

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590366

研究課題名（和文） 細胞老化に着目した肝臓病の新たな解析

研究課題名（英文） Novel approach to liver disease from aspect of cellular senescence

研究代表者

佐々木 素子（SASAKI MOTOKO）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70225895

研究成果の概要（和文）：

本研究では、原発性胆汁性肝硬変(PBC)などの肝臓病の病態形成に細胞老化が積極的に関与することを明らかとなった。特に PBC の胆管病変における老化胆管細胞は CCL2, CX3CL1 発現の亢進を示し、炎症細胞浸潤と相関していた。また、培養老化胆管細胞は、ケモカイン発現亢進を介して単球や肝星細胞の遊走を促進した。老化胆管細胞が周囲微小環境調節を行い、炎症の持続、悪化に関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed that cellular senescence is involved in the pathogenesis of liver diseases such as primary biliary cirrhosis (PBC). Senescent biliary epithelial cells in inflamed and damaged small bile ducts in PBC show increased expression of chemokines such as CCR2 and CX3CL1. Cultured senescent biliary epithelial cells showed increased expression of various chemokines and induced migration of monocytes and hepatic stellate cells in co-culture. These findings suggests that senescent biliary epithelial cells may play a role in augmentation of inflammation around bile ducts by regulating microenvironment in PBC.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2010 年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：病理学, 生体分子, 再生医学, 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

近年，“細胞の不可逆的な増殖停止状態”と定義される細胞老化 cellular senescence は加齢 Aging と発癌 Carcinogenesis のバランスをとる機構として注目されるようになった。さらに非腫瘍性疾患においても， 老化細胞は，炎症性サイトカインやケモカインなどの液性因子の分泌を介して細胞周囲微小環境の調節を行い，癌以外の疾患の発生，進展においても重要な役割を持つことが明らかにされつつある。

私どもは，原発性胆汁性肝硬変(PBC)の病態形成に細胞老化が関与することを世界で初めて明らかにした。また，肝細胞癌や胆道癌の前癌病変には細胞老化が見られ，その多段階発癌機構に Oncogene-induced senescence が関与する可能性があることを明らかにしてきた。これらの世界に先駆けた研究成果は，肝臓病において肝構成細胞の細胞老化が病態形成に重要な役割を持つ可能性を示唆している。今までに細胞老化という概念から肝臓病を包括的に検討する試みは国内外においてほとんどない。

そこで私どもは，『肝臓病では肝構成細胞（肝細胞，胆管細胞，肝ステム細胞，間質細胞など）の細胞老化が，炎症の持続や線維化の進展などの病態形成と肝発癌に関与する』，との仮説をたてて研究をさらに発展させることを計画した。

2. 研究の目的

本研究では，肝臓病の進展と肝発癌における細胞老化の役割を明らかにして，細胞老化の制御による肝臓病の新たな治療法の開発をめざした。具体的には，以下の検討を行った。①PBC，ウイルス性肝炎などの慢性肝疾患における肝構成細胞の細胞老化の発生状況を検討する。②老化細胞による微小環境調節とその分子機構を解析する。具体的に老化細胞の分泌する重要液性因子を見出す。③老化細胞の運命決定機構を解明する。④慢性肝障害モデル動物，肝発癌モデル動物を用いて肝臓病の進展と肝発癌における老化細胞の役割を明らかにする。さらに，老化関連

重要分子を標的にした肝微小環境の調整を試み，新しい治療法の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) 肝臓病の肝組織における細胞老化の発生状況の解析：人体材料を用いた組織化学 (Dimri 法) と免疫組織化学的手法で，細胞老化の指標である SA- β -Gal, p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1} 発現細胞を検出する。老化細胞の分布と種類，炎症や線維化などの病変，肝発癌や性差との関連を臨床病理学的に検討する。

(2) 老化細胞による肝微小環境調節の分子機構の解析

①老化肝構成細胞の産生する微小環境調節候補分子の検索：当教室で株化したヒト，ラット，マウス培養胆管細胞，肝細胞などの肝構成細胞に細胞老化を誘導して mRNA を抽出，遺伝子発現プロファイルの比較を行い，老化細胞に特徴的な微小環境調節候補分子群を見出す。また，老化細胞の培養上清について ELISA 法による検討を行い，特徴的な微小環境調節候補分子群を明らかにする。

②肝臓病の肝組織における微小環境調節候補分子発現の検討：肝臓病における微小環境調節候補分子の発現動態と炎症や線維化など病変との関連を，免疫組織化学と mRNA 遺伝子発現解析により検討する。特に老化関連分泌因子として CCL2 などのケモカイン発現を中心に解析する。

