

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32822

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07732

研究課題名(和文)肝再生プログラミング破綻とNrf2の意義

研究課題名(英文)Possible involvement of Nrf2 in breakdown of liver regeneration program

研究代表者

梅村 隆志 (Umemura, Takashi)

ヤマザキ学園大学・動物看護学部・教授

研究者番号：50185071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生プログラミングの破綻に係るNrf2の関与の詳細をNrf2欠損並びに野生型マウスを用いて持続性増殖の結節性肝再生モデル、及び急性増殖の部分肝切除モデルにより検討した。結節性肝再生モデルでは、結節性再生性肝細胞過形成と肝細胞腫瘍においてNotch経路の活性化が認められたが、その程度は腫瘍で顕著であったことから腫瘍性形質の獲得にはNotchシグナルが関与する可能性が示唆された。部分肝切除モデルではNrf2は急性な細胞増殖を収束させる過程に関与することが示唆された。今後、増殖シグナルのON/OFF制御に寄与するNrf2/Notchシグナル経路の役割を明らかにする必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated possible involvement of Nrf2 in breakdown of liver regeneration program through analysis of nodular hepatocyte regeneration model as chronic liver regeneration and partial hepatectomy model as acute liver regeneration using Nrf2 knockout mice. In nodular hepatocyte regeneration model, activation of Delta-Notch signaling was found in nodular regenerative hepatocellular hyperplasia and hepatocellular adenoma, but the extent in the latter was more prominent, indicating that activation of Notch signaling might be a key factor to acquire neoplastic properties. In partial hepatectomy model, Nrf2 was considered to be required on termination of liver regeneration. Further studies for the interaction between Nrf2 and Notch in ON/OFF regulation of chronic liver regeneration process were needed.

研究分野：毒性病理

キーワード：肝再生 Nrf2 慢性増殖刺激

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞研究に端を発した細胞のリプログラミング機構の存在は、あらためて肝再生過程の分子メカニズムへの注目を高めている。肝再生過程は肝細胞と共に肝内胆管上皮細胞、星細胞、類洞内皮細胞などの増殖も包含しており、肝臓内外からの液性制御に加え、Notch シグナルに代表される肝前駆細胞への分化誘導機序など、その再生過程には多因子が複雑に絡み合っている。また、近年では増殖シグナルの ON/OFF に新たな概念として Snail/GSK-3 β の関与が明らかになるなど、この領域の研究は精力的に行われている。

一方、我々は肝毒性物質を長期間投与したラット肝臓で観察された結節性病変を病理組織学的に解析した結果、結節内肝細胞の増殖活性の亢進は維持されているが、肝細胞はホモジナスではなく、胆管上皮や血管の増生も結節内で認められていることから、この結節が腫瘍性結節ではなく、再生性過形成結節であることを明らかにした^{1, 2)}。さらに、*Nrf2* ホモ欠損並びにその野生型マウスに肝毒性物質を長期間投与すると、同様の結節性病変を惹起し、投与を継続することにより結節内に腫瘍性病変を誘導し、その発生頻度は *Nrf2* ホモ欠損マウスで有意に高いことを明らかにした³⁾。これらの事実から、肝毒性物質の長期間投与による肝再生過程あるいはその破綻から腫瘍形成に至る過程に *Nrf2* が大きな影響を与えている可能性が考えられた。

そこで、本研究では *Nrf2* 欠損並びに野生型マウスを用いて肝毒性物質の長期間投与により発生する肝結節及び肝腫瘍を適宜選別し、その分子病理学的な特徴を明らかにすることで結節内の細胞の腫瘍形質獲得に至る過程を追及することができると着想した。さらに、研究が進んでいる部分肝切除による肝再生では増殖シグナルの ON/OFF がごく短期間で完結しているのとは対照的に、結節性病変は慢性的な障害に起因した持続的な増殖シグナルにより再生過程が進行していることに着目し、2 つの肝再生モデルを比較し研究を遂行することで、未だ不明な点が多い慢性的な肝再生のメカニズムを探索できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、慢性障害に続発する結節性肝再生モデルを部分肝切除モデルと比較することで、持続的な増殖刺激による肝再生プログラムの詳細を検索し、その破綻から腫瘍性形質獲得に至る機序を解明し、その中での *Nrf2* の意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 結節性肝再生モデルを用いた検討

