞株として LX2 を用いた。GFP- LC3-RFP -LC3ΔG プローベを強制発現した肝星細胞株 LX2 を作成し、GFP と RFP の比から星細胞のオートファジーを検討した。LX2 の Atg7 ノックアウト細胞を作成し、肝癌細胞と免疫不全マウスに共移植を行った。肝星細胞特異的にオートファジー必須遺伝子 Atg7 を欠損した GFAP-Cre Atg7 fl/fl (GFAP-Atg7KO マウス) を作成し、ストレプトゾシンと高脂肪食による NASH 肝発癌モデルを用いて肝癌発育進展に与える影響を検討した。

**【結果】** 肝癌細胞株と共培養すると LX2 のオートファジーが亢進した。共培養後に肝癌細胞株の細胞数を定量すると、肝癌細胞は LX2 と共培養することで細胞数が増加した。LX2 の Atg7 ノックダウンにより、共培養による肝癌細胞の増殖促進効果は抑制された。共培養時と単培養時の LX2 のケモカイン・サイトカインを網羅的に測定したところ IL6 が共培養時に高値であった。LX2 の IL6 をノックダウンすると共培養時の細胞増殖効果が抑制され、LX2 の Atg7 をノックダウンすると上清中の IL6 増加が軽減した。Atg7 をノックアウトした星細胞と肝癌細胞を共移植した腫瘍ではコントロールと比して腫瘍増大速度が低下した。GFAP-Atg7 KO マウス、WT マウスに発癌を誘導すると、20 週齢で腫瘍形成率はそれぞれ 83% (10/12)・100% (12/12) であり、肝体重量比、最大腫瘍径は WT マウスに比して GFAP-Atg7 KO マウスで有意に小さかった。αSMA 免疫染色では GFAP-Atg7 KO マウスで有意に腫瘍部の陽性細胞が少数であり星細胞の活性が抑制されていた。

**【結論】** 肝星細胞のオートファジーは IL6-STAT3 pathway を介して肝癌の発育進展に寄与している。

O-11

### Farnesoid X Receptor 阻害薬を 基軸にした NASH 治療の試み (DPP4 阻害薬およびアンジオテンシン II 受容体拮抗薬併用による検討)

下里 直隆、浪崎 正、鍛治 孝祐、中西 啓祐、

吉治 仁志

奈良県立医科大学 内科学第3講座

**【背景】** 我々はこれまでに FXR 作動薬 (FXR-A) が活性化肝星細胞 (Ac-HSC) の増殖や TGFβ 産生を抑制して、NASH 肝線維化を著明に改善することを明らかにしてきた。今回は ARB と DPP4 阻害薬 (DPP4-I) やアンジオテンシン II (ATII) 受容体拮抗薬 (ARB) 併用による新規 NASH 治療の可能性について検討した。

**【方法】** (検討1) F344 ラットにコリン欠乏アミノ酸 (CDAA) 食を 12 週間投与して NASH モデルを作成し、DPP4-I 投与群 (D 群)、INT747 投与群 (F 群)、両者併用群 (DF 群)、非投与群 (C 群) の 4 群、(検討2) OLETF ラットに豚血清を週 2 回、8 週間腹腔内投与して実験的肝線維症を作成し、G1: FXR-A 投与群、G2: ARB 投与群、G3: 両者併用群、G4: 非投与群の 4 群に分けて各種パラメーターにつき検討を行った。

#### 【結果】

〈検討1〉肝線維化進展に伴い Ac-HSC 数、肝内 TGF-β、及び α1-procollagen-I 発現は著明に増加した。各単剤投与によりこれらは有意に抑制されていたが、両者併用ではより強い抑制効果が認められた。CDAA 投与により腸管透過性亢進に伴って減少した Zo-1 発現は FXR-A 群及び併用群で有意に改善した。In vitro の検討では、ヒト星細胞株 LX-2 の増殖は Sitagliptin 及び併用処理で有意に抑制されていた。

〈検討2〉G1 及び G2 では G4 に比し、肝線維化及び Ac-HSC 数、肝内 TGF-β、α1-procollagen-I、TLR4 及び小腸 TLR4 発現が有意に抑制され、G3 でさらに強い抑制効果が認められた。G1 及び G3 では G4 に比し、肝 LBP 発現、腸管透過性及び小腸 IFN γ 発現は有意に抑制され、小腸タイトジャンクション蛋白 (Zo-1) 発現は有意に上昇した。In vitro の検討では、ATII+LPS 刺激で有意に上昇した LX-2 の NFκB、Myd88 及び Smad3 のリン酸化は、各薬剤の単独処理により有意に抑制され、併用処理によりさらに強く抑制された。

**【結論】** FXR-A と ARB または DPP4-I 併用療法は、各々異なる作用機序を有して、NASH の進展を相乗的に抑制したことから、NASH 治療に新たな可能性を開くと考えられた。

0-12

PPAR $\alpha$  modulator  
—ペマフィブラートによる  
肝炎・肝機能障害抑制効果

大橋 一夫<sup>1)2)</sup>

1)あびこ内科外科大橋クリニック

2)大阪大学 薬学研究所

**【目的】** PPAR $\alpha$  modulator であるペマフィブラート (パルモディア) は、肝細胞核内受容体である PPAR $\alpha$  の活性化を介し中性脂肪 (TG) を加水分解することにより中性脂肪値を低下させる。既存のフィブラート系薬剤と異なる点は、ペマフィブラートは PPAR $\alpha$  の立体構造変化をもたらす働きも併せ持つことから、肝細胞の脂質代謝関連遺伝子群の発現調節作用も有しているとされている。このことは、肝細胞に対して脂質代謝以外にも多面的な作用を発揮することが推測される。そこで本研究においては、ペマフィブラート内服治療を行った患者において、慢性肝炎・肝機能障害抑制効果を臨床指標から観察した。

**【対象】** 当院において2019年2月末までにペマフィブラートを内服投与した63名中、内服開始後の血液データが得られた35名を対象とした。投与開始前 ALT 値 $\geq$ 40U/L は17名、 $\gamma$ -GTP 値 $\geq$ 48U/L は18名であった。

**【結果】** 35名での TG 値は、ペマフィブラート投与前  $416.7 \pm 584.3$  mg/dL から投与後  $208.7 \pm 181.7$  mg/dL と有意に低下した。従来のフィブラート系薬剤から処方を変更した13名では平均値が  $260.2$  mg/dL から  $189.1$  mg/dL と平均値として27%のTG値低下を示した。ALT 高値17名では全患者で有意な ALT 値低下 ( $71.6 \pm 41.4$  U/L  $\rightarrow$   $42.7 \pm 14.0$  U/L) がみられた。 $\gamma$ -GTP 高値18名では17名において $\gamma$ -GTP 低下がみられ、その低下は有意であった ( $176.3 \pm 237.9$  U/L  $\rightarrow$   $71.8 \pm 62.3$  U/L)。

**【結語】** PPAR $\alpha$  modulator のペマフィブラートを用いる治療は、適応疾患の高 TG 血症治療に加え、慢性肝炎や肝機能障害の一部の症例において新しい治療アプローチとなり得ることを明らかとした。

O-13

## C型肝炎ウイルス感染肝細胞における microRNA の網羅的発現プロファイリングと機能解析

政木 隆博<sup>1)</sup>、目崎 喜弘<sup>1)</sup>、中村 まり子<sup>1)</sup>、加藤 孝宣<sup>2)</sup>、脇田 隆字<sup>2)</sup>、松浦 知和<sup>1)</sup>

1) 東京慈恵会医科大学 医学部 臨床検査医学講座

2) 国立感染症研究所 ウイルス第二部

**【目的】** C型肝炎ウイルス(HCV)は肝細胞に高発現している microRNA-122(miR-122)をハイジャックし、相互作用することにより増殖可能となる。HCVによる miRNA 経路のハイジャックは肝細胞内の遺伝子発現を調整する正常な miRNA 機能を攪乱する可能性を有しているが、HCV 感染時の miRNA 発現やその機能の詳細は明らかとなっていない。今回、HCV 感染細胞における miRNA の網羅的発現プロファイリングと機能解析を目的とした。

**【方法】** HCV 感染、非感染の肝癌由来細胞株 Huh-7.5.1 から RNA 抽出後マイクロアレイを施行し、HCV 感染に伴い発現変動する mRNA 及び miRNA を網羅的に解析した。miRNA 機能は、内在性標的遺伝子の発現もしくは miRNA の標的配列をレポーター遺伝子の3'非翻訳領域に有するルシフェラーゼレポータープラスミド導入後のルシフェラーゼ活性を指標に解析した。HCV が影響を及ぼす miRNA 経路の詳細を理解するために、miRNA の成熟化に関する宿主因子のノックダウン及び過剰発現実験を行なった。

**【成績】** マイクロアレイの結果、miR-122を含む代表的な miRNA の発現は HCV 感染後も不変か軽度上昇に留まったが、それらの標的 mRNA 発現は感染後広範かつ有意に上昇しており、定量 RT-PCR でも同様の結果を得た。HCV 構造タンパク質を欠くサブゲノミックレプリコン(SGR)細胞では、過剰量の合成 miRNA 導入後に標的 mRNA の発現上昇が有意に抑制されたが(miRNA 機能の回復)、HCV 感染細胞では抑制されず、miRNA 機能不全が持続した。さらに、この機能不全は miRNA-induced silencing complex(miRISC)構成タンパク質のノックダウンにより SGR 細胞においても再現され、反対に、過剰発現により感染細胞の miRNA 機能が回復した。

**【結論】** HCV 構造タンパク質が宿主 miRISC を標的とし、その機能を障害することにより広範な miRNA 機能不全を惹起する可能性が示唆された。特に、抗発癌作用を有する miR-122 の機能抑制は肝発癌機序の知見としても期待される。

O-14

## インターフェロン様の活性を持つ低分子化合物 CDM-3008 の抗 HBV 活性の解析

古谷 裕<sup>1)</sup>、戸口 真理子<sup>1)</sup>、戎井 悦子<sup>1)</sup>、樋口 祥子<sup>1)</sup>、須藤 正幸<sup>1)</sup>、鈴木 治和<sup>2)</sup>、掛谷 秀昭<sup>3)</sup>、小嶋 聡一<sup>1)</sup>

1) 理化学研究所 生命医科学研究センター

肝がん予防研究ユニット

2) 理化学研究所 生命医科学研究センター

細胞機能変換技術研究チーム

3) 京都大学 薬学研究科 システムケモセラピー・制御分子分野

**【背景】** B型肝炎の治療薬として核酸アナログ製剤とインターフェロン(IFN)製剤が一般的に用いられている。核酸アナログ製剤はB型肝炎ウイルス(HBV)の複製を抑制するだけで、肝細胞内でHBVのゲノムとして働くcccDNAを分解することができず、HBVが再活性化する可能性がある。また、IFN $\alpha$ はAPOBEC3のシチジンデアミナーゼ活性を介してcccDNAを分解することが報告されている。

**【目的】** IFN様の活性を持つ低分子化合物 CDM-3008 の抗 HBV 活性を解析し、効率よくcccDNAを分解する低分子化合物を開発することを目的とした。

**【方法】** 初代培養ヒト肝細胞(PXB細胞)にHBVを28日間感染させた後に、7日間CDM-3008で処理し、細胞内のHBV DNA, cccDNAと培養液中のHBsAg, HBeAgを測定した。また、PXB細胞をCDM-3008またはIFN $\alpha$ で4, 8時間処理した後に遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。

**【成績】** CDM-3008はHBV DNA, cccDNA, HBsAg, HBeAgを濃度依存的に抑制した。CDM-3008とIFN $\alpha$ は主にInterferon stimulated Genesの発現を誘導した。APOBEC3F, GがCDM-3008とIFN $\alpha$ 処理により発現量が上昇しており、この活性によりcccDNAを分解したと考えられた。CDM-3008特異的に発現上昇する分子として、インターフェロン受容体の下流でJAK/STATシグナルを抑制するSOCSファミリーを同定した。

**【結論】** CDM-3008は抗HBV活性を持ち、IFNと同様にAPOBEC3を介してcccDNAを分解していることが示唆された。現在、CDM-3008の構造活性相関研究を行っており、より活性が高く副作用を低減した化合物の取得を目指している。

O-15

## Lawsone はヒト CYGB 遺伝子発現誘導作用を持つ抗線維化化合物である

大黒 敦子<sup>1)</sup>、松原 勤<sup>2)</sup>、松原 三佐子<sup>1)3)</sup>、池田 一雄<sup>2)</sup>、河田 則文<sup>1)</sup>

- 1) 大阪市立大学 大学院医学研究科 肝胆臓病態内科学
- 2) 大阪市立大学 大学院医学研究科 機能細胞形態学
- 3) 大阪市立大学 大学院医学研究科 合成生物学寄付講座

**【目的】** 肝硬変は、活性化肝星細胞や筋線維芽細胞などが産生するコラーゲンが過剰に蓄積した状態であり、年率8%で発がんする。本研究グループは、肝星細胞に豊富に発現するサイトグロビン(CYGB)が肝線維化に抑制的に働くことを明らかにしてきた。そこで、本研究では、肝硬変治療薬の開発を目指し、コラーゲン産生を抑制し、CYGB 遺伝子発現を誘導する化合物を探索し、その分子機序を解析することを目的とした。

**【方法および結果】** ヒト COL1A2 遺伝子プロモーターの下流に mCherry 遺伝子をつなげた DNA 断片を LX-2 細胞に導入した抗線維化評価系を構築した。その評価系およびヒト初代培養星細胞株 HHStcC を用いて、大阪大学産学連携化合物ライブラリーの化合物をスクリーニングしたところ、COL1A 発現を減弱させ、CYGB 発現を増強させる化合物 Lawsone (2-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) を同定した。Lawsone は、抗線維化物質 PGC-001 よりも低濃度で HHStcC の COL1A 発現抑制作用を示した。また、Lawsone は、TGF $\beta$  が惹起する  $\alpha$ SMA、COL1A 発現の増強ならびに CYGB 発現の減弱を抑制した。TAA モデルを用いたマウス実験では、シリウスレッド染色で肝線維化の軽減がみられ、遺伝子発現解析においてもコラーゲン発現の抑制がみられた。加えて、薬物相互作用に関わるタンパク質 31 種(薬物代謝酵素ならびに細胞膜レセプター)に関する阻害作用を検討したところ、Lawsone は、いずれのタンパク質の活性を阻害しなかった。

**【結論および考察】** スクリーニングから同定された Lawsone は、in vivo と in vitro においても抗肝線維化作用を示し、抗線維化治療薬として有用であると示唆された。医薬品開発につなげるためには、作用機序ならびに安全性を詳細に調べる必要があり、現在検討中である。

O-16

## 肝線維症に対する肝星細胞の脱活性化誘導因子による遺伝子治療の展望

中野 泰博<sup>1)2)</sup>、紙谷 聡英<sup>1)3)</sup>、住吉 秀明<sup>1)2)</sup>、鶴谷 康太<sup>4)</sup>、加川 建弘<sup>4)</sup>、稲垣 豊<sup>1)2)</sup>

- 1) 東海大学大学院 医学研究科 マトリックス医学生物学センター
- 2) 東海大学 医学部 再生医療科学
- 3) 東海大学 医学部 分子生命科学
- 4) 東海大学 医学部 消化器内科

肝星細胞は肝小葉内の類洞壁の内側に位置し、肝細胞と相互作用することで肝細胞機能や再生能の向上に寄与する。一方で、肝臓が傷害を受けると炎症刺激により肝星細胞は活性化し、コラーゲン線維を過剰に産生して線維束を形成することで肝線維症を引き起こす。また、実験的に炎症刺激を除くと、活性化星細胞は静止期様細胞へと“脱活性化”することで肝線維症が改善することも明らかになった。我々は昨年の大会において、*in vitro* において活性化星細胞を脱活性化誘導する新規の転写因子(以下、TfX)を同定したことを報告した。本年は肝線維症モデルマウスを用いて、TfX による肝星細胞の脱活性化誘導ならびに線維化の改善効果を検討した。

