

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09189

研究課題名(和文) 肝星細胞をターゲットとした新たな肝再生機序解明と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) A new liver regeneration molecular mechanism involving hepatic stellate cells, Kupffer cells, and glucose-regulated protein 78 as a new hepatotrophic factor

研究代表者

播本 憲史 (Harimoto, Norifumi)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00419582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：M2BPGiはクッパ細胞からの分泌蛋白GRP78の産生を促進した。クッパ細胞由来のGRP78は肝細胞の増殖活性を促進した。マウス70%肝切除モデルにおいてGRP78は、肝再生を有意に促進し、90%肝切除モデルにて有意に生存率を増加させた。クッパ細胞の働きを阻害すると肝再生も阻害された。結論としてM2BPGiで活性化されたクッパ細胞はGRP78を分泌し、これにより肝再生が促進され、致死性のマウスモデルの生存率が向上した。肝切除を行った実臨床患者において肝再生率とM2BPGi、GRP78は相関関係にあった。正常肝の切除において肝再生時にM2BPGi、GRP78が上昇していることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の検討にて新たな肝再生因子GRP78を同定し、その肝再生におけるメカニズムを解明した。この肝再生の芽鱗図はこれまで報告されたことがなく、新しい肝栄養因子GRP78が致命的な肝不全の有望な治療ツールである可能性があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of M2BPGi on human hepatocytes and KCs, and explored secretory factors from M2BPGi-activated KCs using proteomics. Furthermore, the effect on liver regeneration of glucose-regulated protein 78 (GRP78) as one of the M2BPGi-related secreted proteins was examined in vitro and in murine hepatectomy models.

Results: Although M2BPGi had no hepatocyte-promoting effect, M2BPGi promoted the production of GRP78 in KCs. The KC-driven GRP78 promoted hepatocyte proliferation. GRP78 administration facilitated liver regeneration after 70% hepatectomy and increased the survival rate after 90% hepatectomy in mice.

Conclusions: The M2BPGi-activated KCs secrete GRP78, which facilitates liver regeneration and improves the survival in a lethal mice model. Our data suggest that the new hepatotrophic factor GRP78 may be a promising therapeutic tool for lethal liver failure.

研究分野：肝臓外科

キーワード：肝細胞 肝再生

## 1. 研究開始当初の背景

肝線維化マーカーとして発見された M2BPGi は、肝の星細胞が産生し、肝星細胞の活性化マーカーであること、M2BPGi は Kupffer 細胞の Mac-2(galactin3)を誘導し、Kupffer 細胞は Mac2 依存性に肝星細胞を活性化することが明らかとなったがさらに肝星細胞の活性化マーカーとして様々な役割をもつ可能性があり、肝臓の病態における新たな肝星細胞の役割が明らかになるものと考えている。われわれは、M2BPGi の Mac-2 を介した生理活性に注目し、肝再生の制御においても重要な役割を果たしているという仮説を立てた。生体肝移植ドナーにおいて、肝切除後早期から速やかに血清 M2BPGi 値が上昇した肝再生率と有意に相関する結果からは、M2BPGi 自体が肝再生を規定しているに關与する可能性を示していると考えた。これまでに肝星細胞の肝再生における役割は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

肝臓は再生能力の高い臓器であるが、肝再生のメカニズムについては未だに解明されていない。M2BPGi(Mac-2 binding protein glycan isomer)は肝の線維化マーカーとして同定され、われわれは肝星細胞の活性化マーカーとなることを報告した。また Mac-2 を介して Kupffer 細胞への生理活性を有していることを明らかにした。本研究では M2BPGi の Mac-2 を介した生理活性に注目し、肝再生における M2BPGi の動態と生理活性について検討し、肝再生における M2BPGi を介した分子機序を明らかにすることで、これまでにない新たな肝切除後、肝再生の分子機序を解明する。

