

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月23日現在

機関番号：10101  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659631  
 研究課題名（和文） 細胞死（オートファジー・アポトーシス）による肝再生制御メカニズムの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanism for liver regeneration by various types of cell death (autophagy and apoptosis)  
 研究代表者  
 尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)  
 北海道大学・大学院保健科学研究院・教授  
 研究者番号：80256510

## 研究成果の概要（和文）：

肝再生におけるオートファジーの役割を検討する目的で、とくに細胞の脂肪化とその易傷害性（オートファジー、アポトーシス）の観点から検討を進めた。

（1）細胞および肝臓におけるオートファジー評価法の確立。オートファジーの評価目的で、LC3、p62/SQSTM1 および電子顕微鏡写真をもちいて、その評価法を検討した。

（2）オートファジーに関連する p62/SQSTM1 蛋白質の発現調整機構の検討とアポトーシス、オートファジーおよび酸化ストレスへの影響を検討した。p62/SQSTM1 は、オートファジーあるいは PI3-K/PDK/Akt 経路により制御され、細胞傷害の抑制、酸化ストレスの抑制に積極的に関わっている可能性が示された。肝細胞において、p62/SQSTM1 は Nrf-2 活性化を通して SOD, Ref-1, Catalase などの抗酸化分子発現を高め、酸化ストレスを抑制していた。

## 研究成果の概要（英文）：

In order to examine the regulatory role of autophagy and p62/SQSTM1 in fatty liver regeneration, we studied steatotic cell death (autophagy and apoptosis) in liver/hepatocytes.

(1) Establishment of evaluation method for autophagy in cell/liver tissue. We tried to quantitatively evaluate autophagy of cells and liver tissue by expressions of LC3 and p62/SQSTM1, and electron micrograph.

(2) We studied the regulatory mechanism of p62/SQSTM1 expression and its relation to apoptosis/autophagy and oxidative stress. p62/SQSTM1 expression was regulated by autophagy specifically, not by apoptosis, but also regulated positively by PI3-K/PDK/Akt-dependent signals. p62/SQSTM1 was also involved in suppression of cellular oxidative stress and injury. In mouse liver, p62/SQSTM1 increased cellular anti-oxidative molecules such as SOD, Ref-1 and Catalase through Nrf-2 and suppressed oxidative stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：オートファジー、アポトーシス、p62/SQSTM1、Nrf-2

1. 研究開始当初の背景  
肝臓外科および肝臓移植といった医療では、肝臓の持つ本来の再生能を期待して、外科的

治療が行なわれる。したがって、切除後あるいは移植後の肝再生が十分でない場合には、肝不全に陥り、極めて重大な事態となる。も

もちろん、劇症肝炎などに対する血液浄化療法も、基本的に肝臓本来の再生を期待して行なわれている。本来の肝を再生させることは、肝臓治療の根幹といえるもので、もっとも理想的・基本的な“再生医療”とも言える。こういった考えから、我々はこれまで肝臓外科治療における種々の状況を考え、肝の障害・再生機構の解明とその制御に関して研究を行ってきた。特に、肝への外科侵襲（肝切除、肝虚血・再灌流）に対する反応を、細胞増殖、細胞成長の面から解析を行ない、肝臓（肝細胞）機能を分子生物学的に解析し、かつ生体イメージング法によりダイナミックに理解することを試みてきた。臓器の再生・機能維持には、主として細胞増殖、細胞成長がキープレイヤーと考えられており、リガンド（サイトカイン、成長因子など）刺激などにより、細胞内シグナル分子（細胞増殖に対する Jak/STAT3, 細胞成長に対する PI3-K/Pdk1/Akt）が、相互にバランスをとりながら制御することを研究・報告してきた（Hepatology 49:204, 2009; Hepatol Res 38:374, 2008; J Hepatol 48: 422, 2008; J Hepatol 43: 799, 2005, J Clin Invest 112:989, 2003）。

