

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591606

研究課題名(和文)

肝再生早期におけるカルシトニンの役割とその分子機構

研究課題名(英文)

The role of calcitonin in the early phase of liver regeneration and its molecular mechanism.

研究代表者

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：80378091

研究成果の概要(和文)：

「肝再生の促進因子としてカルシトニンが重要な働きを担う」という仮説を立て検証を行った。70%肝切除モデルにおいて、再生肝での CGRP 遺伝子の発現は、肝切除1時間後から亢進し、切除12時間後でピークに達した。また免疫染色においても CGRP 抗体陽性の肝細胞が肝切除12時間後をピークに見られ、上記の結果を裏付けた。血中 CGRP 濃度は肝切除12時間後で有意に上昇しており、またそれと相関するように血中カルシウム濃度の有意な低下が見られた。CGRP拮抗剤を用いた動物実験では、CGRP拮抗剤投与群において70%肝切除48時間後の肝再生率に有意な低下が見られた。

研究成果の概要(英文)：

We hypothesized that the calcitonin plays an important role in the liver regeneration after hepatectomy. The mean level of CGRP gene in the remnant liver was rapidly increased at 1h after hepatectomy and this overexpression of CGRP gene persisted still 12h after hepatectomy. In the immunohistochemistry, there were many droplets in hepatocytes of 12h after hepatectomy. The serum CGRP level was significantly higher at 12h after hepatectomy, and as correlate with this, the serum calcium level was significantly lower at 12h after hepatectomy. In animal experiment used with the CGRP antagonist, the liver regeneration rate after 70% hepatectomy was significantly decreased in the CGRP group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝再生、カルシトニン、CGRP

1. 研究開始当初の背景

肝再生に関与する因子はこれまで様々なもの

が見出されている。代表的なものとしては、炎症性サイトカインであるIL-6やTNF- α 、成長因子で

ある epidermal growth factor (EGF) や hepatocyte growth factor (HGF) があげられる。また近年、胆汁中の主成分のひとつである胆汁酸 (Huang W. et al., *Science*, 2006; 312:233-6) やホルモンの一種で神経伝達物質であるセロトニン (Lesurtel M., *Science*, 2006; 312: 104-7) も肝再生に重要であるという知見が報告されている。

胆管癌や肝細胞癌ではしばしば大量肝切除を必要とするが、残肝予備能が不十分で肝再生率が不良であると術後に肝不全を併発しやすく、時として致死的になる。また手術が必要な疾患があるにもかかわらず肝機能が十分でないために大量肝切除を行えない場合もある。したがって、肝再生のメカニズムを解明することや肝再生を促進させる因子を見出すことは、大量肝切除を安全に行う上で重要な課題である。

われわれの施設では永年にわたり肝再生に関する研究を行っており、近年では女性ホルモンであるエストロゲンの肝再生における重要性を報告した (Kawai T., Yokoyama Y. et al., *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2007; 292:G582-9)。

ホルモンはわれわれの生態で様々な機能調整にかかわっており、微量でも強力な作用がある。またホルモンの作用は単一ではなく、各臓器や組織によりその作用が異なったり、宿主の状態によっても異なる作用を及ぼしたりする。肝再生においても先に挙げたセロトニンやエストロゲンだけでなく、他の未知のホルモンが関与していることは十分考えうる。

われわれは、以前の研究で、肝の門脈枝結紮モデルを用いた網羅的遺伝子解析を行い、再生肝に早期から発現する遺伝子を検討した (Yokoyama S, Yokoyama Y. et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006; 349:732-9)。

その検討のなかで、門脈枝結紮後 2 時間の時点で非結紮葉 (再生葉) に最も強く発現する遺伝子のなかに、カルシトニンに対する特異的受容体であるカルシトニンレセプターが含まれていることを見出した。さらにラットの 70% 肝切除モデルを用いて再生肝のカルシトニン遺伝子の発現を経時的に検討したところ、肝切除直後より約 2 日間にわたり、正常の約 15~20 倍の非常に強い遺伝子発現があることを見出した。これらの結果は、カルシトニンが autocrine または paracrine 的に肝再生早期に重要な作用を及ぼしていることを示唆する。

