

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32822

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06042

研究課題名(和文) 持続性肝再生過程のON/OFF制御に寄与するNrf2/Notchシグナル経路

研究課題名(英文) Nrf2/Notch signal pathways contributing to ON/OFF regulation in sustained liver regeneration

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究目的は、部分肝切除モデルを用いた研究からON/OFF制御を起終点とした急性増殖シグナルにおけるNrf2によるNotchシグナル制御に着目し、結節性肝再生モデルを用いて、持続性肝再生シグナルにおけるON/OFF制御の実態とそこに関わるNrf2によるNotchシグナル制御機構を明らかにすることである。その結果、結節性肝再生モデルおよび部分肝切除モデルを用いた検討から、Notch4を介したNotchシグナルの活性化は持続性肝再生シグナルが破綻する過程に関与し、その活性化にNrf2が関わる可能性が示唆された。また、急性肝再生と持続性肝再生におけるNrf2の作用点は異なる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性肝炎や続発する肝腫瘍で生じている持続的な肝再生刺激の分子メカニズムの理解は臨床的には大変重要である。慢性的な肝障害下で生じる持続性増殖刺激においてはON/OFF制御の状態自体も不明であり、急性刺激で明らかとなりつつあるNrf2によるNotchシグナルへの制御機構の存在も未だ明らかとなっていない。本研究により、慢性肝障害により誘発される持続性肝再生シグナルにおけるON/OFF制御の実態と、それに関与するNrf2によるNotchシグナル制御機構の一部を解明したことは、慢性疾患から発症する腫瘍予防戦略に大きな道筋がたった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to clarify Nrf2/Notch signal pathways contributing to ON/OFF regulation in sustained liver regeneration using the established animal model of nodular regenerative hepatocytes. Activation of Notch pathway by Notch4 may contribute to the disruption of signal regulating sustained liver regeneration and the possible participation of Nrf2 in these pathways. In addition, there may be different points affected by Nrf2 between in transient and in sustained liver regeneration.

研究分野：毒性病理学

キーワード：持続性肝再生 Notchシグナル Nrf2

1. 研究開始当初の背景

肝再生過程は、肝細胞のみならず肝内胆管上皮細胞や星細胞、類洞内皮細胞など多種の細胞が同時に秩序を保って増殖していくことから、分化誘導に寄与する分子、特に Notch シグナルの活性化の関与が注目されている。一方、抗酸化酵素群の転写因子である Nrf2 の欠損マウスを用いた実験から、本マウスでは部分肝切除後の再生過程が遅延している可能性が報告され、Nrf2 が肝再生プログラミング過程の ON/OFF 制御に何らかの関与をしている可能性が考えられている。さらに近年、Nrf2 の認識部位である antioxidant response element (ARE) 配列が Notch1 のプロモーター領域に見いだされ、肝再生過程における Nrf2 による Notch シグナル制御に注目が集まっている。一方、慢性肝炎や続発する肝腫瘍で生じている持続的な肝再生刺激の分子メカニズムの理解は臨床的には大変重要であるが、その研究はほとんど行われていない。慢性的な肝障害下で生じる持続性増殖刺激においては ON/OFF 制御の状態自体も不明であり、急性刺激で明らかとなりつつある Nrf2 による Notch シグナルへの制御機構の存在も未だ明らかとなっていない。本研究では未だ明らかにされていない慢性肝障害により誘発される持続性肝再生シグナルにおける ON/OFF 制御の実態と、それに関与する Nrf2 による Notch シグナル制御機構の解明を目指す。

2. 研究の目的

部分肝切除モデルを用いた研究から提唱された ON/OFF 制御を起終点とした急性増殖シグナルにおける Nrf2 による Notch シグナル制御に着目し、結節性肝再生モデルを用いて持続性肝再生シグナルにおける Notch シグナルの関与と Nrf2 による制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