6 週齢の雄性 ICR 系マウスに piperonyl butoxide (PBO) を 6000 ppm の濃度で 43 週間混餌投与した。対照群には基礎食を与えた。投与終了後、イソフルラン麻酔下にて肉眼的に認められた肝結節を採取し、病理組織学的検査に供した。病理組織学的に診断された PBO 投与群の結節性再生性肝細胞過形成 (NRH) (図 1、A-C)、肝細胞腺腫 (HCA、D-F) および非増殖病変部並びに対照群の非病変部をそれぞれレーザーマイクロディセクション法にて採取し、RNA 抽出後 cDNA マイクロアレイを実施した。得られたデータは GeneSpring により解析し、対照群に比して 2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子を抽出し、変動が認められた遺伝子群については single experiment analysis により関連する経路を検討した。

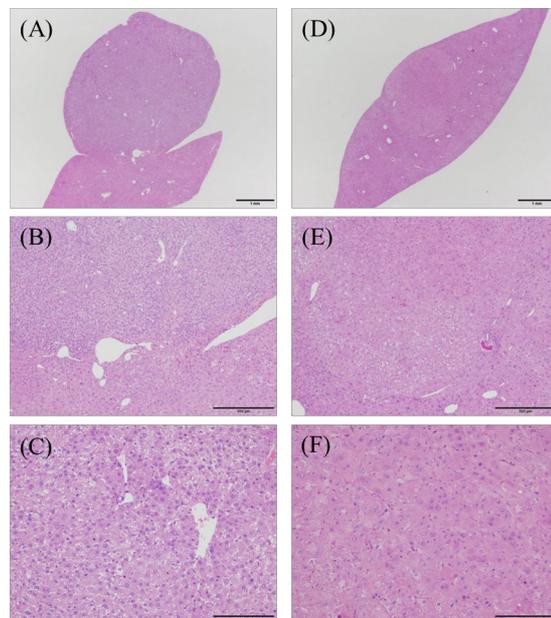


図 1 PBO 誘発 NRH (A-C) 及び HCA (D-F)

(2) 部分肝切除モデルを用いた検討

10-11 週齢雄性 *Nrf2* ホモ欠損マウスならびに野生型マウスに 2/3 部分肝切除を実施した。術後 6、24、48、96 および 168 時間後にそれぞれイソフルラン麻酔下にて採血した後に肝臓を摘出し、肝細胞の PCNA 陽性細胞率を検討した。採血後分離した血清はアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST) 及びアラニントランスアミナーゼ (ALT) の測定に供した。

4. 研究成果

(1) 結節性肝再生モデルを用いた検討

PBO 投与終了後の肝臓で認められた NRH 及び HCA について網羅的遺伝子発現解析を実施し、変動が認められた遺伝子群に関して階層的クラスタリング解析を実施した結果、

NRH と HCA は異なるクラスターを形成した。また、NRH 及び HCA は PBO 投与非増殖病変部及び対照群の非病変部と異なるクラスターを形成した。具体的な遺伝子発現レベルを検討した結果、NRH 並びに HCA において細胞周期関連遺伝子の発現亢進が認められた (表 1)。以上の結果から、NRH と HCA はそれぞれ分子病理学的に異なる増殖性病変であること示された。

表 1 NRH 及び HCA における細胞周期関連遺伝子の発現変動

Gene symbol	Fold change		
	Non-proliferative (PBO)	NRH	HCA
Mm_Cell_cycle_WP190_81191			
<i>Mcm6</i>	2.6	4.0	4.4
<i>Mcm5</i>	1.8	4.6	3.4
<i>Bub1</i>	2.8	19.6	13.1
<i>Ccn1</i>	1.3	7.9	3.6
<i>Trp53</i>	1.1	1.3	1.7
<i>Ccn2</i>	2.5	13.5	7.0
<i>Rbl1</i>	1.4	3.7	2.8
<i>Mad2l1</i>	2.3	5.4	4.6