カルシトニンは 32 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、血中のカルシウム低下作用を有するホルモンである。主として甲状腺の傍濾胞細胞 (C 細胞) から分泌され、骨、腎に作用する。骨では破骨細胞表面にあるカルシトニンレセプターと結合してその機能を抑制し、骨へのカルシウム

とリン酸の沈着を促進する。この作用は副甲状腺から放出される副甲状腺ホルモンと拮抗するものである。また腎臓ではカルシウムの排出を促し、それに伴って血中カルシウム濃度が低下する。また近年カルシトニンが細胞の増殖に関与しているという報告が相次いでいる (Thomas S. et al., *Mol Endocrinol*, 2006; 20: 1894-911)。

このようにこれまでにカルシトニンに関してはさまざまな生理作用が報告されているが、肝切除後の肝再生に及ぼす影響についての検討は皆無である。本研究ではこの点に焦点を絞って実験をすすめる。

すなわち本研究では、「肝再生の促進因子としてカルシトニンが重要な働きを担う」という仮説を立てこれを検証する。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては科学研究費交付期間中に、マウスの肝切除モデルを用いて、カルシトニンの肝再生における役割をあきらかにする。またカルシトニン作用を modulate することにより、肝再生がどのように変化するかを検討し、最終的には肝再生を促進させる治療に応用可能かどうかを模索する。

そのために以下の実験を行う。

- ① 70% 肝切除モデルを用いて、再生肝でのカルシトニン、およびカルシトニンレセプターの発現の検討
- ② 肝切除後の血中カルシトニン濃度および血中カルシウム濃度の測定
- ③ カルシトニン作用抑制の肝再生におよぼす影響の検討
- ④ カルシトニン作用促進の肝再生に及ぼす影響の検討

(2) 本研究は、多数の肝切除術の臨床経験とともに肝再生に関する多くの研究を永年に渡って行ってきた申請者らの施設で立案されたものである。臨床と研究はともすれば離れ離れになりがちであるが、本研究から得られた結果は肝再生のメカニズムに新たな情報を加えるとともに、肝再生を促進させる治療への発展を期待させ、まさに臨床と研究の架け橋となりうるものである。カルシトニンという一見クラシックな響きのあるホルモンであるが、その生理作用はまだ不明な点が多い。本研究の予備実験でみられたように、再生中の肝臓ではカルシトニンの遺伝子発現が正常の 20 倍近くまで亢進している。これは従来肝再生に重要と言われている因子である IL-6, TNF- α , HGF などの発現亢進の数倍にもおよぶ。この観察結果は、肝再生にカルシトニンが何か重要な役割

を担っていることを強く示唆する。にもかかわらず、肝再生におけるカルシトニンの役割を検討した研究はほとんどなされていない。ここに本研究の独創性があると考え。もし本研究により、カルシトニンが肝再生のトリガーとして非常に重要であることが示唆されれば、血中カルシトニン濃度および血中カルシウム濃度の肝再生に及ぼす影響あるいは肝におけるカルシトニンレセプターの発現の有無が肝切除後肝再生率を予測する指標となりうる。またこれらの因子を薬物的に調整することにより、患者に至適な肝再生環境を作り上げることが可能となり、本研究の意義は極めて大きいと考える。

3. 研究の方法

(1) 本研究は3年間を研究期間とし、1年目はラット70%肝切除モデルを使用して肝臓でのカルシトニン産生、血中でのカルシトニン濃度変化の動態を検討する。われわれの予備実験では、すでに肝切除後の肝臓には早期からカルシトニン遺伝子の強い発現がみられており、肝切除後にカルシトニン産生が著しく変化することは容易に予想されるが、もし仮にカルシトニンに大きな変化が見られなかった場合は、カルシトニンと同一の遺伝子からスプライシングの過程で作られるカルシトニン関連タンパク(CGRP; calcitonin gene-related protein)についても検討してみる。CGRPはカルシトニンと並んで多くの生理作用を持つ蛋白であるが、まだその機能には不明な点も多い。カルシトニンとともにその類似体であるCGRPが肝再生に関与している可能性は十分にあると考える。