はじめに、活性化星細胞に高親和性を有するアデノ随伴ウイルス6(AAV6)を用いて、TfX-IRES-GFP 過剰発現ベクター(以下、A6T)ならびに対照として Control-IRES-GFP 過剰発現ベクター(以下、A6C)を作製した。次に、野生型マウスに対して四塩化炭素を3日毎に計20回の皮下投与を行い、肝線維症を誘導した。このマウスに対して A6T または A6C を腹腔投与した後、さらに四塩化炭素を同様に5回投与した。

A6C 投与群の肝組織ではコラーゲンの線維束や再生結節の形成を認めたのに対して、A6T 投与群ではそれらがほぼ消失していた。また、肝組織中の線維化関連遺伝子の発現や血清中のトランスアミナーゼ値は、A6C 投与群と比較して A6T 投与群で有意に減少した。さらに、AAV6 感染により遺伝子導入された GFP の発現は、A6C 投与群では線維束を形成する  $\alpha$ SMA 陽性の活性化星細胞で認められたのに対して、A6T 投与群では肝小葉内に位置し Desmin を発現する静止期様星細胞に認められた。

これらの結果より、AAV6 を介した TfX の過剰発現は、活性化星細胞を静止期様細胞へと脱活性化することで、肝線維化の改善と肝機能の向上をもたらすことが示され、肝線維症に対する遺伝子治療の展望が開かれた。

O-17

## 肝細胞癌における長鎖非コード RNA NEAT1による癌幹細胞制御機能

土谷 博之、汐田 剛史

鳥取大学 大学院医学系研究科 遺伝子医療学部門

**【背景】** 癌の発生や再発、悪性化における癌幹細胞の重要性が多くの研究により明らかにされているが、癌幹細胞の制御メカニズムには不明な点もいまだ多く残されている。長鎖非コード RNA (lncRNA) には、癌と関わりを持つものが多数同定されており、その一部は癌幹細胞との関連が指摘されている。lncRNA の一つである NEAT1 は、肝細胞癌 (HCC) において変異が最も多い lncRNA として報告されているが、HCC においてどのような機能を持つのかほとんどわかっていない。そこで本研究では、NEAT1 の過剰発現が HCC の癌幹細胞性に与える影響について検討を行った。

**【方法】** ヒト肝細胞癌由来細胞株 HuH7 と HepG2 から、マウス Neat1 の過剰発現細胞株と、CRISPR/Cas9 により NEAT1 転写開始点直下に mCherry 遺伝子を挿入した NEAT1 ノックアウト (KO) 細胞株を作製した。さらに HuH7 細胞から作製した NEAT1-KO 細胞にヒト NEAT1 発現ベクターを導入した、レスキュー (RSC) 細胞株を作製した。遺伝子発現はウェスタンブロットあるいは定量的 PCR により解析した。癌幹細胞性は、癌幹細胞マーカー発現、スフェロイド形成能、薬剤感受性により評価した。

**【結果】** マウス Neat1 の過剰発現により、スフェロイド形成能や薬剤抵抗性は、コントロール細胞と比べ有意に上昇した。このときスフェロイドにおける癌幹細胞マーカー CD44 は、マウス Neat1 により有意に発現上昇していた。一方、NEAT1-KO 細胞株ではスフェロイド形成能および薬剤抵抗性の低下を認め、スフェロイドにおける CD44 発現も顕著に低下していた。さらに RSC 細胞では、癌幹細胞性および CD44 発現が回復していた。

**【結語】** これらの結果より、NEAT1 は肝癌幹細胞の誘導・維持に関与する lncRNA であることが明らかとなった。

O-18

## 転写共役因子 YAP 誘導性肝細胞がん発症機構の解析

長岡 勇也

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】** 肝臓は解毒や代謝などを担う重要な器官である。我々は、転写共役因子 YAP が活性化したマウス傷害肝細胞が1週間以内に排除されることを見出した。しかし、排除から数ヶ月後の肝臓の状態や、排除されずに残存した活性型 YAP 発現肝細胞の動態は不明である。本研究では、マウス肝臓へモザイク状に YAP を導入し、細胞排除後の肝臓の状態および YAP 発現肝細胞の動態を解析することを目的とした。

**【方法】** C57BL/6J または ROSA-LacZ マウスの肝臓に、Myc タグ付き野生型 YAP (wt) および活性型 YAP (1SA)、YAP (2SA) をそれぞれ発現するプラスミドまたは、YAP (2SA) と Cre を共発現するプラスミドを、Hydrodynamic tail vein injection を用いてモザイク状に導入した。経時的に肝臓を回収し、肝臓の状態と YAP 発現肝細胞の動態を解析した。YAP 発現肝細胞は Myc タグおよび  $\beta$ -Gal の発現で追跡した。

**【結果】** YAP (wt) では発現肝細胞の排除は観察されず、6ヶ月経過しても肝がん形成は観察されなかった。YAP (1SA) では発現肝細胞の排除が観察され、肝がんは形成されなかった。一方、YAP (2SA) では発現肝細胞の排除は観察されたが、3ヶ月後から肝細胞がんが形成された。興味深いことに、がんを構成する細胞のうち、YAP (2SA) 発現肝細胞由来の  $\beta$ -GAL 陽性細胞は一部分であり、大部分は  $\beta$ -GAL 陰性細胞であった。以上の結果は、YAP (wt) は Hippo による不活性化によって、YAP (1SA) は細胞排除によって恒常性が維持されること、正常肝細胞由来のがん細胞が含まれることを示唆する。

**【考察】** 本研究から、YAP 活性の程度によって肝細胞の運命が変化すること、また、YAP (2SA) 発現肝細胞によって正常肝細胞ががん化誘導された可能性が考えられる。

O-19

### HBV 関連肝発癌のメカニズム： HBx と c-MYC による URI1 発現誘導作用

竹永 亜衣、土谷 博之、汐田 剛史  
鳥取大学 大学院医学系研究科 遺伝子医療学部門

**【目的】** 世界における HBV 関連肝細胞癌 (HCC-B) は全肝癌の約 4 割を占め、減少する傾向はまだ見えていない。我々は既存の治療薬とは異なる新たな標的分子を探索するため、肝細胞癌発症のドライバー遺伝子として新たに報告された URI1 に着目し、HCC-B における発現とその発現誘導メカニズムを検討した。

**【方法】** URI1 遺伝子のプロモーター活性は、ヒト URI1 プロモーターを組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を、HBx やヒト c-MYC 発現ベクターとともに、肝癌細胞株 HuH7 と HepG2 に遺伝子導入し測定した。さらに HBx 発現細胞として、Hep3B と PLC/PRF/5 に加え、HuH7 と HepG2 に HBx 発現ベクターを組み込んだ HBx 安定発現細胞 (それぞれ H7-HBx、G2-HBx) とそのコントロール (H7-CTRL、G2-CTRL) を作製した。

**【結果】** HCC-B 腫瘍組織における URI1 発現陽性率は、HBs 抗原陰性腫瘍組織と比べ、有意に高かった。ヒト URI1 のプロモーター配列を検討すると、HBx と相互作用することがすでに知られている c-MYC が結合する E-box が予測されたため、レポーターアッセイを行った。その結果、c-MYC がこの E-box 依存的にヒト URI1 プロモーターを活性化し、その作用を HBx が増強することが示された。さらに肝癌細胞株に c-MYC を過剰発現させると URI1 発現が誘導され、HBx 存在下においてその発現はさらに亢進した。

**【考察】** HBx による c-MYC の活性化とそれによる肝発癌誘導メカニズムはよく知られている。今回の結果より URI1 は、その下流で肝発癌を促進する因子として機能している可能性が示された。

**【結語】** URI1 は HCC-B の新たな治療標的となりうることを示唆された。今後さらなる検討により、HCC-B における URI1 発現誘導の意義の解明が重要である。

O-20

### マウス肝腫瘍における 胎児期・新生児期遺伝子の発現： 癌遺伝子活性に伴うエピゲノム変化

西川 祐司<sup>1)</sup>、渡邊 賢二<sup>1)2)</sup>、山本 雅大<sup>1)</sup>、辛 氷<sup>1)</sup>、  
大塩 貴子<sup>1)</sup>、後藤 正憲<sup>1)</sup>、藤井 清永<sup>1)</sup>、劉 洋<sup>1)</sup>、  
岡田 陽子<sup>1)</sup>、古川 博之<sup>2)</sup>

1) 旭川医科大学 病理学講座 腫瘍病理分野

2) 旭川医科大学 外科学講座 肝胆脾・移植外科学講座

**【はじめに】** 肝腫瘍は種々の胎児期・新生児期遺伝子を発現するが、そのメカニズムについては不明の点が多い。我々は癌遺伝子をマウス肝細胞ゲノムに導入して肝発癌を誘導するモデルを用い、癌遺伝子と胎児期・新生児期遺伝子発現の関連およびエピゲノム変化について検討した。

**【方法】** 雄性成熟 C57BL/6J マウスに癌遺伝子を組み込んだ Sleeping Beauty トランスポゾンベクターとトランスポゼース発現ベクターの hydrodynamic tail vein injection を行い、肝細胞に癌遺伝子を導入した。癌遺伝子として、変異活性型 HRAS、ミリストイル型 AKT、Myc を単独または組み合わせて用いた。誘発された肝腫瘍を病理組織学的に検討し、胎児期・新生児期遺伝子および蛋白発現を調べた。また、腫瘍におけるエピゲノム変化を *Line1* 遺伝子メチル化状態、DNA メチル化調節制御酵素遺伝子 (*Tet*, *Dnmt*) 発現などにより検討した。

**【結果】** Myc を除き、癌遺伝子単独で腫瘍が形成された。Myc は他の癌遺伝子の発癌を促進した。組織学的には分化度の異なる肝細胞癌であったが、HRAS/Myc 導入では N/C 比の高い肝芽腫様の腫瘍が誘発された。胎児期・新生児期遺伝子の発現は、HRAS および HRAS/Myc 誘発腫瘍で顕著に認められ、前者では *Akr1c18*, *Gpc3*, *Cpe*, *Abcd2*, *Tff3* が、後者では *Igf2bp3*, *Afp*, *Igf2*, *H19*, *Dlk1* が特異的に発現した。AKT を導入した腫瘍では、胎児期・新生児期遺伝子の発現は抑制される傾向が認められた。HRAS、HRAS/Myc 誘発腫瘍に共通して *Line1* の脱メチル化、*Tet1* mRNA 発現増加がみられたが、前者では *Dnmt3a* mRNA 発現が低下し、後者では *Dnmt1*, *Dnmt3* mRNA 発現増加が認められた。

**【結論】** 肝腫瘍における胎児期・新生児期遺伝子の発現には、癌遺伝子シグナリング活性化と引き続くエピゲノム変化が関与していることが示唆された。

# ポスター発表

ポスター発表Ⅰ [ 肝の発生と組織構築 ]

ポスター発表Ⅱ [ 肝再生と分化・機能 ]

ポスター発表Ⅲ [ 肝細胞傷害 ]

ポスター発表Ⅳ [ NASH の病態と治療 ]

ポスター発表Ⅴ [ 肝線維化と発癌 ]

P-01

脊椎動物肝臓における平滑筋組織の  
発達部位に関する形態進化的解析太田 考陽<sup>1)2)</sup>、廣瀬 晴香<sup>3)</sup>、前田 ひかり<sup>4)</sup>、  
池尾 一穂<sup>5)</sup>、塩尻 信義<sup>3)</sup>

- 1) 静岡大学 大学院 自然科学系教育部 バイオサイエンス専攻
- 2) 日本学術振興会 特別研究員
- 3) 静岡大学 理学部
- 4) 国立研究開発法人 国際水産資源研究所 鯨類資源グループ
- 5) 国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJ 研究センター

**【背景と目的】**我々は、「脊椎動物の共通祖先が初めて獲得した肝臓という臓器が、私たち哺乳類まで引き継がれていく過程でどのような形態ならびに機能進化があったのか」に興味を持ち研究を進めている。これまでの研究で、脊椎動物の肝臓構築を肝内胆管の走行に注目して分類し、ヒトのように肝内胆管が門脈と並走するタイプ(並走型)と、門脈とは独立して実質部に分散するタイプ(独立型)があることを発見した。これらの肝臓構築は脊椎動物の系統進化に沿う形で形態進化しており、哺乳類が保持する並走型構築は肝臓誕生時からの初期型であり、独立型は真骨魚類にて並走型から進化した新規構築であると推察された。本研究では、並走型と独立型の肝臓構築の生理学的意義を議論するために、様々な比較解析を行った中で、最も特徴的な変化が確認された肝臓内での平滑筋組織の発達部位の違いについて報告する。

**【方法】**脊椎動物各分類群の肝臓において、 $\alpha$ 平滑筋アクチンの免疫組織化学染色を行い、平滑筋組織の発達部位を組織学的に比較した。

**【結果と考察】**原始的な脊椎動物である軟骨魚類に加え、解析した全ての条鰭類では、平滑筋組織は肝内胆管周囲と肝動脈周囲に発達していた。また、陸上四肢動物に最も近縁なハイギョ等の肉鰭魚類でも同様であった。その一方で、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類の陸上四肢動物の肝臓では、共通して肝内胆管周囲に平滑筋組織の発達は認められず、代わりに平滑筋組織は門脈周囲に分布していた。これらの結果から、平滑筋組織の発達部位の進化は胆管配向の進化とは独立し、陸上四肢動物固有のイベントで起きていると予想され、この形態進化は脊椎動物の陸上進出と関わっている可能性が考えられた。その一方で、陸上進出後に水棲適応した鯨類の肝臓に関して同様の解析を行った結果、鯨類の肝臓では他の陸上四肢動物とは異なる部位に平滑筋組織の分布が見られ、それらについての議論も行う。

P-02

多能性肝細胞を用いた肝芽形成過程  
における FGF シグナルの機能解析鳥羽 由希子<sup>1)2)</sup>、木曾 歩美<sup>1)</sup>、高山 和雄<sup>1)2)3)</sup>、  
水口 裕之<sup>1)2)4)</sup>

- 1) 大阪大学大学院 薬学研究科 分子生物学分野
- 2) 医薬基盤・健康・栄養研究所
- 3) JST・さきがけ
- 4) 大阪大学 MEI センター

**【目的】**ヒト ES/iPS 細胞は、再生医療や創薬研究だけでなく、発生学研究においても有用なツールである。これまでに、ヒト ES/iPS 細胞から肝細胞への分化誘導技術が多数報告されてきた。しかし、内胚葉細胞から肝幹前駆細胞への分化誘導技術は十分には検討されておらず、改良の余地がある。肝幹前駆細胞への分化で汎用されている fibroblast growth factor (FGF) や bone morphogenetic protein (BMP) 等の増殖因子は発生学的知見に基づいて採用されているが、ヒト ES/iPS 細胞を用いた分化誘導系での有効性を詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、内胚葉細胞から肝幹前駆細胞への分化誘導過程における FGF や BMP の機能解析を行った。

**【方法】**ヒト ES/iPS 細胞に Activin A を作用させ、内胚葉細胞へと分化誘導した。その後、肝幹前駆細胞の分化に関与することが報告されている BMP4 や FGF1/2/4/10 を用いた10通りの組合せから、肝幹前駆細胞への分化を促進する条件を探索した。作製した肝幹前駆細胞を評価するため、cytokeratin 19 (CK19) 等の肝幹前駆細胞マーカーの発現解析を行った。

**【結果・考察】**従来の肝幹前駆細胞への分化誘導法では BMP4 と FGF を併用することが一般的であったが、BMP4 と FGF 併用時と比較して BMP4 単独作用群の方が肝幹前駆細胞マーカーの遺伝子発現量が高値を示した。また、CK19陽性細胞は、87% から 94% に上昇した。さらに、内胚葉細胞における FGF2 の産生量を測定したところ、485 pg/ml であった。以上のことから、内胚葉細胞は FGF2 を自己産生できるため、肝幹前駆細胞への分化過程において FGF を作用する必要はなく、むしろ過剰量の FGF シグナルは肝幹前駆細胞への分化を阻害することが分かった。今後、FGF および BMP4 シグナルの下流で働く因子の解析を行うことにより、ヒト肝芽形成プロセスの解明を進める。