NRH または HCA それぞれで顕著に変動した遺伝子群を検討した結果、NRH 及び HCA において Delta-Notch 経路の遺伝子発現亢進が認められたが、その程度は HCA で顕著であった (表 2)。Notch シグナルは組織の発生過程や幹細胞などにおいて細胞運命を制御する経路であり、肝再生過程にも関与することが知られている。加えて、Notch 経路の活性化はマウス肝発がんを促進することや腫瘍血管の形成に関与することが報告されている。今回、HCA において Delta-Notch 経路の遺伝子発現亢進が顕著に認められたことから、慢性的な肝再生から腫瘍性形質を獲得する過程には、Notch シグナルを介した肝細胞増殖の制御が関与する可能性が考えられた。

表 2 NRH 及び HCA における Delta-Notch 経路関連遺伝子の発現変動

Gene symbol	Fold change		
	Non-proliferative (PBO)	NRH	HCA
Mm_Delta-Notch_Signaling_Pathway_WP265_69189			
<i>Notch4</i>	-1.2	1.9	3.4
<i>Dll4</i>	1.8	2.3	4.3
<i>Jag2</i>	1.0	1.3	8.5
<i>Dtx1</i>	1.7	-2.2	-2.9
<i>Trp53</i>	1.1	1.3	1.7
<i>Mapk1</i>	1.1	-1.3	-1.2

また、NRH では Cyp をはじめとする代謝酵素の発現低下が認められた (表 3)。これまでに、hepatocyte growth factor を発現させたマウス肝臓や部分肝切除後の再生肝など増殖活性の高い肝臓では Cyp 等の代謝酵素の発現が抑制されることが報告されている。今回、NRH において特徴的に認められた Cyp の発現低下は、これら肝再生モデルに類似していたことから、NRH は再生性の増殖性病変であることが示唆された。しかしながら、NRH において変動の認められた遺伝子に関して、部分肝切除後の肝細胞増殖に重要な経路であることが知られている HGF、EGFR、TNF- α 及び IL-6 経路の関与を検討した結果、何れの経路においても有意な関連は認められなかった (表 4)。以上の結果から、NRH は増殖活性の高い再生性の病変であるものの、その増殖は部分肝切除などの急性的な肝再生と異なる増殖刺激により誘導されている可能性が考えられた。

表 3 NRH 及び HCA における Cyp 関連遺伝子の発現変動

Gene symbol	Fold change		
	Non-proliferative (PBO)	NRH	HCA
Mm_Oxidation_by_Cytochrome_P450_WP1274_73502			
<i>Cyp1a2</i>	4.5	-2.5	3.7
<i>Cyp4v3</i>	-1.9	-3.9	-2.7
<i>Cyp7b1</i>	-2.2	-24.3	-3.0
<i>Cyp26a1</i>	2.2	-4.0	-2.4
<i>Cyp27a1</i>	-1.2	-4.0	-1.5
<i>Cyb5r1</i>	1.6	4.1	2.8
<i>Cyb5</i>	1.9	-1.5	1.4
<i>Cyb5b</i>	-1.3	-2.5	-1.5

表 4 NRH において認められた発現変動遺伝子における HGF、EGFR、TNF- α 及び IL-6 経路の関与

Pathway	Pathway entities of experiment type	Matched Entities	p-value
Mm_Signaling_of_Hepatocyte_Growth_Factor_Receptor_WP193_69178	34	2	0.10
Mm_EGFR1_Signaling_Pathway_WP57_2_71756	176	4	0.31
Mm_TNF-alpha_NF-kB_Signaling_Pathway_WP246_69201	184	4	0.33
Mm_IL-6_signaling_Pathway_WP387_72091	99	2	0.47