## 3. 研究の方法

1. プロテインXがヒト肝細胞培養系に与える影響を検討する。同定タンパクのヒト肝細胞への影響同定されたタンパク(プロテインX)を用いて、ヒト肝細胞(PBX cell、フェニックスバイオ社)のBrdU取り込みに与える影響を検討する。プロテインX投与により肝細胞のBrdU取り込みが促進されれば、プロテインXの新たな肝再生促進因子としての役割が示される。複数の候補因子が同定されれば上記培養系においてスクリーニングを行い、最も効果の強い因子をプロテインXとして今後の研究の対象とする。
2. 70%、90%肝切除施行後のマウスを経時的に犠死させ、摘出肝におけるプロテインXの発現や局在を検討する。現在当研究室でC57BL/6マウスを用いた70%、90%肝切除モデルを確立し、安定した生存率・肝再生率が得られている。マウス70%、90%肝切除モデルにおいて、経時的に犠死させ、血清中のプロテインXの動態をELISA法にて明らかにする。同時に再生肝を摘出し、免疫組織化学法を用いて、プロテインXの再生肝における局在と経時的变化を明らかにする。
3. 70%、90%マウス肝切除モデルに、肝切除前後にプロテインXを投与し、肝再生率や生存率に与える影響を検討する。肝切除前後にプロテインXの腹腔内投与を行い、術後1、3、7日目に肝重量やBrdU取り込みを検討し、肝再生が促進されるか検討する。この過程で最も再生が促進される至適投与のタイミング、投与量を明らかにする。プロテインX投与にて肝切除後肝再生率が増加すれば、肝切除後肝再生における肝再生促進因子プロテインXの意義が示される。さらに従来生存率が不良とされる90%肝切除においてプロテインXを投与し、生存率の向上の効果を検討する。

## 4. ヒト肝切除周術期における血清プロテインXの動態

すでに群馬大学のバイオバンクに採取・保存されている血清を用いて、ヒト肝切除の

周術期におけるプロテイン X の動態を検討し、最終的な臨床応用への基礎データとする。

#### 4 . 研究成果

M2BPGi がヒト肝細胞とクッパー細胞に及ぼす影響を調べた。M2BPGi を添加した Kupffer 細胞の上清を質量分析計を用いてグルコース調節タンパク質 78( GRP78 )を突き止めた。さらに、M2BPGi 関連分泌タンパク質の 1 つとしての GRP78 の肝臓再生への影響を、*invitro* およびマウス肝切除モデルで調べた。結果として M2BPGi には *in vitro* で肝細胞増殖促進効果はなかったが、M2BPGi はクッパー細胞からの分泌蛋白 GRP78 の産生を促進した。クッパー細胞由来の GRP78 は肝細胞の増殖活性を促進した。マウスの 70% 肝切除モデルにおいて GRP78 の投与は、肝再生を有意に促進し、90% 肝切除モデルにて有意に生存率を増加させた。クッパー細胞の働きを阻害するとこの肝再生も阻害された。結論として M2BPGi で活性化されたクッパー細胞は GRP78 を分泌し、これにより、肝再生が促進され、致命的なマウスモデルの生存率が向上した。肝切除を行った実臨床患者において肝再生率と M2BPGi、GRP78 は相関関係にあった。正常肝の切除において肝再生時に M2BPGi、GRP78 が上昇していることを証明した。この肝再生のメカニズムはこれまで報告されたことがなく、このデータは、新しい肝栄養因子 GRP78 が致命的な肝不全の有望な治療ツールである可能性があることを示唆した。現在論文投稿し英文雑誌の *in press* となっている。

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 Hagiwara K, Harimoto N, et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A new liver regeneration molecular mechanism involving hepatic stellate cells, Kupffer cells, and glucose-regulated protein 78 as a new hepatotrophic factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1183.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋原慶、播本憲史ら
2. 発表標題 急性肝不全治療における新たな肝再生因子の可能性
3. 学会等名 第47回日本急性肝不全研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋原慶、播本憲史ら
2. 発表標題 規肝線維化血清マーカーの研究により見つかった新たな肝再生因子の発見と展開
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋原慶、播本憲史ら
2. 発表標題 新規肝線維化血清マーカーの研究により発見された新たな肝再生因子
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋原慶、播本憲史ら
2. 発表標題 新規肝線維化血清マーカーの研究から見えてきた新たな肝再生因子の発見と展開
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	五十嵐 隆通 (Igarashi Takamichi) (20648472)	群馬大学・医学部附属病院・助教  (12301)	
研究分担者	新木 健一郎 (Araki Keniticho) (60431706)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教  (12301)	
研究分担者	渡辺 亮 (Watanabe Akira) (60738847)	群馬大学・医学部附属病院・助教  (12301)	
研究分担者	調 憲 (Shirabe Ken) (70264025)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授  (12301)	

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
---------	---------