P-03

器官培養法を用いた  
マウス胎生期肝芽細胞から  
肝内胆管作出の試み

新井 四葉、塩尻 信義

静岡大学大学院 総合科学技術研究科 理学専攻 生物科学コース

マウスの胆管系は肝外胆管と肝内胆管からなるが、肝外胆管は肝内胆管よりも先に発生し、両者の起源も異なる。肝外胆管は肝原基尾部から発生し、肝内胆管は肝原基頭部から発生した肝実質部で門脈周囲の肝芽細胞が門脈間充織から Jag1 シグナルによる誘導を受け、2層の細胞からなる ductal plate を経て形成される。肝内胆管の形成は肝門部から末梢に向けて進むことが知られるが、その形成メカニズムはまだ明らかになっておらず、インビトロで肝芽細胞から肝内胆管を形成させた報告もほとんどない。本研究では、肝内胆管形成のメカニズムを明らかにするために器官培養系を用いて、インビトロで肝芽細胞から肝内胆管の作出を試みた。

方法として、肝内胆管形成の認められない胎生 12.5 日マウス肝臓を肝外胆管付きの近位肝臓片(含肝門部)と、遠位肝臓片とに分け、ステンレスメッシュ台座上のニトロセルロース膜上に置いて5日間培養を行った。培地に、胆管形成が亢進する C/EBP $\alpha$  遺伝子欠失マウス肝臓で発現が上方制御する成長因子などを添加することにより、その胆管形成の効果を組織学的に評価した。その結果、通常培地では血管系や肝外胆管の維持・肝細胞の成熟が確認されたが、近位肝臓片、遠位肝臓片ともに肝内胆管の誘導はできなかった。一方、成長因子を加えた培地で培養を行うと、近位肝臓片でのみ、肝外胆管に接続して、あるいは肝外胆管から少し離れたところに上皮様の細胞からなる肝内胆管前駆様構造が現れた。この結果から、加えた成長因子が直接または間接的に肝内胆管誘導に関与している可能性が示唆された。遠位肝臓片では変化が見られなかったことから、肝外胆管あるいは肝門部組織が肝内胆管形成に関与している可能性があることも示唆された。

今後は、現れた肝内胆管前駆様構造を分子マーカーなどによって解析を行うことや、複数の成長因子を組み合わせて培養を行うことで肝内胆管の誘導を試みる予定である。

P-04

Nanofibers made with hepatocyte  
growth factor as bioactive scaffold  
in HepG2 cell cultureYannick Tauran<sup>1)2)</sup>、Laura Bourdon<sup>1)</sup>、  
Arnaud Brioude<sup>1)</sup>、酒井 康行<sup>2)</sup>、Eric Leclerc<sup>2)</sup>、  
Vincent Salles<sup>1)</sup>

1) LMI CNRS UMR 5615, Université Lyon

2) LIMMS/CNRS-IIS UMI 2820, Institute of Industrial Science,  
The University of Tokyo

In liver regenerative medicine, the development of bioactive scaffolds remains a challenge for producing functional hepatic tissue. Among the main issues to tackle, the scaffold should offer an environment that maintains the structure integrity of the bioactive molecule and provide a time controlled release.

Here, we fabricated poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanofibers that were prepared using an electro-printing technology combining 3D printing and electrospinning techniques. Electrospinning can produce nano-scale fibers incorporating bioactive molecules while 3D printing enables the construction of a specific design that can fit with the hepatic tissue architecture. PLGA polymer presents also the advantages to be biocompatible and degradable allowing the possible release in the cell culture medium of active compounds.

In this study, the bioactivity of the Human Growth Factor (HGF) incorporated during the polymerization process of the nano-fibers, has been assessed on HepG2 cells. HGF has been described in the literature to have an effect on cell proliferation activity of HepG2. After coating the nano-fibers with Collagen Type 1, the effect of HGF has been characterized through a series of biochemical assays such as WST-8 cell proliferation assay, Western Blot, qPCR. Observations have been also performed by Electronic and confocal Microscopy.

Our results show that the nano-fibers (without HGF) induce a high proliferative effect of HepG2 cells compared to the 2D surface of Petri dishes. HepG2 cells attach well to the nano-fibers (SEM observations), increase their metabolic activity with Albumin production, and express higher Cyclin D and E genes involved in the cell cycle progressions. Finally, when HepG2 cells are cultivated on the nano fibers with HGF, a decrease in cell proliferation is observed compared to the bare nano-fibers.

P-05

## 直接的細胞接着に依存する肝細胞と星細胞の緊密な相互作用

松原 三佐子<sup>1)2)</sup>、谷口 絵美<sup>1)3)</sup>、松原 勤<sup>4)</sup>、  
宇留島 隼人<sup>4)</sup>、大黒 敦子<sup>2)</sup>、森浦 芳枝<sup>1)</sup>、  
門野 千穂<sup>1)2)</sup>、池田 一雄<sup>4)</sup>、和氣 健二郎<sup>4)5)</sup>、  
河田 則文<sup>2)</sup>、吉里 勝利<sup>6)</sup>

- 1) 大阪市立大学大学院医学研究科 合成生物学寄附講座
- 2) 大阪市立大学大学院医学研究科 肝胆臓病態内科学
- 3) 日進製作所
- 4) 大阪市立大学大学院医学研究科 機能細胞形態学
- 5) ミノファーマ製薬
- 6) 株式会社 フェニックスバイオ

肝臓は固有の内胚葉性上皮系実質細胞としての肝細胞と間充織系の非実質細胞群から構成されており、星細胞は後者の一員である。肝細胞と星細胞は肝臓のビタミンAのホメオスタシスや線維化など生理学・病理学的に密接な関係を持っている。私たちはその相互作用の仕組みを細胞培養の手法を利用して調べている。細胞培養で標準的に使用されているポリスチレン性培養容器(培養皿あるいはウエル)は細胞への親和性を高めるため親水処理されており、細胞同士の相互作用を生体内の純粋な状態で調べるのは不適であると考え、細胞への親和性の低い(親水処理されていない)容器(疎水性皿或いは疎水性基質)を使用し、以下のことを明らかにした。

星細胞と疎水性基質の相互作用は第一段階(接着)、第二段階(接着面積の増加、以下、伸展)、及び第三段階(細胞周期の開始、以下分裂と呼ぶ)に分類できることが分かった。接着は温度非依存的、進展は温度依存的、分裂は血清依存的であった。一方、肝細胞は、疎水性基質に接着できないため、進展段階に進行できなかった。ところが、星細胞を接着させた後に肝細胞を播種すると、接着と伸展が可能であった。このことから、肝細胞は星細胞を接着基質(足場)として利用し、その機能を発現していることが強く示唆された。共培養した星細胞は単独培養と比較して樹状突起を顕著に発達させていた。両者の生理的な相互作用を見るためこれらの細胞によるレチノールの取り込み活性を調べたところ、共培養した場合が、それぞれの単独培養に比べて、高い取り込み活性が観察された。

以上の結果から、私たちは、肝細胞と星細胞のそれぞれの正常機能発現には両者の物理的な温度非依存的接着が必須であり、それによって温度依存的化学シグナリングが誘導され、肝臓の正常機能の発現に繋がっていると結論付けた。

P-06

## iPS細胞由来肝星細胞を用いた肝細胞共培養モデルの開発

森 勇介<sup>1)</sup>、樋口 珠美<sup>1)</sup>、森村 馨<sup>1)</sup>、厚井 悠太<sup>2)</sup>、  
木戸 丈友<sup>2)</sup>、宮島 篤<sup>2)</sup>、我妻 昭彦<sup>1)</sup>、山田 忠範<sup>1)</sup>、  
山本 武<sup>1)</sup>

- 1) 富士フイルム株式会社  
バイオサイエンス & テクノロジー開発センター
- 2) 東京大学 定量生命科学研究所

創薬分野において、iPS細胞由来肝細胞は工業的に安定した生産が可能となることから有望な肝細胞ソースとなり得る。しかしながら現状では、iPS細胞由来肝細胞は、初代肝細胞に比べて幼若で細胞機能が不十分であることから、創薬研究における使用は限定的である。我々は肝細胞を用いた肝モデル開発に向けて、iPS細胞由来肝細胞の機能向上に着手した。生体における肝臓組織の成熟過程の模倣から、肝細胞周囲に局在する肝非実質細胞の一つである肝星細胞に着目し、*in vitro* 共培養モデル構築に向け検討を開始した。ヒト初代培養肝星細胞は入手方法が限られていることが課題であるため、ヒトiPS細胞から肝星細胞の誘導方法を検討した。本発表では、分化誘導したiPS細胞由来肝星細胞と肝細胞との共培養系における、CYP活性および遺伝子発現の改善効果について報告する。

P-07

**Development of integrated liver cells culture enables autologous bile recovery**

Astia Rizki Safitri

東京大学大学院 工学系研究科 生産技術研究所

Engineered in vitro liver models are accelerating the development of a cell-based assay for numerous purposes including drug test and liver disease treatment. In the case of the drug test, the presence of liver metabolite or known as bile is essential considering that bile stores information of drug metabolism process. Yet, an available liver culture enables bile recovery is less relevantly developed which might be a regressive impact for rapid drug development. This study is prevailing those matters by developing the in vitro liver model that prospect for in vitro metabolite-bile recovery. We are aiming to develop an integrated liver culture that combining both bile-producing tissue and bile duct structure. A partial bile duct tubular structure of rat that established from liver progenitor cells coculture was integrated with the primary rat hepatocyte employing permeable collagen membrane-culture insert. Results demonstrate fine compatibility of hepatocyte as bile-producing cell and bile duct structure in the culture system. It also exhibits favorable transportation and significant accumulation of metabolite-bile analog from hepatocyte to bile duct structure. This study explains the pragmatic design of in vitro metabolite-bile recovery and endorses the relevancy of in vitro liver model for cell-based assay.

**Keyword:** Liver cell culture, bile, cell-based assay

P-08

**Modelling NASH for drug discovery using 3D liver microtissues**西村 章子<sup>1)</sup>、Simon Ströbel<sup>2)</sup>、Jana Rupp<sup>2)</sup>、Patrick Guye<sup>2)</sup>、Simon Messner<sup>2)</sup>、Eva Thoma<sup>2)</sup>、Radina Kostadinova<sup>2)</sup>

1) 株式会社ビジコムジャパン

2) InSphero AG

**Background:** Currently, there is no approved therapy for NASH. Predictive in vitro models are required for understanding the complex mechanism underlying disease initiation, its progression and for developing novel therapeutics.

**Aim of this study:** We aimed to develop a human in vitro 3D liver model for lipotoxic stress which shows key physiological features of steatosis, inflammation and fibrosis, thus recapitulating key processes occurring during NASH pathogenesis.

**Results:** Based on our 3D InSight technology we established an in vitro microtissue model incorporating all the relevant liver cell types for the development of NAFLD and NASH pathogenesis such as human hepatocytes, Kupffer cell, endothelial cell and hepatic stellate cells. Upon treatment with free fatty acids and LPS in medium containing high sugar levels, microtissues showed key physiological aspects of NASH. Increased lipid accumulation within the hepatocytes, as well as tissue secretion of pro-inflammatory markers was detected. Further treatment with NASH stimuli resulted in increased deposition of ECM, indicating the activation of fibrotic pathways. Elafibranor, a PPAR  $\alpha / \delta$  agonist, inhibited the secretion of the pro-inflammatory markers.

**Conclusion:** We suggest that our model is a promising tool to understand NASH pathogenesis and to test efficacy of novel drug candidates. Compatible with high-throughput screening approaches, this model is a powerful tool for assessing efficacy of anti-NASH drugs.

P-09

脱細胞化肝臓骨格の還流培養による類洞様構造の構築

渡邊 應文<sup>1)</sup>、矢野 公規<sup>1)</sup>、大川 航輝<sup>1)</sup>、八木 洋<sup>2)</sup>、北川 雄光<sup>2)</sup>、須藤 亮<sup>1)3)</sup>

1)慶應義塾大学大学院 理工学研究科 総合デザイン工学専攻

2)慶應義塾大学 医学部 外科学教室

3)慶應義塾大学 理工学部 システムデザイン工学科

【背景】脱細胞化肝臓は臓器スケールの肝臓組織の構築に有用であり、移植可能な肝臓組織を構築することが期待されている。しかし脱細胞化肝臓を用いて構築した組織を移植すると、血管構造が不完全であることにより組織内部で血液漏出や血栓形成が生じ、生体内での長期的な維持が難しいことが報告されている。そこで本研究では、脱細胞化肝臓において、類洞様構造を有する血管ネットワークを再構築することを目的とした。

【方法】脱細胞化肝臓の作製にあたり、ラットから摘出した肝臓の門脈から酵素や界面活性剤を流すことにより、肝臓内部の細胞を除去した。また血管構造を再構築するために、GFPで蛍光標識されたヒト臍帯静脈内皮細胞を門脈から注入した。その後、細胞を充填した脱細胞化肝臓をローラーポンプと接続することにより還流培養を行い、蛍光顕微鏡によって血管構造を観察した。

【結果および考察】本研究では、静置培養条件および3種類の還流培養条件(2.4, 4.7, 9.4 ml/min)の計4条件において構築された血管の形態を比較した。培養開始から48時間後に、全ての条件において脱細胞化肝臓内で血管ネットワークが構築されていることが確認されたが、静置培養では類洞様構造(φ5-15 μm)は観測されなかった。それに対して、還流培養では類洞様構造が構築されていることが確認され、特に門脈より4.7 ml/minの流量で還流した条件において類洞様構造が最も多く形成された。さらに、この条件において内皮細胞が流れ方向に配向していることが確認された。このことは、血管内皮細胞が流れの刺激を受容することによって類洞様構造を形成したことを示唆している。さらに、脱細胞化肝臓をフィブロネクチンでコーティングすることによって還流培養における類洞様構造の形成が促進されることを見出した。以上より、脱細胞化肝臓において類洞様構造を再構築できることが判明した。

Dotted lines for writing notes.

P-10

Vasoactive intestinal peptide による  
胆管形成調節の分子機序

佐藤 綾子<sup>1)</sup>、柿沼 晴<sup>1)2)</sup>、土屋 淳<sup>1)</sup>、三好 正人<sup>1)</sup>、  
角田 知之<sup>1)</sup>、井津井 康浩<sup>1)</sup>、中川 美奈<sup>1)</sup>、東 正新<sup>1)</sup>、  
朝比奈 靖浩<sup>1)2)</sup>、渡辺 守<sup>1)</sup>

1)東京医科歯科大学 消化器病態学

2)東京医科歯科大学大学院 肝臓病態制御学

**【目的】**胆管形成においては、肝前駆細胞(肝芽細胞)と肝間葉系細胞の細胞間相互作用が重要であるが、その分子機序には不明の点が残されている。我々は既報にて、Matrix Metalloproteinase (MMP) 14欠損(KO)マウス肝臓で胆管構造の形成が遅延することを示した。本研究はMMP14-KOマウス肝臓を利用し、肝間葉系細胞由来の因子が肝前駆細胞からの胆管形成を制御する分子機序を解明することを目的とした。

**【方法】**胎生16.5日マウス胎仔肝から肝間葉系細胞分画(LMC)としてCD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>p75NTR<sup>+</sup>画分をFACSにより分取した。胆管形成モデルとして、既報に従い胎生13.5日Dlk+肝芽細胞から3次元培養系を用いてcholangiocytic cyst(CC)を誘導し、LMCと共培養して、その形質を解析した。さらに、DDCによる細胆管反応誘導マウスモデルにおける候補分子の寄与を検討した。

**【成績】**CC形成時において、野生型(WT)-LMCとの共培養が有意に形成を促進したのに対し、MMP14-KO LMCとの共培養では形成促進効果を認めなかった。網羅的発現解析の結果、MMP14-KO LMCで発現が低下していた液性因子としてVasoactive intestinal peptide(VIP)を抽出した。CCではVIP受容体(VIPR)の発現を認め、VIPを添加すると有意にその形成が促進された。逆に、VIPR1をknock downするとCC形成の促進効果が阻害された。VIPはCCにおけるtight junctionの成熟化とCFTR・Aqp1の発現を亢進させた。一方で、肝芽細胞の肝細胞成熟化に対してVIPは抑制的に作用した。WTマウス胎仔肝臓では、胆管形成期にVIP及びVIPR1の発現が上昇していた。WT成体マウスにDDCによる細胆管反応を誘導するとVIP、VIPR1の発現が著明に低下する一方で、DDC中止後の回復期にはいずれの発現も回復していた。