以上より、PBO 誘発 NRH と HCA との発現遺伝子の差異を解析した結果、NRH 及び HCA では細胞周期に関わる遺伝子群は同様の発現傾向を示したものの、HCA では Delta-Notch 経路の発現が顕著に変動したことから、腫瘍性形質を獲得する過程には Notch シグナルを介した肝細胞増殖の制御が

関与する可能性が考えられた。しかし、当初計画していた *Nrf2* 欠損マウスにおける NRH の解析を完結することができず、Notch 経路と *Nrf2* の関与は明らかにすることができなかった。

(2) 部分肝切除モデルを用いた検討

部分肝切除後の肝細胞増殖活性を継時的に検討した結果、野生型マウスの PCNA 陽性細胞率は部分肝切除後 48 から 96 時間をピークに上昇し、168 時間後には減弱した。一方、*Nrf2* ホモ欠損マウスの PCNA 陽性細胞率は、野生型マウスと同様に部分肝切除後 48 から 96 時間をピークに上昇し、その程度も野生型マウスに比して顕著な差は認められなかった。しかし、野生型では減弱が認められた 168 時間後においても PCNA 陽性細胞率は高値を維持した(図 2)。以上の結果から、*Nrf2* は部分肝切除後の急性的な細胞増殖に対して収束させる過程に関与することが明らかになった。

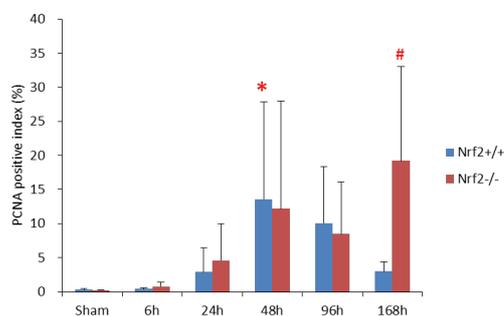


図 2 部分肝切除後の PCNA 陽性細胞率の継時的変化

血清生化学的検査の結果、両遺伝子型の血清中 AST および ALT は部分肝切除後 6 から 48 時間をピークに上昇し、96 から 168 時間後には低下し、その程度は両遺伝子型間で顕著な差は認められなかった(図 3)。細胞増殖の引き金の一つである細胞障害の程度に遺伝子型間で差が認められなかったことを考慮すると、*Nrf2* が部分肝切除後の急速な細胞増殖の制御に直接的に関与する可能性を示すものと考えられた。

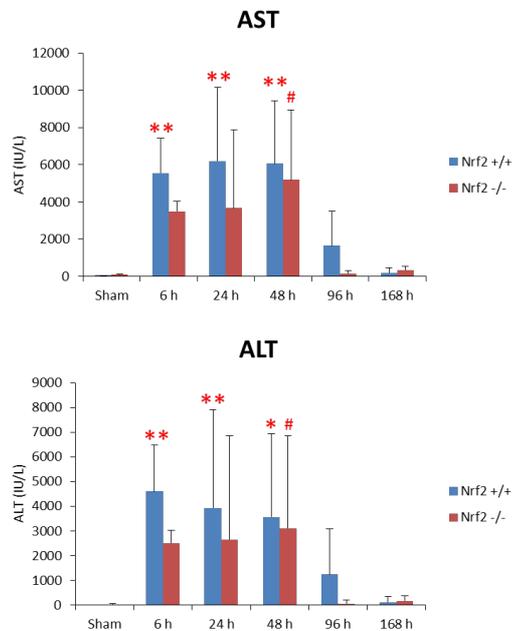


図 3 部分肝切除後の AST 及び ALT の継時的変化

そこで、部分肝切除後の肝再生に重要な増殖シグナルの一つである STAT3 のリン酸化を検討した結果、部分肝切除後 168 時間におけるリン酸化 STAT3 は *Nrf2* 欠損マウスで高発現していた(図 3)。一方、c-Met のリン酸化状態には顕著な変化は認められなかった。このことから、*Nrf2* は STAT3 のリン酸化を介して、部分肝切除後の肝細胞増殖シグナルの OFF 制御に寄与している可能性が考えられた。