持続性肝再生モデルとしての結節性肝再生モデルを用いた検討に関しては、6 週齢の雄性 *Nrf2* ホモ欠損マウスおよび野生型マウスにピペロニルブトキサイド (PBO) を 6000 ppm の濃度でそれぞれ 43 週および 39 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、一部をホルマリン固定による病理組織学的検査に供し、残りを凍結保存した。病理組織学的検査により診断された結節性再生性肝細胞過形成 (NRH) 肝細胞腫瘍および非増殖病変部ならびに対照群の非病変部について、凍結した肝サンプルから RNA を抽出し、定量的リアルタイム法による Notch シグナル関連遺伝子の発現解析を実施した。

急性肝再生モデルとしての部分肝切除モデルを用いた検討については、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 時間後に肝臓を摘出した。摘出した肝臓は凍結保存し、RNA を抽出後、定量的リアルタイム法による遺伝子発現解析を実施した。

4. 研究成果

結節性肝再生モデルにおける PBO 投与群の NRH、肝細胞腫瘍および非増殖病変部ならびに対照群の非病変部について、Notch シグナル関連遺伝子の発現を検討した結果、野生型マウスでは *Notch4* の発現が肝細胞腫瘍において高い傾向が認められた。我々はこれまでに、NRH と肝細胞腫瘍を対象とした網羅的遺伝子発現解析から、肝細胞腫瘍内では *Notch4* 遺伝子の高発現が認められることを報告しており¹⁾、本結果はこれを支持するものであった。一方、*Nrf2* ホモ欠損マウスでは、*Notch4* の発現は肝細胞腫瘍のみならず NRH においても高かった。さらに Notch シグナルのリガンドである *Jag1* および *Jag2* の発現を検討した結果、*Jag2* の発現は両遺伝子型共に NRH および HCA で高い傾向が認められた (Fig. 1)。以上の結果から、*Nrf2* ホモ欠損マウスでは腫瘍のみならず

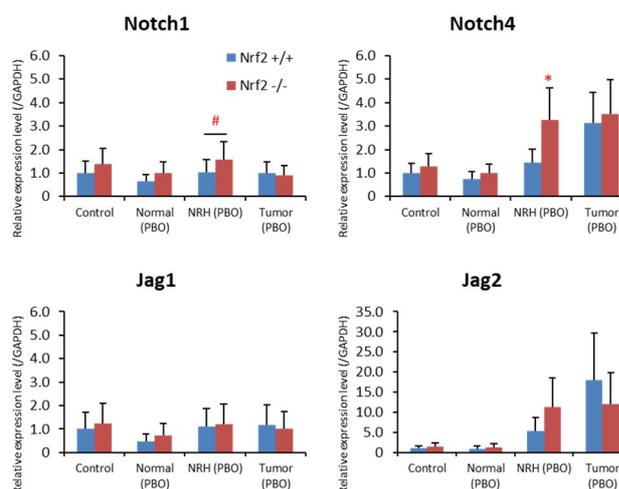


Fig. 1. NRH及びHCAにおけるNotchシグナル関連遺伝子の発現変動

腫瘍のみならず

NRH 内においても Notch シグナルが活性化している可能性が示された。一方、*Notch1* の発現は両遺伝子型のマウスにおいても病変による顕著な差は認められなかった。

これまでに *Nrf2* ホモ欠損マウスを用いた検討から *Nrf2* ホモ欠損マウスの NRH 内では肝細胞腫瘍が高率に観察されることを明らかにしている²⁾。従って、本研究結果から PBO 誘発の結節性肝再生モデルにおいては持続性肝再生シグナルが破綻する過程に *Notch4* を介した Notch シグナルの活性化が関与し、持続性肝再生時の Notch シグナルの活性化に *Nrf2* が関わっている可能性が示唆された。