**【結論】**肝間葉系細胞が産生するVIPは肝芽細胞による胆管形成に促進的作用を示し、その作用はVIPR1を介していた。成体においては、VIP/VIPR1シグナルは肝障害からの回復に寄与する可能性が示された。

P-11

## ダイレクトリプログラミング法を用いたイヌ骨髄由来間葉系幹細胞から肝細胞様細胞への分化誘導の試み

新田 卓、草刈 雄登、山田 陽子、久末 正晴

麻布大学 獣医学部 小動物内科学研究室

**【背景】**細胞移植医療や創薬研究における毒性試験の新たなツールとして、骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)から肝細胞への分化誘導の試みは以前より報告されている。しかしながら、サイトカイン等の液性因子による分化誘導では、分化誘導肝細胞の機能的な成熟や分化誘導効率が低いことが問題となっている。そこで我々は、イヌのBMSCsにHnf4aとFoxa1遺伝子を導入するダイレクトリプログラミング法を行い肝細胞様細胞への分化を目指した。

**【材料と方法】**健康イヌの骨髄血から単核細胞を分離し、接着培養した細胞をBMSCsとした。BMSCsの性質は、フローサイトメトリーおよび骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能により評価した。レトロウイルスベクターを用いFoxa1およびHnf4a遺伝子をBMSCsに導入し、遺伝子導入後20日まで培養を行った。肝細胞への分化度は、形態学的観察、PCRおよび免疫細胞化学により評価した。

**【結果と考察】**イヌ骨髄から得られたBMSCsをフローサイトメトリー解析した結果、CD29は97.76%、CD44が97.76%、CD90は81.72%とそれぞれ高い陽性率を示した。さらに、骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への分化能も確認された。BMSCsにFoxa1、Hnf4a遺伝子を導入し培養を行った結果、遺伝子導入後day20において円形~不定形の形態を示す細胞集団が出現した。細胞骨格であるF-actinを蛍光染色した結果、遺伝子導入前のBMSCにおいては、細胞質全体に繊維状に分布していた。これに対し、Day20では円形~不定形の形態を示す細胞においてF-actinは細胞膜直下に多く分布していた。定量的PCRの結果、遺伝子導入後day0に比べday20においてAlbuminおよびE-cadherin遺伝子の発現量が増加していた。免疫細胞化学では、day20の細胞においてAlbuminおよびE-cadherinタンパク質が検出された。

**【結論】**今回、骨髄から単離されたイヌBMSCsからAlbuminおよびE-cadherinを発現する肝細胞様細胞へと分化することができた。

P-12

Myc 阻害蛋白発現による  
部分肝切除後の肝細胞増殖抑制後藤 正憲、大塩 貴子、上小倉 佑機、孟 玲童、  
岡田 陽子、西川 祐司

旭川医科大学 医学部 病理学講座(腫瘍病理学)

【はじめに】Mycは細胞増殖や代謝調節に重要な転写因子であるが、肝細胞の再生性増殖におけるMycの役割については一定の見解が得られていない。我々は、マウス肝細胞初代培養系で、DNA合成に先行してMycの発現が増加し、siRNAによるMyc発現抑制はDNA合成を強く阻害することを明らかにした。今回我々は、マウス部分肝切除後のMyc発現変化を再検討するとともに、Myc阻害蛋白を成熟肝細胞で発現させるin vivo実験系を樹立し、肝細胞の再生性増殖におけるMycの役割を調べた。

【方法】雄性成熟C57/BL6Jマウスに70%部分肝切除を行い、経時的に肝組織を採取し、Mycおよび細胞増殖マーカー(Ki-67)の発現を検討した。Mycを競合的に阻害するMadMyc蛋白を肝細胞特異的に発現するアデノ随伴ウイルス(AAV8)ベクター(AAV8-Tbg-MadMyc-HA)を作製し、1匹当たり $4 \times 10^{11}$ vgを静注した。対照としてluciferase発現ベクター(AAV8-Tbg-Cluc-HA)を用いた。外来遺伝子の発現はhaemagglutinin(HA)タグの免疫組織化学で確認した。

【結果】Mycの発現は切除後24時間をピークとして肝細胞核内に認められた。肝細胞の細胞分裂像およびKi-67発現は切除後48時間で最大となった。MadMyc発現ウイルス静注後10日で、大部分の肝細胞にHAの核内発現が確認された。MadMyc、Cluc発現ウイルスを感染させたマウスに肝切除を行い、48時間後に解析したところ、MadMyc発現群ではCluc発現群に比べ、肝体重比が有意に減少し、肝細胞の増殖も顕著に抑制されていた。また、MadMyc発現群では肝細胞に高度の脂肪化が認められた。

【結論】Mycは部分肝切除後の肝細胞増殖に重要な役割を果たしている。

P-13

リトコール酸刺激に対する  
PTK7の役割に関する研究

尾関 宗孝、玉木 敬二

京都大学大学院 医学研究科 法医学講座

PTK7は細胞極性の形成に関わる因子として知られており、肝幹細胞から実質細胞への分化において発現が誘導されることが知られている。本研究では、胆汁鬱滞において肝細胞障害と修復を繰り返す過程でPTK7が何らかの生化学的役割を担っているのではないかと考えた。そこで、胆汁鬱滞のモデルとしてヒト肝癌細胞株HepG2細胞をリトコール酸で刺激し、その時のPTK7の発現変動とその生化学的意義について検討した。

リトコール酸刺激により、PTK7はmRNAおよびタンパク質レベルで発現が低下した。リトコール酸は核レセプターの内因性リガンドとしても知られていることから、PTK7発現抑制における核レセプターの関与を調べるために、siRNAにより各レセプターをノックダウンした時のPTK7の発現を調べた。その結果、リトコール酸による発現抑制はFXRのノックダウンにより有意に回復した。PTK7発現抑制の生化学的意義について調べるためにHepG2細胞においてPTK7をノックダウンしたところ、細胞増殖が抑制されることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、免疫染色により胆道閉鎖症患者由来の肝臓組織においてPTK7発現を調べたところ、発現低下が観察された。

以上のことから、PTK7は胆汁鬱滞下においてリトコール酸により核レセプターFXRを介して負の制御を受けており、その発現抑制により細胞の増殖低下を引き起こしていることが示唆された。

P-14

HCV に対する抗ウイルス治療後、  
SVR 後の肝細胞の超微細構造の変化

青柳 東代<sup>1)</sup>、飯島 尋子<sup>2)</sup>、松田 麻未<sup>1)</sup>、渡土 幸一<sup>1)</sup>、  
鈴木 亮介<sup>1)</sup>、政木 隆博<sup>1)3)</sup>、坪田 昭人<sup>4)</sup>、  
和氣 健二郎<sup>5)</sup>、脇田 隆字<sup>1)</sup>、相崎 英樹<sup>1)</sup>

- 1) 国立感染症研究所 ウイルス第二部
- 2) 兵庫医科大学 超音波センター
- 3) 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座
- 4) 東京慈恵会医科大学 基盤研究施設
- 5) ミノファージェン製薬

**【目的】** C型慢性肝炎に対する治療の進歩は目覚ましく、直接作用型抗ウイルス薬(DAA)の治療で9割以上の患者にウイルス学的著効(SVR)が期待できるようになってきている。その一方で、インターフェロン(IFN)治療によるSVR後10年で約1割の症例に発癌が認められていますが、DAA治療では発癌リスクの高い高齢者や線維化進展例の多くがSVRとなり、SVR後の肝障害や発癌は依然として問題として残る。本研究では、今後増加するSVR症例の適切な管理のため、SVR後の肝病態の解明を目指す。

**【方法】** SVR症例の肝組織のウイルス遺伝子解析、電顕観察を行う。

**【成績】** SVR症例の肝組織からHCV RNAを検出したところ、49症例のうち3症例でHCV RNAが検出された。また、SVR後肝細胞癌(HCC)を発症した30症例のうちHCV RNAが検出されたのは2症例であった。慢性C型肝炎の肝組織のオルガネラの変化については統一的な見解はない。そこで、HCV JFH1非感染・感染細胞に見られた所見を参考に、慢性C型肝炎(CH)患者およびSVR症例の肝組織のオルガネラ変化を解析した。HCV感染培養細胞およびCH組織の電顕観察で見出されたオルガネラ異常の所見はSVR後の時間の経過や治療法に関係なく観察された。

**【結論】** SVR症例の肝臓組織の電顕で多くのオルガネラ異常が観察されたことから、SVR後も電顕病理学的に「post-SVR syndrome」といえる病態が継続している可能性が示され、SVR後も長期的なフォローアップの必要性が見出された。

**【謝辞】** 本研究は、三又絢子、酒巻有里子、市野瀬志津子(東京医科歯科大・リサーチコアセンター)、島田紀朋(おおたかの森病院)、加藤慶三(新松戸中央総合病院)、榎本大(大阪市大)、林和彦(名城病院)、Takeshi Saito(南加大)らの協力で行われた。

P-15

マウス肝臓プロテオミクスによる  
肝細胞分化機構の解明

野村 舞<sup>1)</sup>、田川 陽一<sup>1)</sup>、青木 秀年<sup>2)</sup>、林 宣宏<sup>1)</sup>

- 1) 東京工業大学 生命理工学院
- 2) 横河電機株式会社 イノベーションセンター 研究開発部

**【背景・目的】** 近年、臓器の再生は非常に注目されているが、肝臓の場合、幹細胞から分化させた臓器は未成熟であることが知られている。慢性肝不全患者の治療や肝移植までの待機といった長期間の肝機能を補える人工肝臓の開発のためには、現時点で得られている未成熟な再生肝臓を成熟させる因子の同定が望まれる。そこで本研究では、二次元電気泳動法を用いたプロテオミクスにより、分化段階の異なるマウス肝臓を比較することで、成熟肝細胞への分化に関わるタンパク質を探索した。

**【方法】** 摘出したマウス肝臓組織を凍結粉砕し、界面活性剤を含む抽出液を用いてタンパク質を抽出して、不純物の除去、定量を行ったのち、二次元電気泳動により得られた画像を比較することで、各分化段階において有意な変化のあるタンパク質のスポットを探索し、質量分析により同定した。

**【結果】** 19.5日胚胎仔マウスと生後2日新生仔マウスの二次元電気泳動像を比較した結果、代謝経路、尿素回路、およびビタミンD輸送に関与するタンパク質が分化に伴い有意に変化することが明らかになった。

**【今後の展望】** 今回、19.5日胚胎仔マウスと生後2日新生仔マウスの比較解析を行ったが、今後、13.5日胚および18.5日胚胎仔マウス、生後4週若齢マウスを用いた統合的な解析を行うことにより、成熟肝細胞への分化機構の解明を目指す。また、得られた結果を参考にして、幹細胞から樹立した未成熟な肝細胞を、成熟肝細胞へ誘導するための方法の導出も模索する。

P-16

**ヒト肝細胞キメラマウス  
(PXB-マウス)由来肝細胞  
(PXB-cells)の in vitro 機能維持に  
おける転写因子の役割**山崎 ちひろ<sup>1)</sup>、吉実 康美<sup>1)</sup>、柳 愛美<sup>1)</sup>、小川 裕子<sup>1)</sup>、  
石田 雄二<sup>1)2)</sup>、立野 知世<sup>1)2)</sup>

1)株式会社 フェニックスバイオ

2)広島大学 肝臓・消化器研究拠点

ヒト肝細胞は培養下において多くの肝機能を速やかに消失するが、ヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス<sup>®</sup>)から分離された新鮮ヒト肝細胞(PXB-cells<sup>®</sup>)は、様々な肝機能を長期間維持出来る事を我々はこれまでに報告してきた。本研究では、培養下におけるヒト肝細胞の肝機能維持機構に関して検討を行った。PXB-cellsを高密度と低密度培条件下で3週間培養し、培養経過に伴う薬物代謝酵素(CYP、UGT)、トランスポーター(TP)、転写因子の発現変化をqPCRおよびマイクロアレイ解析により調べた。その結果、PXB-cellsにおけるこれらの多くの遺伝子は、低密度培養と比較して高密度培養において高い発現を維持していたものの、分離直後と同等レベルの発現を維持する遺伝子と発現低下を示すものに分類された。また、PXB-cellsにおける転写因子HNF4 $\alpha$ 、PXR、FXRの発現は培養期間中高いレベルで維持されていたが、CARの発現は分離直後の1/10に低下していた。さらに分離直後と高密度播種、または高密度と低密度播種での比較から、2倍以上発現が変化した遺伝子が複数同定され、これらの遺伝子に関するパスウェイ解析から、核内受容体の関与が示唆された。そこで高密度で播種したPXB-cellsのHNF4 $\alpha$ 、CAR、PXR、FXRをノックダウンし、CYP、UGT、TPへの影響を解析したところ、13遺伝子中11遺伝子の発現が50%以上低下していた。特にCARのノックダウンで発現が低下した遺伝子の多くは、高密度播種で発現が分離直後の50%以下に低下した遺伝子と一致していた。以上の結果より、高密度培養条件下のPXB-cellsにおいてCYP、UGT、TP遺伝子の発現維持には、HNF4 $\alpha$ 、CAR、PXR、FXR等の転写因子の発現維持が関与する可能性が示唆された。

P-17

**三次元培養と培地添加物の  
組み合わせによる細胞株の機能向上**

赤間 剛、小島 伸彦

横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科

**【背景】**肝細胞株を用いたインビトロ肝機能・薬物毒性評価系の確立には薬物トランスポーターと代謝酵素のいずれも高度に発現している必要があるが、細胞株では著しく低下しており実用化を果たせていない。三次元培養により肝細胞機能が亢進するが、依然として初代培養系と大きな隔たりが存在し更なる機能向上が求められる。本研究では三次元培養と組み合わせた、CYPや肝細胞内への有機アニオンの取り込みを担うOrganic Anion Transporting-Polypeptide(OATP)活性を亢進する因子の探索を行った。

**【方法】**ヒト肝がん由来細胞株HuH-7ないしHepG2を、培地添加物としてFetal Bovine Serum(FBS)ないしKnockout Serum Replacement(KSR)存在下で一週間以上培養した。細胞懸濁液に終濃度0.3mg/mlのマトリゲルを混合して3%メチルセルロース培地中に吐出することで、マトリゲル薄膜充填スフェロイドないし未充填対照を作製した。2日間培養後にスフェロイドを回収し、CYP3A4活性を測定した。またOATPの取り込み活性として、有機アニオンモデル化合物である5(6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein(CDF)を取り込ませ蛍光を検出した。

**【結果】**細胞内に取り込まれたCDFはリファンピシンの濃度に応じて減少し、OATPの活性を反映していることを示した。KSR処理はFBS処理よりCDFを取り込み高いOATP取り込み活性を示した。さらにKSR処理はCYP3A4の活性を有意に上昇させた。一方でマトリゲル薄膜充填はCDF取り込み活性及びCYP3A4活性のいずれも減少させた。リファンピシンによるCYPの誘導と異なりKSR処理はOATPの活性も増加させたことからより薬物毒性評価系に適している。

P-18

効率性と安全性に優れた  
新規修飾型エクソソームの  
開発と薬物送達手段への応用

松木 勇樹<sup>1)</sup>、住吉 秀明<sup>1)</sup>、柳川 享世<sup>1)</sup>、中野 泰博<sup>1)</sup>、  
後藤 光昭<sup>2)</sup>、赤池 敏宏<sup>2)</sup>、稲垣 豊<sup>1)</sup>

1) 東海大学大学院医学研究科 マトリクス医学生物学センター/  
東海大学医学部 基盤診療学系再生医療科学

2) 公益財団法人 国際科学振興財団  
再生医工学バイオマテリアル研究所

【目的】近年、体内動態において様々な利点を有するエクソソームが、次世代型の薬物送達手段として期待されている。しかし、エクソソーム自体の細胞内取り込み効率の低さ、エクソソーム内包物質のサイトゾルへの低放出性による効果の減弱、さらには標的細胞以外への送達による副作用の発現といった問題点から、薬物送達への応用には多くの課題が残されている。そこで本研究では、*in vivo*における体内動態や組織選択性、また *in vitro*における細胞内局在の評価を行うためのモニタリング用エクソソームの開発を行った。