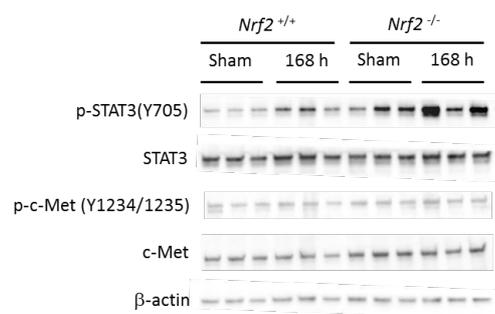


図 4 部分肝切除後の STAT3 リン酸化

(3) 結節性肝再生モデル及び部分肝切除モデルのまとめ

以上より、(1) 結節性肝再生モデル及び(2) 部分肝切除モデルを用いた検討から、慢性障害に続発する NRH 及び HCA では Delta-Notch 経路の発現が変動したことももの、その程度は HCA で顕著であったことから、持続的な増殖刺激による肝再生病変が腫瘍性形質を獲得する過程には Notch シグナルを介した細胞増殖の制御が関与する可能性が考えられ

た。また、急性的な肝再生に対し Nrf2 は STAT3 のリン酸化を介した増殖シグナルの OFF 制御に寄与している可能性が考えられた。

しかしながら、本研究では Notch 経路と Nrf2 の関与は明らかにすることができなかったことから、今後、*Nrf2* 欠損マウスの肝再生モデルにおける Notch シグナル経路の解析を展開することで、肝細胞増殖シグナルの ON/OFF 制御に寄与する Nrf2/Notch シグナル経路の役割を明らかにする必要があると考えられた。

<引用文献>

1) Tasaki M, Umemura T, Inoue T, Okamura T, Kuroiwa Y, Ishii Y, Maeda M, Hirose M, Nishikawa A. Induction of characteristic hepatocyte proliferative lesion with dietary exposure of Wistar Hannover rats to tocotrienol for 1 year. *Toxicology*. 250(2-3), 143-50, 2008,

2) Tasaki M, Umemura T, Kijima A, Inoue T, Okamura T, Kuroiwa Y, Ishii Y, Nishikawa A. Simultaneous induction of non-neoplastic and neoplastic lesions with highly proliferative hepatocytes following dietary exposure of rats to tocotrienol for 2 years. *Arch Toxicol*. 83(11), 1021-30, 2009.

3) Tasaki M, Kuroiwa Y, Inoue T, Hibi D, Matsushita K, Kijima A, Maruyama S, Nishikawa A, Umemura T. Lack of nrf2 results in progression of proliferative lesions to neoplasms induced by long-term exposure to non-genotoxic hepatocarcinogens involving oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol*. 66(1), 19-26, 2014.

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)

[学会発表](計3件)

高須伸二, 石井雄二, 木島綾希, 小川久美子, 梅村隆志: 急性的な増殖刺激により惹起される肝細胞再生過程における Nrf2 の関与: 第 44 回日本毒性学会学術年会 . 2017

高須伸二, 横尾諭, 木島綾希, 石井雄二, 小川久美子, 梅村隆志: Piperonyl butoxide 誘発マウス結節性再生性肝細胞過形成の腫瘍性病変との分子病理学的差異: 第 33 回日本毒性病理学会学術集会 . 2017
Takasu S, Yokoo Y, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T: Molecular pathological differences between nodular regenerative hepatocellular hyperplasias and hepatocellular adenoma induced by long term exposure of piperonyl butoxid to mice.

15th European Congress of Toxicologic Pathology, 2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

梅村 隆志 (UMEMURA, Takashi)
ヤマザキ動物看護大学・動物看護学部・教授

研究者番号: 50185071

(2)研究分担者

高須 伸二 (TAKASU, Shinji)
国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官

研究者番号: 00597891