2~3年目はカルシトニンの作用をmodificationし、その影響が肝再生にどのような影響を及ぼすかを検討する。これも1年目同様に70%肝切除モデルを用いるが、もし余裕があればmortality rateが約50%のラット90%肝切除モデルを使用し、mortality rateがカルシトニンのmodificationによりどのように変化するかも検討したい。

①70%肝切除モデルを用いて、再生肝でのカルシトニン、およびカルシトニンレセプターの発現の検討

マウス70%肝切除モデルを用いて、経時的に肝臓内カルシトニンおよびカルシトニンレセプターのmRNAおよび蛋白発現をそれぞれRT-PCR, Western blottingを用いて行う。またin situ hybridization および immunohistochemistryを用いてこれらの細胞局在を検討する。カルシトニンは肝切除後の超急性期に肝臓で産生される可能性が高いため、検体採取のタイミングは肝切除後 Hx(0)、1時間 Hx(1h)、6時間 Hx(6h)、12時間 Hx(12h)、24時間 Hx(24h)、48時間

Hx(48h)、7日 Hx(7d)、14日 Hx(14d)とする。

②肝切除後の血中カルシトニン濃度および血中カルシウム濃度の測定ほか

肝切除後に経時的に血液採取および肝組織採取を行い、血中のカルシトニン濃度およびそれと血中カルシウム濃度との相関をみる。また分離還流肝 (isolated liver perfusion)のテクニックを用いて、肝臓を Krebs Hensleit buffere で還流し、還流液中に放出されるカルシトニン量を測定し、実際に肝から放出されるカルシトニン量を定量する。

③カルシトニン作用抑制の肝再生におよぼす影響の検討

カルシトニンはカルシトニンレセプターと結合し、細胞内cAMPを活性化し、さらには protein kinase A (PKA) や protein kinase C (PKC) を活性化して細胞にその作用を及ぼすことが知られている(Gao XH., et al., J Mol Endocrinol., 2004)。したがって、これらの活性を測定するとともに、cAMP-dependent PKA inhibitor (Rp-cAMPS や H89) あるいは PKC inhibitor (calphostin C など)を用いて、この経路遮断の肝再生に及ぼす影響について調べる。また、抗カルシトニン抗体の投与やカルシトニンレセプター拮抗剤を使用し、肝再生への影響もみる。

④カルシトニン作用促進の肝再生に及ぼす影響の検討

さらには肝再生を促進させる方法として、カルシトニンまたはカルシトニン+カルシウム製剤の投与を行い、外的カルシトニン投与が肝再生に上乘せ効果をもたらすかどうかも検討する。また肝再生中の肝細胞におけるPKAあるいはPKCの活性化が証明された場合には、PKA activatorである dibutyl-adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (db-cAMP) や forskolin、あるいはPKC activatorである phorbol myristate が肝再生にどのように働くかも検討する。

4. 研究成果

(1) 70%肝切除モデルにおいて、再生肝でのCGRP遺伝子の発現は、肝切除1時間後から亢進し、発現亢進は肝切除12時間後でピークに達し、48時間後まで持続した。

Western blotting では CGRP 蛋白の発現が、Hx(0)群に比べ Hx(12h)群で強く見られた。

また Immunohistochemistry では、CGRP 抗体陽性の肝細胞が肝切除1時間後から出現し始め、その後肝切除12時間後まで増加、それ以降は徐々に減少していった。

Electron microscopy では、Hx(12h)群で CGRP の分泌顆粒と思われる顆粒が多数見られた。

(2) 血中 CGRP 濃度は Hx(0)群に比べ Hx(12h)群で有意に上昇しており、またそれと関連するように Hx(12h)群で血中カルシウム濃度の有意な低下が見られた

(3) CGRP antagonist を用いた実験では、CGRP antagonist 投与群において 70%肝切除 48 時間後の肝再生率に有意な低下が見られた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)

名古屋大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80378091

(2) 研究分担者

榑野 正人 (NAGINO MASATO)

名古屋大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20237564

江畑 智希 (EBATA TOMOKI)

名古屋大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60362258

國料 俊男 (KOKURYO TOSIO)

名古屋大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60378023

(3) 連携研究者 なし

()

研究者番号：