【方法と結果】任意の蛋白質を内包したエクソソームを効率よく細胞から分泌させる XPack ベクター・システムを用い、ホタル・ルシフェラーゼ内包エクソソームを産生する発現プラスミドを作製した。その際、内包効率を高めるため、ルシフェラーゼ遺伝子が有するコザック配列と翻訳開始点を除去した配列を XPack ベクターのエクソソーム指向性タグと結合した発現プラスミドも併せて構築したところ、遺伝子導入された HEK293T 細胞内での活性は約20%に減少した一方で、エクソソーム内では約200%に増加した。また、エクソソームを取り込んだエンドソーム内では徐々に pH が低下して EGFP が消光する性質を利用して、細胞内局在を確認するために、mCherry と EGFP を連結した遺伝子配列を同様に XPack ベクターにクローニングした。この発現プラスミドを導入した HEK293T 細胞では、主として核内に両タンパク質の共発現を認め、ウェスタンブロットでもこれに相当する約75 kDa のバンドが同定された。

【結論】 XPack ベクターとルシフェラーゼ遺伝子独自の翻訳開始点との競合を阻止することで、エクソソームへの内包効率が向上し、モニタリングに有用なエクソソームが得られた。また、mCherry-EGFP を共発現するエクソソームの作製により、サイトゾルへの放出の有無が異なる蛍光色によって示され、細胞内局在の確認に有用と考えられた。

P-19

### 新生子ラットに対するグルタミン酸 ナトリウム毒性の系統間比較

石黒 うらら、袴田 陽二、藤澤 正彦

日本獣生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科 基礎部門  
生体機能学研究分野

実験動物のラットは医学研究用によく利用されているが、医薬品の有効性や安全性試験にはSDラット系統がよく利用されている。しかし、薬物代謝酵素である肝臓シトクロム P450 (CYP) 発現にはラットの系統間で差があることはあまり知られていない。Shapiroらはグルタミン酸ナトリウム (MSG) による GHRH 分泌抑制モデルラットを用いて、肝臓における CYP の発現が下垂体成長ホルモンの分泌パターンに依存して調節されることを明らかにした。今回、新生子 SD および Wistar ラットに MSG を投与し、その影響を比較検討した。

Wistar (WI) 及び Sprague Dawley (SD) ラットの雌雄新生子を用いて、MSG 群には MSG を生後1から9日齢まで1日おきに5回皮下投与した (44 mg/10gBW/0.1 ml)。コントロール群には同容量の生理食塩水を投与した。7週齢で動物を安楽死させ、各種臓器重量、視床下部弓状核における神経細胞数ならびに肝臓における CYP2C11、CYP2C12 およびアルブミン量を RT-PCR 法を用いて半定量的に測定した。

MSG を投与した WI ラットにおいて、SD ラットに比し有意な生存率の低下が認められ、オスにおいて顕著であった ( $p < 0.05$ )。視床下部弓状核の細胞数は SD ラットより WI ラットにおいてより減少したにも関わらず、MSG 投与による臓器重量は WI に比し、SD ラットで顕著に低下した。コントロール群の CYP2C11 および CYP2C12 発現量はいずれも SD ラットにおいて高値を示した。MSG 投与により、雌の CYP2C11 発現量は両系統ともコントロールと比較して増加したが、WI ラットにおいてより顕著であった。

以上、MSG の神経毒性に対する感受性は Wistar 系統でより強く現れ、系統差があることが判明した。ラットを用いた薬剤の安全性や薬効を評価する際には、使用する系統の特性をよく理解し、肝臓の CYP のみならず、視床下部 - 下垂体系を含め総合的に考慮する必要がある。

P-20

### 栄養飢餓ストレスは LKB1-AMPK- NRF2 依存的に MMP-9 を誘導する

志田 侑華里<sup>1)</sup>、遠藤 整<sup>1)</sup>、大和田 賢<sup>1)</sup>、稲垣 豊<sup>2)</sup>、  
立道 昌幸<sup>1)</sup>

1) 東海大学 医学部 衛生学公衆衛生学

2) 東海大学 医学部 再生医療科学 マトリックス医学生物学センター

【目的】肝がんをはじめとする固形がんは、腫瘍の増大に伴って腫瘍組織内部は低酸素・低栄養といった過酷な生育環境となる。そのような環境ストレスは、がんの悪性形質を促進すると考えられているが、環境適応し生存する機序と悪性化を獲得する機序、さらには両者に連関はあるのかなど不明な点が多い。本研究は、低栄養環境におけるがん細胞の生存と悪性形質の促進機序の解明を目指し各種検討を行った。

【方法】種々の組織由来のがん細胞株を用いて、グルコース飢餓培地で培養を行った。低栄養環境下における悪性化は、細胞遊走能や浸潤能の亢進を指標に評価した。タンパク発現ならびにシグナル伝達の活性化は、ウェスタンブロットや細胞蛍光染色により検討した。加えて、細胞内 ATP 量、活性酸素種量の測定などから低栄養環境への環境ストレス適応メカニズムを検討した。

【結果】グルコース飢餓条件により、低栄養適応において重要な役割を担う Liver kinase B1 (LKB1)/AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化に伴い MMP-9 の発現が誘導され、同時に細胞遊走能ならびに浸潤能の亢進が認められた。さらに、LKB1/AMPK 依存的なオートファジーは、NRF2 を安定化し酸化ストレス適応に関与することが明らかとなった。また、誘導された NRF2 は、MMP-9 の転写活性化に直接関与することが分かった。

【結論】以上より、がん細胞は低栄養環境下において、LKB1/AMPK の活性化を介してエネルギー代謝および酸化ストレス制御により生存を可能にし、さらには悪性化を促進するという巧みな環境適応機構が明らかとなった。

P-21

肝虚血再灌流障害における  
Ferroptosis の役割山田 直也<sup>1)2)</sup>、唐澤 直義<sup>1)</sup>、木村 博昭<sup>1)</sup>、水田 耕一<sup>2)</sup>、  
高橋 将文<sup>1)</sup>

1)自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症免疫研究部

2)自治医科大学 移植外科

**【背景】**2012年に鉄依存性細胞死 Ferroptosis が報告され、近年、様々な疾患との関連が報告されている。我々は、小児生体肝移植の約200症例の後方視的解析から、術前ドナー血清フェリチン値が小児生体肝移植における肝虚血再灌流障害 (IRI : ischemia reperfusion injury) の独立した危険因子であることを見出し、この病態に Ferroptosis が関与するのではないかと仮説を立て、動物モデルでの検討 (reversed translational research) を行った。

**【方法】**C57BL/6J マウス、雄、8-10週齢を用い、Isoflurane 全身麻酔下に70%部分肝 IRI モデル (虚血1時間、再灌流3時間) を作成した。

- ①高鉄含有食 (2% carbonyl iron) 2週間負荷
- ②鉄キレート剤 Deferoxamine (DFO) 5日間投与
- ③Ferrostatin-1 (Fer-1) 及び  $\alpha$ -Tocopherol ( $\alpha$ -Toc) 単回投与

の3つのグループで肝 IRI 手術を行い、肝障害 (血清 AST, ALT 及び組織障害スコア) と脂質過酸化 (4-HNE 染色、PTGS2 mRNA、組織中マロンジアルデヒド [MDA]) の評価、組織中のグルタチオン (GSH) 量について検討した。

**【結果】**高鉄含有食の負荷で肝組織中の鉄含有量は増加し、コントロール群と比較して肝 IRI の増悪が認められた。一方、DFO 投与によって肝組織中の鉄含有量は低下し、コントロール群と比較して肝 IRI は抑制された。さらに、Fer-1 及び、 $\alpha$ -Toc でも肝 IRI は抑制された。肝 IRI は Ferroptosis に特徴的な脂質過酸化マーカーである 4-HNE 染色陽性、PTGS2 mRNA の発現上昇、MDA 上昇を伴い、それらは Fer-1、 $\alpha$ -Toc、及び DFO で抑制された。肝 IRI は組織中の GSH の低下を伴い、Fer-1、 $\alpha$ -Toc、及び DFO の投与で GSH 低下は抑制された。

**【結語】**肝 IRI には、GSH 低下によって引き起こされる Ferroptosis が重要な役割を果たすことが動物モデルで示された。

P-22

放射線照射による DNA 損傷時の  
HHM の機能解析丹羽 佑輔<sup>1)</sup>、上村 顕也<sup>1)</sup>、小川 光平<sup>1)</sup>、高 昌良<sup>1)</sup>、  
酒井 規裕<sup>1)</sup>、名古屋 拓郎<sup>1)</sup>、坂牧 僚<sup>1)</sup>、横尾 健<sup>1)</sup>、  
高見 太郎<sup>2)</sup>、山本 直樹<sup>2)</sup>、坂井田 功<sup>2)</sup>、寺井 崇二<sup>1)</sup>

1)新潟大学大学院 医歯学総合研究科 消化器内科学分野

2)山口大学大学院 医学系研究科 消化器内科学

**【目的】**Murine maternal Id-like molecule (Maid) は転写調節に係る蛋白質として知られ、細胞周期調節や分化に関与する。Maid KO mice に放射線照射を行なうと脾臓リンパ球で ATM (Ataxia telangiectasia mutated) のリン酸化が低下することが知られている。これは Maid が ATM を活性化させることで DNA 修復に寄与している可能性を示唆している。本研究は DNA 損傷時の Human homologue of Maid (HHM) の機能の解明を目的とする。

**【方法】***In vitro* で HHM を過剰発現させた肝癌細胞株 (HLE, HepG2) についてマイクロアレイにより通常条件下および放射線照射後の遺伝子発現の解析を行った。また通常培養時と照射時の経時的な細胞増殖率の違いを MTT assay を用いて検討した。さらに Western Blotting を用いて DNA 損傷応答に関与する各経路の蛋白質発現の変化を照射後経時的に解析した。*In vivo* では WT (BALB/c) mice と Maid KO mice について通常条件下および放射線照射 (X 線 160kV 5.0mA 10分間 10Gy) 12時間後の蛋白質発現を、肝臓・脾臓・胸腺について免疫組織化学染色で、肝臓について Western Blotting で解析中である。

**【成績】**マイクロアレイでは HHM 強発現株で細胞周期を活性化させる遺伝子発現が上昇し、反対に抑制する遺伝子の発現が低下した。MTT assay では照射後に HHM 強発現株は有意に高い細胞増殖率を示した。Western Blotting では HHM 強発現株は照射後にリン酸化 ATM およびリン酸化 CHK2 の発現が高く、さらに CYCLIN D1 の発現も高い傾向であり、HHM が DNA 損傷を乗り越えて細胞周期を促進することを示唆した。*In vivo* では免疫組織化学染色において Maid KO mice では照射後の ATM-Chk2 pathway の活性化が抑制され、*In vitro* での結果を支持する結果が得られた。

**【結論】***In vitro* の結果からは HHM は放射線誘発 DNA 損傷時に ATM-CHK2 pathway を介する応答機構を促すことで細胞周期を促進する可能性が示唆された。*In vivo* でもこれを支持する結果が得られており、詳細な解析を行っている。

P-23

胆汁酸塩経口負荷ラットにおける  
薬剤性肝障害の評価

織田 進吾、楊 馥華、武内 太輝、横井 毅  
名古屋大学 大学院医学系研究科 トキシコゲノミクス

**【目的】** 薬剤性肝障害 (drug-induced liver injury) は医薬品の市場撤退、開発中止の原因となり得る重要な問題である。薬剤性肝障害の発症機序として、薬剤による胆汁酸トランスポーター bile salt export pump (BSEP) の阻害が提唱されているが、齧歯類において BSEP 阻害薬剤による肝障害を検出した報告は殆ど存在しない。本研究では、ラットへの胆汁酸塩の投与により薬剤性肝障害の感度を上昇させることが可能か検討した。

**【方法】** 5週齢の雌性 Sprague-Dawley ラットにケノデオキシコール酸ナトリウム (CDCA) 200mg/kg を3日間経口投与し、30分後にケトコナゾール (KTZ) またはミコナゾール (MCZ) 150mg/kg を3日間経口投与した。最終投与6時間後に剖検し、血漿および肝臓を採取した。肝臓より胆汁酸を抽出し、LC-MS/MS を用いて、種々の胆汁酸を定量測定した。同様の検討をボセンタン (BOS) 及びリトナビル (RTV) でも実施した。

**【結果】** CDCA のみを 100~400 mg/kg でラットに4日間経口投与したところ、200 mg/kg では肝障害を惹起しなかったため、以降の実験では 200 mg/kg に設定した。BSEP 阻害能を有し、かつ臨床肝障害陽性薬剤である KTZ を投与したところ、単独投与では肝障害を認めず、CDCA/KTZ 併用群で血漿 ALT・AST 上昇および肝細胞壊死が認められた。一方、BSEP 阻害と臨床肝障害の報告がない MCZ は、CDCA 併用の有無に関わらず、肝障害を惹起しなかった。肝臓中胆汁酸濃度を測定したところ、CDCA 等が CDCA 単独投与群と比べ CDCA/KTZ 併用群において高値を示した。CDCA 負荷モデルを他の臨床肝障害陽性薬剤で検討したところ、RTV 単独投与群と比べ CDCA/RTV 併用群で有意な ALT 値の上昇が認められたが、BOS は併用群においても肝障害を惹起しなかった。

**【結論】** 本手法は BSEP 阻害薬の肝毒性を in vivo で捉える有効な手段となることが期待される。一方、BOS による肝毒性が認められなかった理由として、BOS の BSEP 阻害能が KTZ や RTV と比較して弱いことが考えられた。

P-24

肝細胞死における  
cell-free DNA 生成のメカニズム

水田 龍信、渡邊 太樹、高田 周平  
東京理科大学生命医科学研究所

血液中には微量ながら分解を免れた DNA すなわち cell-free DNA (cfDNA) が存在し、疾患との関係が近年注目されている。特に腫瘍由来の循環血液中 DNA (ctDNA) は癌の診断や、予後判定などに有効な、いわゆるリキッドバイオプシーのターゲットとして関心を集めている。しかしながら、cfDNA の生成のメカニズムに関しては不明な点が多い。cfDNA は死細胞由来と考えられているが、それがアポトーシスなのかネクローシスなのか、またどのような DNA 切断酵素 (DNase) が関与しているのかに関しては、情報が乏しいのが現状である。in vivo の細胞死誘導モデルとして、アセトアミノフェンによる薬剤性肝障害モデルと抗 FAS 抗体による肝細胞死があり、前者がネクローシス、後者がアポトーシス誘導モデルとして有名である。また DNase $\gamma$  (別名 DNase1L3) はネクローシス、CAD はアポトーシスの際の DNA 切断酵素として知られている。そこで野生型ならびに CAD 遺伝子欠損 (KO) マウス、DNase $\gamma$  KO マウス、CAD+DNase $\gamma$  二重欠損 (DKO) マウスに細胞死を誘導し、cfDNA の産生を検討した。その結果、ネクローシスの場合は DNase $\gamma$  が、アポトーシスの場合は CAD と DNase $\gamma$  の両方が cfDNA の生成には必須であることが明らかになった。分解されずに血流中に漏出した死細胞由来の DNA はしばしば塞栓を作り、これを足場にしてがんの転移が起こるとされている。我々の実験結果は、血流中に存在する DNase $\gamma$  がこの DNA を分解し、塞栓、さらにはがんの転移を抑制することができることを示している。

P-25

質量分析による肝臓中の  
ジアシルグリセロール酸化機構の  
解明加藤 俊治<sup>1)2)</sup>、仲川 清隆<sup>2)</sup>、竹腰 進<sup>1)</sup>

1)東海大学 医学部基礎医学系 生体防御学分野

2)東北大学大学院 農学研究所 機能分子解析学

【背景】脂質は様々な要因により酸化反応が開始され、酸化一次生成物として脂質ヒドロペルオキシド(LOOH)を生じる。我々はこれまで、情報伝達・細胞応答を司る機能性脂質(ジアシルグリセロール; DAG)の酸化物(ジアシルグリセロールヒドロペルオキシド; DAGOOH)が、native DAGの約3倍のProtein kinase C(PKC)活性化作用を有することを明らかにしてきた。また、DAGOOHが線維症の病変部位に蓄積し、PKCを過剰亢進していることも確認しており、DAGの酸化が肝線維症の発症に関与していることを示唆してきた。DAGの酸化機構は、大きく分けてラジカル酸化、一重項酸素酸化、酵素酸化に大別される。これらの酸化機構は生体の様々な反応(炎症反応等)を反映したものであるため、DAGの酸化機構を特定できれば、病態発症メカニズムの解明に繋がると考えられた。