③老化細胞と正常細胞，癌細胞の共培養による微小環境調節候補分子の機能解析：老化細胞と正常肝構成細胞，癌細胞の共培養により，老化細胞が周囲の正常細胞に及ぼす影響（細胞増殖，分化誘導，炎症細胞の遊走）などについて検討する。中和抗体や siRNA を用いて，老化関連微小環境調節因子を明らかにする。

(3) 老化細胞の運命とその制御機構の解明培養肝構成細胞に過酸化水素や DNA 障害剤エトポシドを用いて細胞老化を誘導した後，長期培養を行い，老化細胞が細胞死に至る経路（アポトーシスか，アノイキスか，オートファジーか，ネクローシスか）を検討する。

特に、細胞老化との関連が注目されるオートファジーの関与を中心に解析する。

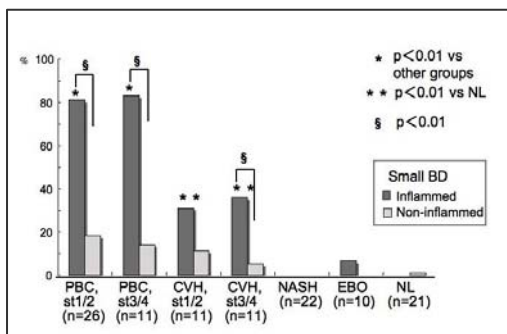
4. 研究成果

(1) 肝臓病の肝組織における細胞老化の発現状況の解析：収集した肝組織材料を用いて、原発性胆汁性肝硬変 (PBC), 慢性ウイルス性肝炎などの慢性肝疾患の細胆管反応における細胞周期マーカー (G1 期, cyclin D1; S 期, cyclin A) と老化関連マーカー p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip} 発現, 肝stem細胞マーカー neural cell adhesion molecule (NCAM) 発現の関連を検討した。PBC などの慢性肝疾患では線維化の進行に平行して細胆管反応に細胞老化がみられること、NCAM 発現はむしろ老化胆管細胞に発現することが明らかになった。

(2) 老化細胞による肝微小環境調節の分子機構の解析

① 肝臓病の肝組織における細胞老化関連分泌因子の発現：PBC の破壊性胆管炎の局所では、老化胆管細胞に CCL2, CX3CL1 発現の亢進を認めた。また、老化胆管細胞周囲には対応レセプターである CCR2, CX3CR1 陽性単核球、組織球のより強い浸潤を認めた。老化胆管細胞が周囲微小環境調節を行い、炎症の持続、促進に関与すると考えられた。さらに、非アルコール性脂肪性肝炎では線維化の進行に平行して CCL2 発現を示す老化胆管細胞が増加し、線維化に関与する可能性があることが示唆された。

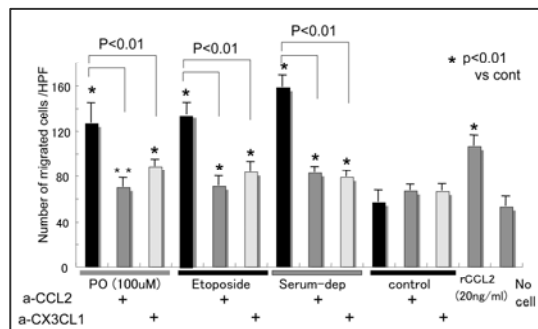
*PBC の炎症性胆管は CCL2 発現亢進を示す



② 老化肝構成細胞の産生する微小環境調節候補分子の検索：マウス培養胆管細胞に酸化ストレス、血清除去などにより細胞老化を誘導し、炎症性ケモカインを中心に、老化細胞

に特徴的な微小環境調節候補分子群の遺伝子発現プロフィールを検討した。CCL2, CX3CL1 をはじめ、多くのケモカインが老化胆管細胞で発現亢進を示すこと、老化胆管細胞の培養上清中にこれらケモカインが分泌されること、老化胆管細胞の培養上清は単球や肝星細胞の遊走を促進することが明らかになった。老化細胞がケモカイン, サイトカインなどのまた、これら細胞の遊走は、CCL2, CX3CL1 の中和抗体で阻害された。分泌を介して微小環境調節を行い、炎症を促進している可能性が示唆された。

*老化胆管細胞は単球系細胞遊走を誘導する



(3) 老化細胞の運命と制御機構の解明

培養胆管細胞に細胞老化を誘導した後、長期培養を行い、老化細胞が細胞死に至る経路の検討を行った。老化細胞が細胞死に至る過程にはアポトーシスとオートファジーの両者が関与することが明らかとなった (論文準備中)。また、胆管細胞の老化にはオートファジーが先行すること、p62/sequestosome-1 蓄積を示すオートファジー異常が細胞老化の発生に必要なことが、PBC の胆管病変での検討と培養細胞を用いた検討から示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. *Liver Int.* 2012, 32:487-99. 査読有