しかしながら、「再生開始」、「再生維持」あるいは「再生停止」の調節機構に関しては、これらの機構では十分に説明されない。我々の最近の検討で、上記の“positive control”と同様に、アポトーシス、オートファジーといった“negative control”が、肝切除直後の再生開始プロセス、維持あるいは停止プロセスに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。オートファジーは、通常は細胞の“ゴミ箱”的な機構として細胞内の余剰物を消化し、飢餓状態では消化物を新たな栄養源として供給する salvage 機構として働くことが知られている。これは、個体・臓器をストレスから守るために備わった細胞機能のひとつと考えられ、特に外科的侵襲においても何らかの役割を果たすことが推測される。肝細胞は通常静的状態にあるが、肝切除あるいは種々の傷害が契機となり、爆発的な増殖を示し元の状態に戻ろうとする。すみやかな再生の後、元の肝臓のサイズに戻ると、再生過程は終了する。肝再生には、非実質細胞（クッパー細胞など）からのサイトカインの分泌による肝細胞増殖の制御などが示唆されている。肝再生は、蛋白、遺伝子レベルで精密な制御を受けていると考えられ、これまでも精力的なメカニズム解析が行なわれてきた。しかし、遺伝子レベルでも蛋白レベルでも、これまでの肝再生の機序の解析は、細胞増殖の開始と終了の機構に重点が置かれていた。我々は、これまで肝切除後肝再生および虚血障害後の肝再生・肝保護の分子機構を研究し、Jak/STAT3 経路および PI3-K/Pdk1/Akt 経路の

肝障害抑制および再生における細胞増殖以外のユニークな役割とそのメカニズムを明らかとしてきた（Hepatology 49:204, 2009; Hepatol Res 38:374, 2008; J Hepatol 48:422, 2008; J Gastroenterol Hepatol 22; 2173, 2007; J Hepatol 43: 799, 2005; Nat Med 10:168, 2004; J Clin Invest 112:989, 2003）。これまでの様々な観察から、肝の再生はいくつかのフェーズに分かれて進行することが明らかとなった。肝切除後 48 時間以内は明らかかな細胞増殖が起こらないが、肝の速やかな再生を開始するために主として Pdk1/Akt の活性化による細胞成長が誘導される。その後、IL-6/Jak/STAT3 経路の活性化による細胞増殖が顕著となり、本格的な再生が始まる。第三相以降は、徐々に再生が進行し徐々に再生が終了する。切除直後の遅延のない物理的・機能的再生は、切除後・移植後肝不全を防ぐために、また生体の恒常性を保つために、非常に重要なプロセスである。

この重要な再生時期に、我々は非常に興味深い以下の現象を新たに観察した。①肝細胞のオートファジー機能の低下とそれに伴う p62/SQSTM1 増加、②肝細胞の一時的脂肪化、③その後のアポトーシスの出現。また、mTOR 経路抑制剤であるラパマイシン投与により、i) オートファジーの誘導、ii) 一時的な脂肪化の抑制が観察され、さらに、iii) 肝再生の抑制、iv) 代償性の活発な細胞増殖が誘導されることを確認した。ラパマイシン投与によるこの現象は、直接的な mTOR 経路抑制効果だけでは説明できず、オートファジー誘導現象から初めて説明し得ると考えられる。オートファジーの抑制は、細胞内の triglyceride の一時的な蓄積を引き起こし、オートファゴゾームのライソゾーム消化阻害は、p62/SQSTM1 の細胞内蓄積にもつながる。p62/SQSTM1 は抗酸化的に働く Nrf-2 活性を抑制することで、酸化的ストレスの発生、更にはアポトーシスにも関与する可能性がある。また、脂肪肝では肝切除後の肝細胞増殖能は若干低下するものの、それよりもアポトーシスによる強烈な細胞傷害で肝再生が抑制されることから（J Gastroenterol Hepatol, 2007 及び未発表データ）、オートファジーによる脂肪代謝制御機構の破綻が肝傷害の原因となっている可能性があり、本研究により、新たな肝再生療法の開発に非常に重要な知見が得られると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝切除直後の速やかな肝再生機序・肝傷害のメカニズムを分子レベルで解明するという学際的意義を有するのみならず、同時にオートファジーの制御による肝

切除直後の再生・代謝コントロールが、より有効な肝再生療法となり得るかどうかを検討することにある。

我々は、肝再生の極めて初期にオートファジーが一時的に停止し、オートファゴゾームの蓄積およびそれによる p62/SQSTM1 分子の増加が、初期の肝再生制御において（アポトーシスの誘導をも含めて）重要な役割を果たしていることを示唆する知見を既に得ていた。そのため、本研究申請にて、オートファジーによる、合目的的で積極的な細胞成長、脂質代謝、酸化ストレス、アポトーシスへの関与の病態・生理を解析し、“肝再生プロセスの positive/negative な揺らぎ制御機構”の一端を解明することを試みた。