これまで我々は、LOOHの異性体構造が酸化機構の違いに依存することから、質量分析を用いた生体LOOHの分析法構築と生体脂質酸化機構の解明を進めてきた。本法はカチオン- $\pi$ 電子相互作用を原理とした方法であり、LOOH異性体を簡便・高選択的に見分けることが可能である。本研究では、本原理を応用してDAGOOH異性体の分析法を構築し、生体内のDAG酸化機構の解明を目指した。

【方法と結果】リノール酸ヒドロペルオキシド異性体とモノパルミチン酸からDAGOOH異性体を合成した。合成したDAGOOH異性体をMS/MS解析に供したところ、上述のカチオン- $\pi$ 電子相互作用に則り、高選択的なDAGOOH異性体分析が確認された。次に四塩化炭素投与ラットの肝臓DAGOOHを測定したところ、肝臓内には専らPKC活性型である1,2-DAGOOHが存在すること、また、四塩化炭素投与によってラジカル酸化のみならず一重項酸素酸化も亢進していることが明らかとなった。今後、病態組織のDAGOOHの生成メカニズムの変化を継時的に解析し、疾患発症・進展との関係性を詳細に明らかにしていく予定である。

P-26

B型肝炎ウイルス各種遺伝子型に  
おける in vitro での感染性についての  
検討藤野 初江<sup>1)</sup>、坂宮 順子<sup>1)</sup>、盛生 慶<sup>1)</sup>、大野 敦司<sup>1)</sup>、  
中原 隆志<sup>1)</sup>、村上 英介<sup>1)</sup>、山内 理海<sup>1)</sup>、河岡 友和<sup>1)</sup>、  
三木 大樹<sup>1)</sup>、柘植 雅貴<sup>1)</sup>、平松 憲<sup>1)</sup>、茶山 弘美<sup>2)</sup>、  
今村 道雄<sup>1)</sup>、相方 浩<sup>1)</sup>、茶山 一彰<sup>1)</sup>

1)広島大学 医学部 消化器・代謝内科

2)広島大学 医療人大学院教育・研究センター

【目的】B型肝炎ウイルス(HBV)の遺伝子型の違いにより臨床病態や治療効果が異なることが多く報告されているが、in vitroでの感染性の違いについては未だ明らかになっていない。そこでsodium taurocholate cotransporting polypeptide(NTCP)を強制発現した肝癌細胞株(HepG2-NTCP)、ヒト肝臓キメラマウス由来細胞(PXB細胞)を用いてHBV各種遺伝子型における感染性の違いについて検討した。

【方法】ヒト肝臓キメラマウスにHBV genotype A、Bj、C、D、F、Hの患者血清を接種し、感染成立後のマウス血清をHepG2-NTCP細胞、PXB細胞にそれぞれ感染させ細胞上清中のHBV-DNA量、HBsAg量、HBeAg量を比較した。HBV感染はいずれも200Geq/cellで行った。

## 【成績】

- ①HepG2-NTCP細胞での検討：各遺伝子型により感染初期から上清中のHBV-DNA量に差を認め、特にgenotype F、Hでは感染初期から上清中のHBV-DNA量は低値であった。これらの遺伝子型は経過中のHBsAgも他の遺伝子型に比較し低値であったが、HBeAgはgenotype Fでは経過中上昇がみられた。
- ②PXB細胞での検討：実験に用いたどの遺伝子型の血清もHBV-DNA量は経過中増加した。HBsAgはいずれの遺伝子型も経過中上昇したが、genotype Dの上昇率は低値だった。HBeAgはgenotype A、genotype Fのみ上昇した。

【結論】in vitroでのHBV genotype毎の感染性の違いについて検討し、各genotype、感染細胞により感染性に違いがみられた。今後はgenotype毎の感染性や抗ウイルス剤に対する治療効果の違いなどについて検討を行う予定である。

P-27

B型肝炎ウイルスの感染・増殖評価系へ向けたヒトiPS細胞由来肝組織モデルの構築と流体デバイスの開発

佐藤 敦紀<sup>1)</sup>、安 成皓<sup>1)</sup>、玉井 美保<sup>1)2)</sup>、藤山 陽一<sup>3)</sup>、中島 謙治<sup>4)</sup>、酒井 聡<sup>4)</sup>、鈴木 哲朗<sup>4)</sup>、田川 陽一<sup>1)</sup>

- 1)東京工業大学 生命理工学院 生命理工学系
- 2)北海道大学大学院歯学研究院 口腔医学部門口腔健康科学分野
- 3)株式会社島津製作所
- 4)浜松医科大学医学部医学科 ウイルス・寄生虫学講座

**【背景・目的】** B型肝炎ウイルス(HBV)はウイルス性肝炎を引き起こす代表的なウイルスの一つであり、世界的に多数の感染者がいるが、未だにHBVの完全排除によるB型肝炎の治療薬はなく、新薬の開発が切望されている。現在、薬剤スクリーニングにはヒト初代培養肝細胞や一部のヒト肝癌細胞株が用いられているが、初代培養肝細胞は高価であり、個体差が大きいため安定して解析を行うことが困難である。また細胞株では不十分な肝機能によりウイルスの複製や生体内での抗ウイルス応答等の現象を正確に反映できない。そこで、本研究ではヒト人工万能性幹(induced Pluripotent Stem:iPS)細胞由来肝組織モデルを作製し、新規HBV感染・増殖評価系の構築を目指した。さらに、継時的なサンプリングを可能にするために培養デバイスの開発をおこなった。

**【方法】** Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)ゲル上に形成した血管内皮細胞の管腔ネットワークに、星細胞株およびヒトiPS細胞から分化誘導した肝細胞系譜細胞を播種し、肝組織様構造を有する培養モデル(肝組織モデル)を作製し機能評価をおこなった。

**【結果・考察】** ヒトiPS細胞由来肝細胞系譜細胞を用いた肝組織モデルは、培養期間中に肝特異的遺伝子発現や尿素合成能などの肝特異的代謝機能が上昇することが確認された。さらに、HBVのレセプターとして知られているNTCP遺伝子において、肝細胞のみの分化誘導系と比較し高く発現することから、HBVの感染・増殖評価系の可能性が示唆された。また、流体デバイス内で肝組織を構築し、流速をかけた培養環境を実現した。肝臓の機能発現には肝細胞と肝非実質細胞の相互作用が重要である。本モデルでは肝組織構築により細胞極性が誘導され、HBV感染に必要なNTCPの発現が上昇した。今後、HBV感染実験をおこない、抗HBV薬剤のスクリーニングに向けた検討を試みていく。

P-28

非アルコール性脂肪性肝疾患の  
線維化進展における  
microRNA-200b の意義

中村 昌人、千葉 哲博、加藤 直也  
千葉大学大学院 医学研究院 消化器内科学

**【目的】** 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は、一部で肝硬変や肝臓に至ることが報告されている。肝線維化は NAFLD 患者の予後規定因子であり、肝線維化進展抑制が極めて重要と考えられる。しかし、NAFLD における肝線維化進展のメカニズムには不明な点が多く、治療法も確立していない。microRNA (miR) は複数の標的遺伝子を主に負に制御する 19-22塩基の小 RNA 分子であり、様々な病態形成に関与することが知られている。今回我々は、microRNA-200b に注目し、NAFLD マウスモデルおよびヒト肝生検サンプルを用いて、その意義を検討した。

**【方法】** メチオニンコリン欠乏食 (MCDD) 給餌による NAFLD マウスモデルを作成し、肝組織内 miR 発現プロファイルを検討した。その中で miR-200 family、特に miR-200b に着目した。miR-200b/c 阻害剤を用いた in vivo での検討および miR-200b 強制発現系を用いた in vitro での解析を行った。また、ヒト肝生検 FFPE サンプルから抽出した RNA を用いて定量 PCR を行い、miR-200 family の発現量と組織像との比較を行った。

**【結果】** MCDD マウスモデルにおいては、複数の miR の発現変化が観察され、中でも miR-200 family (miR-200a/b/c および miR-141) の発現が経時的に上昇していた。MCDD マウスに miR-200b/c 阻害剤を投与することで、血清 ALT 値の減少、肝内の炎症・線維化関連遺伝子の発現抑制が認められ、更に線維化面積の減少が確認された。また、miR-200b を過剰発現させたマウス肝細胞株 Hepa1-6 細胞では、過酸化水素水処理による細胞死の増加が認められた。ヒト肝生検サンプルの検討では、miR-200 family の発現が線維化進展と共に増加していた。

**【結論】** miR-200b は NAFLD 患者の線維化進行と共に発現が上昇しており、酸化ストレスへの感受性亢進による肝細胞死増加などを介して病態形成に寄与するものと考えられた。同時に miR-200b は NAFLD における肝線維化進展を抑制する上で、重要な標的分子となる可能性が示唆された。

P-29

加齢による脂質代謝応答性の変化と  
高脂肪食誘導脂肪肝炎の  
増悪メカニズム

石塚 敬、今 一義、内山 明、深田 浩大、福原 京子、  
山科 俊平、池嶋 健一

順天堂大学 医学部 消化器内科

**【目的】** 加齢は非アルコール性脂肪肝炎の独立した増悪因子だが、その機序は不明である。本研究では加齢マウスを用いて脂肪肝炎モデルを作成し、脂質代謝の評価およびリピドミクスによる脂質組成の解析を行った。

**【方法】** 8週齢(若年群)および55週齢(加齢群)の雄性 C57BL/6 マウスに、通常食もしくは高脂肪食 (HFD) を 8週間摂餌させた。肝臓における脂質代謝に関連する遺伝子の発現を RT-PCR で定量した。液体クロマトグラフィ質量分析計を用いて肝組織の脂質組成を解析した。

**【成績】** 若年 HFD 群の肝組織は軽微な脂肪変性に留まったのに対し、加齢 HFD 群では風船様変性を伴う著明な大滴性脂肪変性を認めた。SREBP1c mRNA の発現は加齢 HFD 群で若年 HFD 群よりも上昇したが、PPAR $\alpha$ 、CPT1A、ApoB、Mttp mRNA の発現は加齢 HFD 群において若年 HFD 群より有意な発現の鈍化ないしは低下を認めた。リピドミクス解析では加齢 HFD 群の肝組織中の中性脂質 (DAG、TAG) は若年 HFD 群よりも増加したのに対して、リン脂質 (ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン) は多価不飽和脂肪酸を含むリン脂質が加齢 HFD 群で若年 HFD 群よりも減少を認めた。肝組織内の脂質合成酵素 ELOVL6、SCD1 mRNA の発現が加齢 HFD 群で若年 HFD 群よりも有意に上昇し、一方で加齢 HFD 群では不飽和化酵素 FADS1 および FADS2 mRNA の発現が若年 HFD 群よりも有意に低下した。

**【結論】** HFD 負荷に対して、加齢群では若年群と比して肝臓内の脂質合成の亢進、脂肪酸 $\beta$ 酸化および肝外への脂質輸送の減少をきたし、肝内に過剰な脂質蓄積を来したと考えられた。さらに、脂肪酸合成・不飽和化経路の変化が肝内脂質の量的・質的变化に寄与した。加齢による脂質代謝応答性の変化が脂肪肝炎増悪に寄与した可能性が示された。

P-30

Gut-Liver axis に着目した  
NASH 病態解明に向けての  
基礎的検討中西 啓祐、下里 直隆、鍛冶 孝祐、北出 光輝、  
吉治 仁志

奈良県立医科大学 消化器・内分泌代謝内科講座

【目的】非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発症機序として multiple parallel hit theory が知られているが、近年 Gut-Liver axis (GLA) が注目されている。GLA に着目した2つの動物モデルを作成し、NASH 病態解明に向けて基礎的検討を行った。

## 1) 内因性エンドトキシン (Et) 増強モデル

【方法】6週齢、雄性 F344 ラットを S 群：通常食 + 通常飲料水群、D 群：CDAA 食 + 通常飲料水群、DF 群：CDAA 食 + 20%Fructose 群で10週間飼育後に犠死させ、各群の血清、肝線維化進展、腸管透過性、mRNA 発現を比較した。

【結果】DF 群で他群より有意に AST/ALT 比、T-Bil が上昇、Alb が低下した。組織学的には CDAA 投与群で線維化が出現したが、DF 群で D 群より有意に線維化が進展した。FITC-dextran を用いた検討では、DF 群で他群より有意に腸管透過性が亢進し、抗 ZO-1 抗体を用いた蛍光免疫染色でも DF 群で他群より有意な発現低下を認めた。mRNA 発現では DF 群で他群より有意に *Asma*、*Colla1*、*Tgfb* 発現が増加した。免疫染色では DF 群で他群より有意に TLR4、p-NF- $\kappa$ B、TNF $\alpha$  発現が増加した。

## 2) 外因性 Et 投与モデル

【方法】6週齢、雄性 C57BL/6 マウスを G1：通常食群、G2：CDAA 食群、G3：CDAA 食 + LPS i.p. 群 (2mg/kg、週3回) で16週間飼育後に犠死させ、各群の体重、血清、経口ブドウ糖負荷試験(OGTT)、肝線維化進展、mRNA 発現、肝内 LPS 関連蛋白発現量を比較した。

【結果】G2、G3でG1より有意に体重が増加し、LPS 投与は影響しなかった。血清学的には G3で ALT、T-Bil が他群より有意に上昇した。OGTT では G2、G3で G1 より有意に耐糖能が悪化し、LPS 投与は影響しなかった。組織学的には G3のみ有意な線維化進展を認めた。mRNA 発現では G3で他群より有意に *Asma*、*Colla1*、*Tgfb*、*Tnfa*、*Srebp1* 発現が増加した。また G3で有意に肝内 p-NF- $\kappa$ B 発現が増加した。

【結論】GLA に着目した2つのモデルに共通して、Et 流入による p-NF- $\kappa$ B シグナル亢進が肝線維化進展に重要であることが示唆された。

P-31

脂肪肝における易傷害性メカニズム  
解析の基礎的研究芳賀 早苗<sup>1)</sup>、浅野 真未<sup>1)</sup>、森田 直樹<sup>2)</sup>、尾崎 倫孝<sup>1)</sup>

1) 北海道大学大学院 保健科学研究院

2) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 生命工学領域  
生物プロセス研究部門

近年、メタボリック症候群の増加を背景に、脂肪肝・非アルコール性脂肪性肝炎(NASH: Non-alcoholic steatohepatitis)の増加が大きな社会問題となっている。NASH は進行性の病態で、脂肪肝の傷害と炎症が持続することで肝硬変へと進み、さらには肝癌にまで進行すると考えられている。

肝の脂肪化は軽度で回復可能な(単純性)脂肪肝から、その脂肪蓄積が慢性化すると大滴性(風船様)を呈し、重度の脂肪肝へと進行する。この時、肝細胞傷害、インスリン抵抗性、サイトカイン異常分泌、酸化ストレスなどの様々な因子が原因となり NASH を発症すると考えられる。しかしながら、このような慢性的脂肪蓄積に起因する因子の誘導メカニズムの多くは、詳細が解明されていない。今回、脂肪化の進行で引き起こされる肝細胞の易傷害性に着目し、その誘導機序について基礎的な検討を行った。

レプチン受体欠損(db/db)マウスは、レプチン受容体欠損による過食により糖尿病を発症し、肥満および比較的小滴性の肝脂肪化を引き起こす。このマウスに高脂肪食を継続摂食させると、肝の脂肪化が大滴性に変化し強い肝傷害を示すことが確認された。そこで、脂肪化合成の促進と脂肪酸取り込み促進の2つのタイプの肝細胞脂肪化モデルを作製し、細胞傷害性を検討した。両モデルでは確かに脂肪化が促進したが、中性脂肪の蓄積と脂肪滴の形態には明らかな差が認められ、特に脂肪酸を直接取り込んだ細胞では大滴性の重度脂肪肝に類似した特徴が確認できた。傷害性に関しては両者とも増悪しており、細胞生存能も低下した。特に細胞死に関してはネクロプトーシスが誘導されており、アポトーシスの誘導タイミングとの間に差があることが示唆された。