次に、部分肝切除後の肝再生過程における *Notch4* および *Jag2* の発現を検討した結果、*Notch4* および *Jag2* の何れの因子も *Nrf2* ホモ欠損および野生型マウスの両遺伝子型とも認められなかった (Fig. 2)。このことから、*Nrf2* は急性的な肝再生ではなく持続性肝再生過程において *Notch4* の発現を制御している可能性が示された。

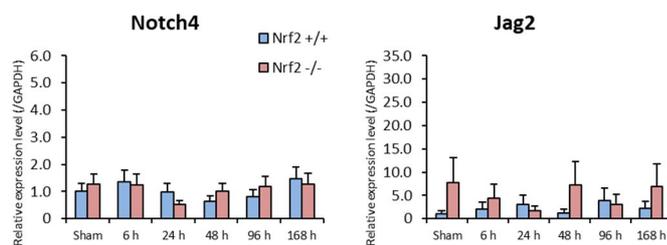


Fig. 2. 部分肝切除モデルにおけるNotchシグナル関連遺伝子の発現

さらに、急性的な肝再生過程において重要な因子である IL6/STAT3 経路の関与について検討した。これまでに、*Nrf2* ホモ欠損マウスを用いた検討から *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を見出している。そこで急性および持続性の各肝再生モデルにおける *IL-6* 発現を検討した。その結果、部分肝切除モデルの野生型マウスでは部分肝切除後 24 時間後に *IL-6* の発現がピークとなり、その後発現が収束するのに対して、*Nrf2* ホモ欠損マウスにおいては野生型マウスで認められた一過性の発現変動は見られなかった (Fig. 3)。一方、結節性肝再生モデルにおいては、*Nrf2* の遺伝子型に関わらず NRH および肝細胞腫瘍の何れにおいても *IL-6* 発現上昇が見られなかった。このことから、急性肝再生と持続的肝再生における *Nrf2* の作用点は全く異なる可能性が示された。

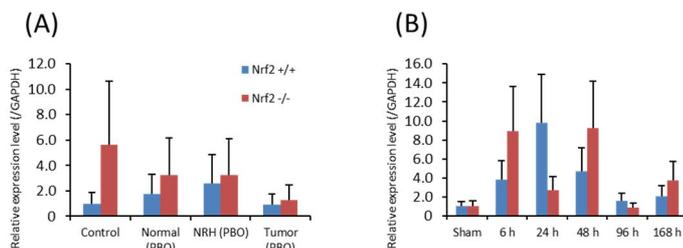


Fig. 3. マウス肝再生モデルにおけるIL-6の発現 (A) 結節性肝再生モデル (B) 部分肝切除モデル

以上より、結節性肝再生モデルおよび部分肝切除モデルを用いた検討から、*Notch4* を介した Notch シグナルの活性化は持続性肝再生シグナルが破綻する過程に関与し、その活性化に *Nrf2* が関わる可能性が示唆された。また、急性肝再生と持続性肝再生における *Nrf2* の作用点は異なる可能性が示された。

< 引用文献 >

- 1) Takasu S, Yokoo Y, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T. Molecular pathological differences in global gene expression between two sustained proliferative lesions, nodular regenerative hepatocellular hyperplasia and hepatocellular adenoma, in mice. *Toxicol Pathol.* 47(1), 44-52. 2019.
- 2) 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

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takasu S, Yokoo Y, Ishii Y, Kijima A, Ogawa K, Umemura T.	4. 巻 47
2. 論文標題 Molecular Pathological Differences in Global Gene Expression between Two Sustained Proliferative Lesions, Nodular Regenerative Hepatocellular Hyperplasia and Hepatocellular Adenoma, in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 44-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0192623318810200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高須伸二, 松本佳奈, 石井雄二, 小川久美子, 梅村隆志
2. 発表標題 急性肝再生過程におけるON/OFF制御へのNr f2の関与
3. 学会等名 第37回日本毒性病理学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高須 伸二 (Takasu shinji) (00597891)	国立医薬品食品衛生研究所・病理部・主任研究官 (82601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------