### 3. 研究の方法

細胞実験によるオートファジー機能と p62/SQSTM1 機能の分子生物学的解析：

(1) 正常肝細胞および脂肪化肝細胞におけるオートファジー誘導と抑制による細胞内環境変化の解析（脂肪・糖代謝への影響）、アポトーシス誘導能の解析、酸化ストレス誘導の解析。

(2) p62/SQSTM1 発現による Nrf-2 機能解析。  
iii) オートファジー阻害により蓄積する（誘導される）新たな分子の探索と p62/SQSTM1 の機能解析。

マウス実験によるオートファジーと p62/SQSTM1 の影響の病態生理学的・分子生物学的解析：種々の KO マウス（Atg7-KO、Bax/Bak-KO）をもちいた正常肝あるいは脂肪肝の肝切除（および虚血・再灌流）モデルにおいて、光イメージングの技術を応用し、生体レベルで起こる現象の非侵襲的なイメージングによる解析を行なう。光プローブにより、①レドックス・プローブによる酸化ストレス、②カスパーゼ 3 活性化プローブによるアポトーシス、③Akt 活性化プローブによる生存能、および④細胞内 pH 感受性プローブを応用したオートファジー、これらをモニタリングし、分子生物学的解析、組織学的解析も同時に行う。また、ラパマイシンによるオートファジー誘導実験とプロテアーゼ阻害剤（ロイペプチンなど）による阻害実験を並行して行なう。また、p62/SQSTM1 RNAi アデノウイルスにより肝の p62/SQSTM1 をノックダウンし、その影響を同様に検討する。これらの検討により、肝切除・肝虚血再灌流後の肝再生におけるオートファジーおよび p62/SQSTM1 の病態生理学的な意義を検討する。

肝再生治療戦略としてのオートファジー（あるいは p62/SQSTM1）制御の検討：マウス疾患モデルを用いて、オートファジー抑制あるいは

は p62/SQSTM1 発現誘導による治療効果を検証する。

### 4. 研究成果

肝再生におけるオートファジーおよび p62/SQSTM1 の機能と役割を検討する目的で、とくに細胞の脂肪化とその易傷害性（オートファジー、アポトーシス）の観点から検討を進めた。

(1) 細胞および肝臓におけるオートファジー評価法を評価した。オートファジーの評価目的で、LC3、p62/SQSTM1 および電子顕微鏡写真をもちいて、その評価法を種々の条件下で検討した。従来、電子顕微鏡写真による形態変化の評価法がもっとも確実であると考えられていたが、我々の検討では定量的な評価は困難であった。

(2) オートファジーに関連する p62/SQSTM1 蛋白質の発現調整機構の検討とアポトーシス、オートファジーおよび酸化ストレスへの影響を検討した。p62/SQSTM1 分子発現調整には、Insulin/HGF 刺激による PI3-K/PDK/Akt 経路の活性化が必須であり、これにより p62/SQSTM1 の転写活性が上昇した。オートファジーにより non-transcriptional にも上昇するが、通常状態ではこの経路による刺激が重要と考えられた。興味深いことに、脂肪肝などでは p62/SQSTM1 発現は低下しており、これが直接の原因となって Fas-L の増強、ARE 活性の低下が引き起こされていた。この事実は、p62/SQSTM1 がオートファジーあるいは PI3-K/PDK/Akt 経路により制御されているが、細胞傷害の抑制、酸化ストレスの抑制に積極的に関わっている可能性を示していた。肝細胞において、p62/SQSTM1 は Nrf-2 活性化を通して SOD, Ref-1, Catalase などの抗酸化分子発現を高め、酸化ストレスを抑制していた。脂肪肝以外にも何らかの原因で、p62/SQSTM1 の発現が低下すると、Nrf-2/Keap-1 に依存する抗酸化のシステムが機能せず、細胞は酸化ストレスを受けやすくなると考えられた。今後、p62/SQSTM1 とオートファジーの評価の検討に関しては、従来の評価法に加えて、新たな手法の開発を行なう予定である。LC3 などのマーカーとの併用、電子顕微鏡写真との併用などを考えて、より正確な評価法を検討する。また、オートファジーの機能が細胞死にまで至る場合（オートファジー死）の病態生理における意義、臨床的意義に関して、様々な疾患モデルをもちいて検討していく。p62/SQSTM1 分子に関しては、肝細胞を含めて、脂肪化以外での病態的な意義を検討していく必要がある。とくに、この分子が、細胞内の抗酸化機構におけるキーとなる分子の可能性があり、p62/SQSTM1 がどのような状態で