2. Sasaki M, Nakanuma Y. Novel approach to bile duct damage in primary biliary cirrhosis: participation of cellular senescence and autophagy. *Int J Hepatol*. 2012;2012:452143. 査読有

3. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2012, 57:660-666 査読有

4. Chiba M, Sasaki M, (他5名). Participation of bile ductular cells in the pathological progression of non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Pathol*. 2011, 64:564-70. 査読有

5. Sasaki M, Nakanuma Y. Biliary epithelial apoptosis, autophagy, and senescence in primary biliary cirrhosis. *Hepat Res Treat*. 2010; 205128. 査読有

6. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Modulation of the microenvironment by senescent biliary epithelial cells may be involved in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol*. 2010, 53:318-25. 査読有

7. Nakanuma Y, Zen Y, Harada K, Sasaki M, (他26名). Application of a new histological staging and grading system for primary biliary cirrhosis to liver biopsy specimens: Interobserver agreement. *Pathol Int*. 2010, 60:167-74. 査読有

8. Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, Nakanuma Y. Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. *Lab Invest*. 2010, 90:835-43. 査読有

9. Sasaki M, Ikeda H, Sato Y, Nakanuma Y. Bile ductular cells undergoing cellular senescence increase in chronic liver diseases along with fibrous progression. *Am J Clin Pathol* 2010, 133: 212-223. 査読有

10. Ikeda H, Sasaki M, (他 5 名). Large cell change of hepatocytes in chronic viral hepatitis represents a senescent-related lesion. *Hum Pathol* 2009, 40: 1774-1782. 査読有

11. Sasaki M, (他 5 名). Polycomb group protein Bmi1 is overexpressed and essential in anchorage-independent colony formation, proliferation and repression of cellular senescence in cholangiocarcinoma: tissue and culture studies. *Hum Pathol* 2009, 40: 1723-1730. 査読有

12. Ikeda H, Sasaki M, (他 5 名). Bile ductular cell reaction with senescent hepatocytes in chronic viral hepatitis is lost during hepatocarcinogenesis. *Pathol Int* 2009, 59: 471-478. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. Sasaki M, et al. The deregulated autophagy of mitochondria may be involved in the pathogenesis in primary biliary cirrhosis. 101st Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. (2012年3月19日, Vancouver convention center, Canada)

2. Sasaki M, et al. Increased expression of mitochondrial proteins associated with autophagy in the biliary epithelial lesions in primary biliary cirrhosis. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. (2011年11月6日, Moscone West convention center, USA)

3. 佐々木素子ら, パネルディスカッション 2: 自己免疫性肝疾患の病態と治療: 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変における senescence-associated secretory phenotypes (SASP) の関与. 第 39 回肝臓学会西部会 (2011年12月10日, 岡山コンベンションセンター, 岡山)

4. 佐々木素子ら, 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変におけるミトコンドリア蛋白の発現. 第 48 回消化器免疫学会総会 (2011年7月22日, エクセルホテル金沢, 石川)

5. 佐々木素子ら, ワークショップ 11「自己免疫性肝疾患 upgrade」 原発性胆汁性肝硬変の胆管病変におけるオートファジー異常第 47 回日本肝臓学会総会 (2011 年 6 月 2 日 ホテル グランパシフィック・LE DAIBA, 東京)

6. Sasaki M, et al. A possible involvement of p62/sequestosome-1 in the process of biliary epithelial autophagy and senescence in primary biliary cirrhosis. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2010年11月2日, Hynes convention center, USA)

7. Sasaki M, et al. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2010年11月2日, Hynes convention center, USA)

8. Sasaki M, et al. A possible involvement of autophagy in the process of biliary epithelial senescence in primary biliary cirrhosis. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2009 年 11 月 2 日, Hynes convention center, USA)

9. Sasaki M, et al. A modulation of microenvironment by senescent biliary epithelial cells in the pathogenesis of bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (2009 年 11 月 2 日, Hynes convention center, USA)

10. 佐々木素子 細胞老化に着目した肝胆道系疾患の発生・進展機構の解明 第 55 回日本病理学会秋期特別総会 (2009 年 11 月 20 日 京王プラザホテル, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 素子 (SASAKI MOTOKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号 : 70225895

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

佐藤 保則 (SATO YASUNORI)

金沢大学・医学系・講師

研究者番号 : 30324073

中沼 安二 (NAKANUMA YASUNI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号 : 10115256