肝における早期~重度の脂肪化は、その質・量および蓄積形態に差を生じ、何らかの要因が脂肪肝での細胞死誘導に影響し(易傷害性を引き起こし)、進行性の肝病態の病因となっていることが考えられた。

P-32

## メダカ脂肪肝の非侵襲的評価法の検討

藤澤 浩一<sup>1)</sup>、高見 太郎<sup>1)2)</sup>、松本 俊彦<sup>2)3)</sup>、  
山本 直樹<sup>4)5)</sup>、坂井田 功<sup>1)2)4)</sup>

- 1) 山口大学大学院医学系研究科 肝臓再生基盤学
- 2) 山口大学研究推進機構 再生・細胞治療研究センター
- 3) 山口大学大学院医学系研究科 臨床検査・腫瘍学
- 4) 山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学
- 5) 山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学

脂肪肝はその患者数が増加し続けている最も頻度の高い肝疾患であり、詳細な解析のため有用な脂肪肝モデルが望まれており、魚類はその候補の一つと考えられる。非侵襲的に脂肪肝の進行を解析する方法として最も簡便である肝臓の直接観察を評価したところ、透明メダカを用いることにより肝脂肪沈着の変化を観察することができた。次に Ultrasound を用いて脂肪肝進行の評価を検討したところ、有意なエコー強度の増強が認められ、有用な検査法であることが示された。さらに高脂肪食投与メダカ肝臓の代謝産物のプロファイルについても評価を行った。次に実際の疾患モデルであるアルコール性脂肪肝において評価を行った。これまでにあまり報告のなかった成魚を用いてアルコール肝障害モデルを作製し、肝臓の評価を行った。エタノールを含む水中にメダカを2カ月間飼育することで、肝に脂肪沈着が認められた。また代謝変化の評価のため、肝臓のメタボローム解析を行ったところ、エタノール投与により、エタノール代謝産物の増加や脂質代謝の変化が認められた。さらに低侵襲な方法で評価するため Transparent メダカを使用することでアルコール性脂肪肝の経過を肉眼的に評価することができ、さらに ultrasound を用いて、肝脂肪化を定量化が可能であった。非侵襲的に、かつ繰り返しの評価が可能である本メダカモデルは、詳細な代謝産物の変化が同定された脂肪肝を起こす疾患の解析に有用なモデルであると考えられる。

P-33

## 2型糖尿病に対する Gpnmb の治療効果の検証

田中 大志

早稲田大学 先進理工学部 生命医科学専攻

2型糖尿病病態下の肝臓では糖代謝制御機構が破綻している。

これまでに我々は、2型糖尿病で発現が上昇する因子の探索から glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B (Gpnmb) を同定した。Gpnmb は様々な組織で発現しており、骨芽細胞や破骨細胞の分化の促進などの機能が報告されてきた。また、脂肪組織から分泌された Gpnmb が肝線維化や脂肪肝に抑制作用を示す可能性が報告されており、近年メタボリックシンドロームとの関連性も着目されている因子である。

これまでに我々は、Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法を用いて C57BL/6 マウスの肝臓に Gpnmb を強制発現し、肝臓における Gpnmb の糖代謝に対する機能を解析してきた。その結果、Gpnmb は FoxO1 の局在制御を介して肝臓の糖新生を抑制することが明らかとなった。しかし、2型糖尿病の肝臓における Gpnmb の糖代謝に対する影響は明らかとなっていない。

本研究では、病態改善を目的として、2型糖尿病モデルマウス (ob/ob マウス) の肝臓に Gpnmb を過剰発現した。また、Gpnmb を過剰発現する手段としてアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた。肝臓指向性を持つ AAV として AAV8 を選択し、肝臓特異的な Enhancer と Promoter の下流に Gpnmb を持つゲノムを構築した。この AAV を ob/ob マウスに感染させたところ、Gpnmb の肝臓特異的な過剰発現が確認された。そこで、Gpnmb の過剰発現が糖代謝に与える影響を検証するため、経口糖負荷試験、ピルビン酸負荷試験、インスリン負荷試験を行った。Gpnmb 過剰発現群では、空腹時血糖の低下と糖及びピルビン酸負荷後の血糖値上昇の抑制が確認された。一方、インスリン負荷後の血糖値に変化は見られなかった。以上の結果から、2型糖尿病の肝臓で Gpnmb を過剰発現すると糖新生の抑制を介して耐糖能を改善することが示された。

P-34

エゼチミブによる  
NASH 肝発癌抑制効果

前田 浩史、三浦 光一、森本 直樹、渡邊 俊司、  
高岡 良成、野本 弘章、津久井 舞未子、五家 里栄、  
磯田 憲夫、山本 徳博  
自治医科大学 消化器内科

**【目的】** 近年、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)からの肝発癌が増加している。高コレステロール血症はNASHに高頻度に合併するが、NASH 肝臓に与える影響は不明である。そこで我々はNASH 肝臓マウスモデルを用いて、高コレステロール血症およびエゼチミブ投与におけるNASH 発癌について検討した。

**【方法】** 肝細胞特異的 PTEN KO マウス (PTEN KO) に高脂肪食 (40週) を投与し、高コレステロール血症を誘導した。また同時にコレステロール吸収阻害剤エゼチミブを投与した。

**【結果】** 8週齢の雄性 PTEN KO マウスに高脂肪食を投与すると16週齢で高コレステロール血症が出現し、48週齢まで継続して認められた。通常食群と比較し、背景肝でも炎症や線維化の悪化し、48週齢での肝腫瘍は、数、大きさともに増加した。また組織学的に肝臓の割合が増加した。エゼチミブ投与群では通常食でも高脂肪食群でも血清コレステロール値は低下した。高脂肪食群ではエゼチミブ投与により背景肝の炎症や線維化が軽減し肝腫瘍が抑制されたが、通常食群ではそれらの改善は認めなかった。コレステロールの腫瘍促進効果メカニズム解明のため、血管内皮増殖因子(VEGF)を検討した。PTEN KO マウスに高脂肪食を投与すると血清 VEGF は増加し、前癌病変内の血管内皮細胞数が増加した。エゼチミブ投与により VEGF は低下し、血管内皮細胞数は減少した。肝内での VEGF 産生細胞を蛍光二重染色で検討したところ、主たる産生細胞は Kupffer 細胞であった。クロドロネートによる Kupffer cell depletion により血清 VEGF は低下した。

**【結論】** 高コレステロール血症はマウス NASH 肝臓を促進する。エゼチミブによる高コレステロール血症の正はマウスモデルでの NASH 肝臓を抑制する。

P-35

ポリオルニチンをベースとした  
ナノ粒子による  
高アンモニア血症治療

Yaroslav Lee<sup>1)</sup>、井林 洋太<sup>1)</sup>、Binh Long Vong<sup>1)</sup>、  
長崎 幸夫<sup>1)2)</sup>

1)筑波大学大学院 数理物質科学研究科 物性・分子工学専攻

2)筑波大学大学院 人間総合科学研究科 フロンティア医科学専攻

重度な肝障害によって血中アンモニア濃度が上昇する高アンモニア血症では、代謝が間に合わなくなったアンモニアが血流に乗って筋肉や腎臓、脳等に運ばれ、エネルギー産生や神経伝達を阻害する。その結果、意識障害や運動障害が引き起こされ、最終的には昏睡状態に陥ることもある。アンモニア代謝回路には主に尿素回路とグルタミン合成の2種類が存在するが、両方にオルニチンが関与するため、治療目的での投与が検討されてきた。しかし、オルニチンは低分子であるため代謝が速く、大量・頻回投与を要することで患者への負担が大きくなるなどの問題を抱えている。本研究では、オルニチンのバイオアベイラビリティを向上させる目的で、ポリカチオンであるポリエチレングリコール-ポリオルニチン共重合体とポリアニオンであるコンドロイチン硫酸のポリイオンコンプレックス組織体を設計した。粒径約40nmのこのポリオルニチン組織体は、生体内の幅広いpHや塩濃度の環境に耐えられ、高い生体適合性と優れた安定性を併せ持つ。そこで、この新規材料の高アンモニア血症に対する治療効果を検証するために、アセトアミノフェン過剰投与で誘導した急性肝障害マウスのモデルを利用し、ポリオルニチン組織体と低分子オルニチンの治療効果を比較した。通常ならばアセトアミノフェン投与後24時間以内に血中アンモニア濃度及び肝障害マーカー(AST・ALT)が数倍から数十倍の上昇を見せるが、この組織体をモデルマウスに皮下投与したところ、健康なマウスとほぼ変わらないほど血中アンモニア濃度の上昇を著しく抑えられ、AST・ALTの上昇も有意に抑制することができた(P<0.01)。一方、低分子オルニチンにおいては、肝臓への集積率が組織体よりも悪く、素早く体外に排出されるため、治療効果は確認できなかった。このようにポリオルニチンをベースとしたナノ組織体が高アンモニア血症治療に有望である。

P-36

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドによる穿孔性腹膜炎における病態の制御

河野 寛、市川 大輔

山梨大学 第一外科

【目的】下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド(PACAP)は、エンドトキシンによる活性化マクロファージの炎症性サイトカイン生産を抑制し、抗炎症性サイトカインIL-10産生を亢進する。そこで、今回、PACAPの細菌性腹膜炎におけるマクロファージ活性化抑制を介したARDS改善効果を検討した。

【方法】盲腸結紮穿孔刺(CLP)モデルを作製し、PACAPをCLP作成1時間前、直後、1時間後に投与(i.v.)し、ARDS発症と致死率を検討した。また、血清IL-10と致死性サイトカインHMGB1値を測定した。さらに、肺、肝臓で炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ ならびにIL-6、抗炎症性サイトカインのIL-10の発現、ケモカイン発現を検討した。PACAP存在下での臓器マクロファージのサイトカイン産生を検討した。マクロファージ(Mf)と好中球(Nu)の肺と肝臓での分布を検討した。CLP後における血中Corticosterone(Cor)とACTH値を測定した。

【結果】PACAP投与各群において、非投与群と比較しARDSと致死率が有意に改善した。CLP後においても投与効果を認めた。血清HMGB1は低下し、IL-10は有意に高値となった。肝臓におけるTNF- $\alpha$ 発現は低下し、IL-10発現は増加した。肺ではIL-6発現が低下した。肺でのケモカイン発現が低下した。PACAP存在下での肺胞マクロファージのIL-6産生は抑制され、肝マクロファージのIL-10産生は増加した。PACAP投与群(CLP直後投与)で肺間質に存在するMf数が増加しNu数は有意に低下した。CorとACTHはPACAP投与群において優位に高値であった。

【考察】PACAPは細菌性腹膜炎発症後のARDSと致死率を著明に改善した。直接的な機序として、肝と肺マクロファージ由来の炎症性サイトカイン発現抑制と肝マクロファージ由来のIL-10の発現増加、また、間接的な機序としてACTHとCorの増加が考えられた。

ポスター発表

P-37

酸化型 DAG による  
肝星細胞活性化機構の解析北谷 佳那恵<sup>1)</sup>、竹腰 進<sup>2)</sup>

1) 東海大学伊勢原研究推進部 生命科学統合支援センター

2) 東海大学医学部 基礎医学系生体防御学

**【背景】** 肝臓の線維化は慢性的な肝細胞傷害によって引き起こされ、傷害部へI型コラーゲン等の細胞外マトリックスが蓄積することで病態が進行する。肝線維化において主にコラーゲンを産生するのは活性化した肝星細胞(Hepatic stellate cell: HSC)であることが知られている。一方、HSCの活性化およびコラーゲン発現にはprotein kinase C (PKC)が関与していることが報告されているが、その分子機構は不明である。我々はPKCの活性化物質であるジアシルグリセロール(DAG)が酸化され酸化型 DAG となることで強力なPKC活性化能を有する物質に変質することを報告した。さらに四塩化炭素の反復投与により線維化を呈したマウス肝組織において酸化型 DAG が著明に増加すること、また、PKCの過剰活性化を介して肝線維化が増悪することを明らかにした。本研究ではマウス初代培養 HSC を用い、酸化型 DAG の直接的な HSC 活性化作用について PKC シグナルを中心に解析を行った。

**【材料・方法】** HSC は雄性 C57BL/6J マウスの腹部大静脈からプロナーゼ溶液とコラーゲナーゼ溶液を灌流し、肝臓を消化後、10% Iodixanol を用いた密度勾配遠心法にて単離した。単離した HSC に酸化型 DAG と PKC の阻害剤を作用させた後、I 型コラーゲンと HSC の活性化マーカーである  $\alpha$ Smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) の発現を定量的リアルタイム RT-PCR にて測定した。

**【結果・考察】** 酸化型 DAG を添加した HSC で I 型コラーゲンと  $\alpha$ SMA の発現が顕著に上昇することが明らかになった。さらに PKC 阻害剤の添加によって I 型コラーゲンと  $\alpha$ SMA の発現が有意に抑制された。本研究の結果から、酸化ストレスによって生じた酸化型 DAG が直接 HSC に作用し、線維化の増悪に関わっていることが強く示唆された。

P-38

老化肝星細胞における  
TGF $\beta$ シグナル変化の分子機序解析松原 勤<sup>1)</sup>、高田 さゆり<sup>1)2)</sup>、松原 三佐子<sup>2)3)</sup>、  
大黒 敦子<sup>2)</sup>、小田桐 直志<sup>2)</sup>、宇留島 隼人<sup>1)</sup>、  
吉里 勝利<sup>3)</sup>、河田 則文<sup>2)</sup>、池田 一雄<sup>1)</sup>

1) 大阪市立大学 大学院医学研究科 機能細胞形態学

2) 大阪市立大学 大学院医学研究科 肝胆膵病態内科学

3) 大阪市立大学 大学院医学研究科 合成生物学寄附講座

**【目的】** 持続的活性化から細胞老化へと続く肝星細胞の形質転換は肝硬変病態で認められているが、老化肝星細胞の性質や疾患との関連性は不明な点が多い。本研究は、肝線維化の主要な因子である TGF $\beta$  と老化肝星細胞の関係性について明確にすることを目的とした。

**【方法および結果】** ヒト初代培養肝星細胞株 HHStC 細胞を継代培養によって老化肝星細胞(SC)を構築した。この SC と通常 HHStC 細胞(NC)に TGF $\beta$  を添加したところ、NC で観察される  $\alpha$ SMA 発現上昇や CYGB 発現低下が、SC では著明に減弱していた。また、TGF $\beta$  が標的とする microRNA、miR-143 および miR-145 発現の誘導も減弱していた。SC は、TGF $\beta$  添加後の核内リン酸化 SMAD2/3 タンパク質量が低下しているが TGF $\beta$ RII タンパク質量や細胞全体のリン酸化 SMAD2/3 タンパク質量の低下が認められないことから核内移行に問題があると考え、SC で SMAD4 発現変化を解析したところ、SMAD4 mRNA 量の低下が認められない一方で、SMAD4 タンパク質量の低下が観察された。そこで、miRBase で SMAD4 mRNA を標的とする推定された 14 種の microRNA のうち、miR-34a、miR-34b、miR-146a および miR-219b 発現量の上昇が SC で認められた。それらのうち、NC に miR-34a mimic を導入したところ SMAD4 タンパク質量の低下が観察された。加えて、老化肝星細胞関連因子である ERK1/2 シグナルとの関係性を調べたところ、miR-34a 発現量は、ERK1/2 シグナル亢進で上昇し、ERK1/2 シグナル阻害で低下した。

**【結語・考察】** 本研究は、ERK1/2-miR-34a カスケードが TGF $\beta$ -SMAD2/3 シグナルの減弱に寄与することを明らかにした。また、SMAD4 と発がんの関係性が報告されているので、肝発がんを理解するための端緒となる可能性がある。

P-39

ヘキサクロロフェン誘導体  
HC-1による肝線維化抑制

板場 則子、吉田 久輝、汐田 剛史  
鳥取大学大学院 医学系研究科 遺伝子医療学部門

**【目的】**肝線維化は肝星細胞での TGF- $\beta$ /Smad3 経路の亢進を介した肝星細胞活性化により進展する。近年、TGF- $\beta$  経路と Wnt/ $\beta$ -catenin 経路とのクロストークが報告され、肝線維化の新たな治療標的として Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が注目されている。今回、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路阻害剤ヘキサクロロフェンを元に独自に開発した誘導体 HC-1 の抗線維化作用を、*in vitro*、*in vivo* で検討した。