低下し、抗酸化ネットワークが破綻するの  
かを検討していく。そのために、臓器特異的な  
p62/SQSTM1 のノックアウトマウスあるいは  
トランスジェニックマウスなどの作製ある  
いはそのような薬剤と病態生理への影響を  
検討していく。

#### 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 4 件)

1. Chun Wu, Ke-Yong Wang, Xin Guo, Masanori Sato, Michitaka Ozaki, Shyohei Shimajiri, Yoshihiro Ohmiya, Yasuyuki Sasaguri. Rapid Methods of Detecting the Target Molecule in immunohistology using a Bioluminescence Probe. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*. 査読有 2013: 28(1): 38-438.
2. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Takeaki Ozawa. In vivo monitoring of liver damage by caspase-3 probe. *Theranostics*. 査読有 2(2)、2012、207-214.
3. Masatoshi Takeiri, Miyuki Tachibana, Ayumi Kaneda, Ayumi Ito, Yuichi Ishikawa, Shigeru Nishiyama, Ryoichi Goto, Kenichiro Yamashita, Susumu Shibasaki, Gentaro Hirokata, Michitaka Ozaki, Satoru Todo, and Kazuo Umezawa. Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone. *Inflammation Research*. 査読有 60、2011、879-888.
4. 尾崎倫孝、芳賀早苗、森田直樹、深井原、藤堂省、小澤岳昌、近江谷克祐：移植臓器の非侵襲的モニタリング法の開発 *Organ Biology* 査読有 18(1)、2011、134-140.

[学会発表] (計 9 件)

1. 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、梅澤 一夫、藤堂 省、尾崎 倫孝：「p62/STSQM1 plays a central role in liver injury in steatotic liver during

regeneration.」 第 85 回日本生化学会  
大会、2012.12.6、福岡国際会議場・マ  
リンメッセ福岡

2. 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、阿部 理一郎、藤堂 省、尾崎 倫孝：「虚血/再灌流傷害における高血糖および脂肪化病態肝の反応性の相違」 第 19 回肝細胞研究会、2012.6.29-30、札幌医科大学臨床教育研究棟講堂
3. N. Morita, S. Haga, T. Ozawa, S. J. Remington, M. Ozaki: "Bio-imaging of surgical stress: Dynamic analysis of liver oxidative stress and damage" 17th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (ISBC2012) 2012.5.28-6.2 Delta Guelph Hotel & Conference Centre, Guelph, Ontario, Canada
4. 尾崎倫孝：「生体イメージング法による細胞・臓器のリアルタイム評価法の開発」第 38 回日本臓器保存生物医学学会学術集会 江陽グランドホテル (仙台) 2011.11.25-26
5. Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Kaikobad Irani, Naoki Morita, Yoshimi Kaneshima, Takeaki Ozawa: Age-associated p66Shc induced redox-dependent liver damage and impaired regeneration after hepatectomy in aged mice. 62th Annual meeting of AASLD, San Francisco, USA, 2011.11.4-8 (Moscone West Convention Center)
6. 芳賀 早苗、森田 直樹、青山 貴子、小澤 岳昌、Remington S. James、阿部理一郎、尾崎倫孝：「脂肪肝における Fas 過剰発現および細胞内酸化的ストレスによる肝再生不全の検討」第 84 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2011.9.21-24
7. M. Ozaki, S. Haga, T. Ozawa, N. Morita, Y. Kaneshima, J. Remington. Bio-imaging of Surgical Stresses-Dynamic Analyses of Liver Oxidative Stress and Damage. 5<sup>TH</sup> European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering Budapest Congress & World Trade Center, Budapest, Hungary 2011.9.14-18

8. Sanae Haga, Toshiaki Takezawa, Takeaki Ozawa, James Remington, Naoki Morita and Michitaka Ozaki: 'Collagen Vitrigel Sheet' as a Novel Drug Delivery Bio-material. 5<sup>TH</sup> European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering Budapest Congress & World Trade Center, Budapest, Hungary 2011.9.14-18
9. 芳賀 早苗、森田 直樹、小澤 岳昌、レミントン ジェームズ、尾崎 倫孝: 「脂肪肝における肝再生不全機序の解析」第18回肝細胞研究会 東京ガーデンパレス 2011.6.24-25

[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

尾崎 倫孝 (OZAKI MICHITAKA)  
北海道大学・大学院保健科学研究所・教授  
研究者番号：80256510