**【方法】**ヒト肝星細胞株 LX-2 での HC-1 の使用濃度を WST アッセイにより検討した。低毒性濃度域での HC-1 の Wnt/ $\beta$ -catenin 経路阻害作用をレポーターアッセイにより解析した。HC-1 の肝星細胞活性化抑制効果は、2.5 ng/ml TGF- $\beta$  により活性化を惹起した LX-2 細胞で、 $\alpha$ SMA、COL1A1 の発現を指標に評価した。さらに、四塩化炭素誘発性の慢性肝障害モデルマウスに対し HC-1 を週3回、8.7、17.4 mg/kg で腹腔内投与し、肝線維化抑制効果を組織学的解析等により評価した。

**【成績】**低毒性域となる 12、16、20  $\mu$ M の HC-1 添加条件下で、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性は有意に低下した。同濃度条件下での  $\alpha$ SMA、COL1A1 の発現は薬剤添加 24、48 時間後に其々有意に低下した。*in vivo* において、HC-1 投与群の肝ヒドロキシプロリン量は、何れの投与群も vehicle 群と比較し有意に低値を示し、アザン染色、シリウスレッド染色も同様の傾向であった。ウェスタンブロッティングも同様に、HC-1 投与群での  $\alpha$ SMA、コラーゲンの著明な発現低下を認めた。

**【考察】**新規薬剤 HC-1 は肝星細胞活性化抑制効果、肝線維化抑制作用を *in vitro*、*in vivo* で示した。

**【結語】**HC-1 は肝線維症に対する新たな治療薬剤として有用と考える。

P-40

Redox nano-carrier improves  
bioavailability and therapeutic  
efficacy of hydrophobic drugs in  
liver fibrosis model mice

Binh Long Vong<sup>1)2)</sup>、Thi Hao Tran<sup>1)2)</sup>、  
Yuji Nishikawa<sup>2)3)</sup>、Yukio Nagasaki<sup>1)2)4)</sup>

- 1) Department of Materials Science, Graduate school of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba
- 2) Department of Biomedical Engineering, International University, Vietnam National University Ho Chi Minh city
- 3) Division of Tumor Pathology, Department of Pathology, Asahikawa Medical University
- 4) Graduate school of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba

Overproduction of reactive oxygen species (ROS) and activation of hepatic stellate cells have been reported as key pathogenesis of increasing in extracellular matrix in liver fibrosis. Several antioxidant and antifibrotic agents exhibit potential treatment although their therapeutic efficacy is limited due to low water solubility and bioavailability. In this study, we have developed a silica-containing redox nanoparticle (siRNP) as ROS-scavenging nano-carriers for hydrophobic agents such as sorafenib (tyrosin kinase inhibitor), silymarin (antioxidant) and pioglitazone (PPAR agonist) and investigated their therapeutic treatment in CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis mice. By encapsulating into the core of siRNP, the solubility of hydrophobic drugs was dramatically improved, and its bioavailability in blood and liver were also improved after oral administration to mice. Our results showed that oral administration of drug-loaded siRNP inhibited higher therapeutic efficacy to suppress inflammation and fibrosis in CCl<sub>4</sub>-treated mice as compared to free drugs and drug-loaded control nanoparticle (without ROS scavenging character). In summary, siRNP is a promising oral drug nano-carrier for treatment of liver chronic injury.

P-41

### 培養自己骨髄間葉系幹細胞投与療法 に対する microRNA を用いた 補助療法の開発

原 和牙<sup>1)2)</sup>、松本 俊彦<sup>3)4)</sup>、藤澤 浩一<sup>5)</sup>、  
高見 太郎<sup>4)5)</sup>、坂井田 功<sup>1)4)5)</sup>

- 1) 山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学
- 2) 山口大学大学院医学系研究科 保健学 生体情報検査領域
- 3) 山口大学大学院医学系研究科 臨床検査・腫瘍学
- 4) 山口大学研究推進機構 再生・細胞治療研究センター
- 5) 山口大学大学院医学系研究科 肝臓再生基盤学

**【目的】**我々は非代償性肝硬変症に対する「培養ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた低侵襲肝臓再生療法」を開発し、臨床研究において安全性および有効性を報告してきた。この肝臓再生療法では、肝線維化の改善(あるいは抑制)が治療効果に寄与する重要な作用である。骨髄間葉系幹細胞が細胞間相互作用により作用するのに対し、肝星細胞の線維産生を抑制する補助療法を追加することで治療効果が高まると考えた。そこで、複数の collagen を標的とする microRNA (miR)-A を見出し、miR-A の肝星細胞に対する作用について検討した。

**【方法】**miR-A をヒト肝星細胞 (HHStC) に導入し、遺伝子発現について microarray による網羅的解析を行った。さらに、miR-A 導入による増殖能と collagen 発現の変化について MTS assay、real-time PCR、Western blotting で検討した。また、ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) と HHStC を非接着共培養し、培養上清中のⅢ型プロコラーゲン N 末端ペプチド (P-Ⅲ-P) 濃度を ELISA 法で測定し、HHStC の線維産生を評価した。さらに、共培養条件下で hMSC と HHStC の miR-A 発現について real-time PCR で検討した。

**【結果】**microarray 解析より、miR-A 導入 HHStC で Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col5a1, Col5a2 等の線維化関連遺伝子の発現低下、HGF および MMP1 の発現増加を認めた。また、細胞増殖の有意な低下、Collagen I, III, V 発現の減少を確認し、線維化抑制効果が示唆された。hMSC と HHStC の非接着共培養により培養上清中 P-Ⅲ-P 濃度は有意に低下したが、hMSC 及び HHStC の miR-A 発現は低く、共培養により HHStC の miR-A 発現は変化しなかった。

**【結論】**miR-A は骨髄間葉系幹細胞とは異なる機序で肝星細胞の増殖と線維産生を抑制し、培養自己骨髄間葉系幹細胞投与療法の補助療法となる可能性がある。

P-42

### 癌抑制遺伝子 p53 の過剰な活性化に よる肝前駆細胞の誘導と肝発癌

牧野 祐紀、疋田 隼人、小玉 尚宏、齋藤 義修、  
中堀 輔、阪森 亮太郎、巽 智秀、竹原 徹郎

大阪大学大学院 医学系研究科 消化器内科学

**【背景】**p53 は慢性肝疾患患者の背景肝において恒常的に活性化していることが知られているが、その意義は十分に解明されていない。本検討では p53 の活性化が肝発癌に及ぼす影響について検討した。

**【方法】**肝発癌モデルとして Kras 変異モデル (Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Alb-Cre : Kras<sup>G12D</sup> マウス) を用いた。同モデルの肝細胞において、p53 を分解を促す Mdm2 を欠損させて p53 を活性化し (Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Mdm2<sup>fl/fl</sup> Alb-Cre)、さらに Mdm2 と p53 の両者を欠損させた (Kras<sup>LSL-G12D/+</sup> Mdm2<sup>fl/fl</sup> p53<sup>fl/fl</sup> Alb-Cre)。臨床検体は持続肝障害患者 194 例 (ウイルス性慢性肝炎 159 例を含む) の肝生検検体を用いた。

**【結果】**Mdm2 欠損 Kras<sup>G12D</sup> マウスは背景肝で p53 の活性化を認め、4 か月齢において高い発癌率を示した (Mdm2 野生型 18.2% (2/11) vs Mdm2 欠損型 100% (10/10))。同マウスは肝細胞のアポトーシス亢進、細胞老化・SASP による炎症性サイトカイン (tnf, ccl2, il-1b) 産生を認め、肝障害を来した。また同マウスの肝臓では肝前駆細胞マーカー (ck7, ck19, epcam, cd90, cd133, dlk-1, afp) の発現が上昇し、前駆細胞マーカー陽性細胞から連続して腫瘍が形成された。Mdm2 欠損 Kras<sup>G12D</sup> マウスの肝臓より作成した前駆細胞由来オルガノイドは allograft モデルにおいて腫瘍形成能を示した。

Mdm2 欠損 Kras<sup>G12D</sup> マウスにおいてさらに p53 を欠損させると、肝細胞アポトーシス・SASP は軽減し、ALT 値の低下とともに前駆細胞マーカー陽性細胞は消失して発癌率も低下した (p53 野生型 100% (14/14) vs p53 欠損型 54.5% (6/11))。

臨床検体において p53 下流遺伝子である p21 の発現はアポトーシス関連分子 (p16, bax)、炎症性サイトカイン (tnf, ccl2, il-1b)、前駆細胞マーカー (ck7, epcam, cd90, cd133, afp) の発現と正に相関した。

**【結語】**肝細胞における p53 の恒常的活性化は肝前駆細胞を誘導して肝発癌を促進した。p53 の活性制御が慢性肝疾患における新たな発癌予防戦略となり得る可能性が示唆された。

P-43

肝がん幹細胞マーカー MYCN の  
発現上流制御因子の探索

秦 咸陽、小嶋 聡一  
理研肝がん予防研究ユニット

肝細胞の壊死と病理的な再生が繰り返される結果、がん遺伝子の持続活性化が誘導され、肝がんの発症につながる。我々のこれまでの研究では、がん遺伝子 MYCN は、肝がん組織に高発現しており、MYCN 陽性 EpCAM 陽性肝がん幹細胞 (CSC) 集団の存在が観察されている。今回我々は、がん遺伝子活性化の分子制御機構の解明を目的とし、肝 CSC において高発現した MYCN の発現上流制御因子の探索を試みた。CCLE データベースを用いた25種類の肝がん細胞の遺伝子発現プロファイルのクラスター解析では、MYCN 高発現細胞群は CSC マーカー AFP、EpCAM、DLK1、NANOG と脂肪酸代謝酵素 FASN、SCD1、FADS との相関、MYCN 低発現細胞群は CSC マーカー CD90 と解糖系酵素 PKM2、LDHA との関連が見られた。MYCN 高発現 JHH7細胞は上皮細胞様形態を呈するのに対し、MYCN 低発現 HLF 細胞は線維芽細胞様形態を示した。3次元培養では、HLF 細胞スフェロイドはあまり増殖しないのに対し、JHH7細胞スフェロイドは活発な増殖が見られ、その増殖は脂肪酸不飽和化酵素 SCD1 の特異的阻害剤 CAY10566 により抑制された。不飽和脂肪酸のバルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸を添加すると CAY10566 による細胞スフェロイド増殖抑制がブロックされた。同様な効果は飽和脂肪酸のステアリン酸処理では見られなかった。FACS を用いて CD90 陽性と陰性の HLF 細胞と EpCAM 陽性と陰性の JHH7 細胞を分離し、その遺伝子発現を検討した。それぞれの陰性細胞と比較したところ、EpCAM 陽性 JHH7 細胞では高 MYCN 発現が見られ、CD90 陽性 HLF 細胞の MYCN 発現は特に変化がなかった。siRNA を用いて JHH7 細胞の SCD1 の機能を欠損させると、MYCN の発現が有意に抑制された。さらに高脂肪飼料を飼育したマウスの肝組織中の Mycn 発現が増加する傾向が見られた。以上の結果から、肝発がんにおいて不飽和脂肪酸の代謝リプログラミングは重要な機能を発揮し、MYCN 高発現を引き起こす上流制御因子となることが示唆された。

P-44

肝癌細胞におけるヘッジホッグ経路  
阻害剤 GANT-61 の抗腫瘍効果

神吉 けい太、原田 健資  
岡山理科大学 工学部 生命医療工学科

**【背景・目的】**ヘッジホッグ経路は初期発生における形態形成に深くかかわる細胞内シグナル経路であるが、癌においてはその異常亢進が転移や再発などの悪性化に関わっていることが知られている。ヘッジホッグ経路の阻害剤による遮断は癌の悪性化進行を抑制する有効な手段と考えられており、これまで乳癌、肺癌、前立腺癌などにおいてその進行を抑制する効果が認められているが、肝細胞癌に対する報告は少ない。そこで代表的なヘッジホッグ経路阻害剤である GANT-61 を用いて、肝癌細胞の生存、増殖、運動性、分化度に与える影響を調べた。**【方法】**未分化型肝癌細胞 (HLE, HLF) を用い、0~10  $\mu$ M の GANT-61 で処理し細胞増殖試験を行った。各種濃度の抗癌剤 (Mitomycin C, sorafenib, 5-FU) と 10  $\mu$ M GANT-61 を併用し細胞生存試験を行い、抗癌剤感受性に与える影響を調べた。低接着プレートを用いたスフェアアッセイを行い、足場非依存性の細胞生存・増殖について検討した。スクラッチアッセイにより細胞運動性について検討した。上皮系マーカー (E-cadherin)、間葉系マーカー (vimentin)、および TCA サイクル代謝酵素である IDH の発現を定量的 PCR とウェスタンブロットで検討した。**【結果】**GANT-61 は HLE, HLF に対し濃度依存的に増殖抑制効果を示した。10  $\mu$ M GANT-61 と各種濃度の抗癌剤併用では抗癌剤感受性に変化は見られなかった。スフェアアッセイでは GANT-61 処理により有意なスフェア形成抑制が認められた。さらにスクラッチアッセイでは GANT-61 処理により細胞運動性の低下が認められた。GANT-61 処理による E-cadherin の発現上昇、vimentin の発現減少、IDH1 の発現上昇が認められた。**【結語】**ヘッジホッグシグナル経路の阻害により、未分化型肝癌細胞の細胞増殖、スフェア形成能、細胞運動能に対する有意な抑制効果が認められ、肝細胞癌の悪性化進行を抑制する有効な手段となる可能性が示された。

P-45

肝癌分子標的治療薬の  
治療効果予測と耐性獲得機序の解析

長岡 克弥<sup>1)</sup>、檜原 哲史<sup>1)</sup>、渡邊 丈久<sup>1)</sup>、田中 基彦<sup>1)</sup>、  
佐々木 裕<sup>1)2)</sup>

1) 熊本大学大学院生命科学研究部 消化器内科学

2) 市立貝塚病院

**【目的】** ソラフェニブ(SFN)は進行肝細胞癌に対する標準的治療である。しかし、SFNの治療効果を予想しうるバイオマーカーは確立されていない。今回、治療効果予測のための血清バイオマーカーの探索を行い、肝癌細胞におけるSFN耐性獲得機序を検討した。

**【方法と結果】** 当科においてSFNを投与開始した進行肝細胞癌患者(106例)を対象とした。患者背景の違いが解析結果に及ぼす影響を減らすために、患者毎に治療前、開始1ヶ月後の血清中タンパク質濃度の変化率に着目した。治療効果は投与開始3ヶ月後に判定し、Responder群(R群)、Non responder群(NR群)に分類した。次に各群5例の血清にて、抗体アレイによるproteome解析を行い、20個の候補タンパク質を同定した。さらに各群18例ずつを対象にELISAを用いてタンパク質量の変化を検証し、最終的にClusterin (CLU)、VCAM1、CRELD2の3種類に絞り込んだ。引き続き、臨床検査値、患者背景因子を加えて多変量解析を行ったところ、CLU、VCAM1、AFPがNRの寄与因子として抽出された。

CLUは抗アポトーシス作用のあるシャペロン蛋白の1つである。CLU単独の影響に注目すると、治療開始後にNR群ではCLU血中濃度が増加しR群では減少する傾向があった。CLU増加群は減少群より有意に無増悪生存率(PFS)が短かった(ハザード比(HR)=2.97, P=0.002)。以上より、血清中のCLU濃度の変化は、SFNの治療効果を早期予測に有用な可能性が示唆された。in vitroにおいて複数の肝癌細胞株にてCLUの発現を抑制すると、SFNによる感受性が増強され有意に増殖が抑制された。また、SFN長期曝露によって樹立したSFN耐性HepG2において、顕著なCLUの発現亢進を確認した。SFN耐性株のトランスクリプトーム解析から、SFN耐性化に影響を及ぼし得るいくつかの候補分子を同定した。

**【結語】** 血清中のCLU濃度の変化は、SFNの治療効果を早期に予測できる可能性があり、肝癌細胞においてもSFN耐性化との関連が示唆された。