

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 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791516

研究課題名（和文）阻血障害肝切除後の転写因子活性抑制に伴う肝再生遅延機序への Pin1 の関与の検討

研究課題名（英文）Pin1 is decreased in ischemically damaged liver and suppressed liver regeneration after hepatectomy through the inhibition of Pin1-mediated NF-kappaB activation in hepatocytes.

研究代表者

久保木 知（KUBOKI SATOSHI）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50571410

研究成果の概要（和文）：高度障害肝では Pin1 発現が低下するため、MIP-2 発現は増強するにも拘らず、NF-kappaB 活性は低下し、肝再生が抑制された。しかし、軽度障害肝では Pin1 発現が維持されるため、MIP-2 発現増強に伴い NF-kappaB 活性は亢進し、肝切除後の肝再生が促進した。*In vitro*でも、正常肝細胞と比べて軽度障害肝細胞では Pin1 発現は維持され、MIP-2 刺激により肝細胞増殖シグナルは促進するが、高度障害肝細胞では Pin1 発現低下に伴い NF-kappaB 活性は抑制され、肝細胞増殖シグナルも抑制された。これより、術後障害肝の肝再生抑制には Pin1 発現低下に伴う NF-kappaB 活性抑制が関与することが示された。よって、術後の肝細胞内 Pin1 発現の維持が、術後肝再生抑制に伴う肝不全に対する有用な治療法となり得る。

研究成果の概要（英文）：Pin1 was degraded in severe damaged liver, therefore, regeneration was suppressed through decreased activation of NF-kappaB. In contrast, Pin1 expression was maintained in mild damaged liver. Therefore, Pin1 bound to NF-kappaB-p65 and generated Pin1-NF-kappaB-p65 complex. This complex activated NF-kappaB and induced liver regeneration. Moreover, cell proliferation was inhibited in severe damaged hepatocyte induced by H2O2 stimulation *in vitro*, through decreased expression of Pin1 and Pin1-NF-kappaB-p65 complex and decreased activation of NF-kappaB. In conclusion, Pin1 is an important endogenous regulator of liver regeneration in severe damaged liver, and is a potential therapeutic target for liver failure after extended hepatectomy.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

肝臓外科手術の際には、手術操作に伴う肝阻血再還流 (ischemia/reperfusion: I/R) 障害に起因する肝再生抑制が肝不全死を引き起こしうる。肝 I/R 障害では、肝再生促進因子として知られる炎症性 mediator の産生は増加するにもかかわらず、肝切除後の肝再生は抑制される。肝 I/R 障害の機序を検討した報告は数多くあるが、I/R 障害肝における肝再生抑制の機序を分子生物学レベルで検討した報告はほとんどない。我々は、以前、肝細胞における Pin1 を介した NF-kappaB 及び STAT3 活性亢進が肝再生を促進すると報告した (Hepatology 2008, J Hepatol 2009)。

2. 研究の目的

マウスでの I/R 障害肝の肝切除モデルを用いて、I/R 障害肝における肝再生促進因子に対する不応性発現の機序を解明し、拡大肝切除術や肝移植術に伴う肝 I/R 障害に起因する肝不全を回避するための治療法を追及することを目的

3. 研究の方法

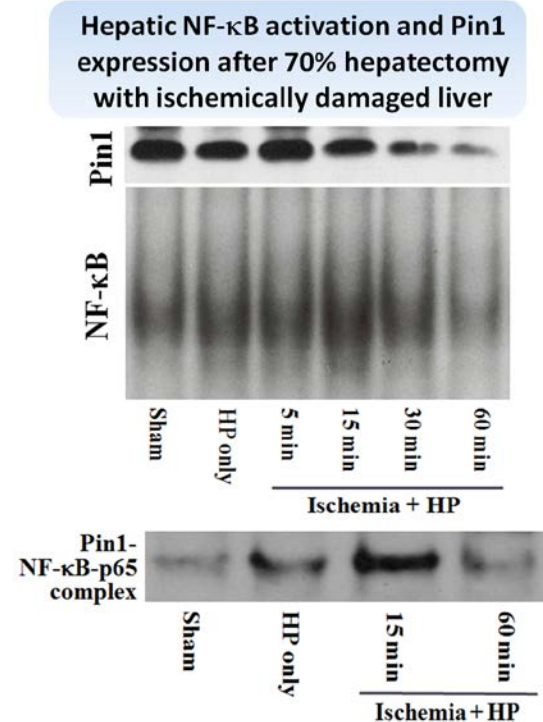
- (1) マウスにおいて I/R 障害肝の 70%肝切除モデルを作成。肝阻血時間の違いによる様々な程度の I/R 障害モデルでの肝切除後の肝再生を評価し、肝組織中の肝再生促進因子や Pin1 の発現、NF-kappaB や STAT3 の活性化を測定する。さらには Pin1-NF-kappaB-p65 complex 発現を評価したり、抗 Pin1 抗体投与モデルを用いて、Pin1 の肝切除後肝再生への関与を解明する。
- (2) 酸化ストレス障害肝細胞の *in vitro* モデルを作成。障害肝細胞における肝再生促進因子や Pin1 の発現や NF-kappaB の活性化を肝細胞レベルで評価して、障害肝細胞の肝再生促進因子に対する不応性発現の機序を追求する。そして、Pin1 inhibitor を用いて、Pin1 の肝細胞増殖への関与を検討する。
- (3) 肝癌手術症例における Pin1 発現と予後との関係性を評価し、肝癌細胞株における Pin1 inhibitor の効果を検討することによって、肝細胞増殖への Pin1 による NF-kappaB 活性への関与を検討する。

4. 研究成果

(1) 阻血再還流 (I/R) 障害肝における肝再生促進因子に対する不応性発現の機序を解明するために、I/R障害肝の70%肝切除マウスモデルを作成。肝切除96時間後の残肝重量にて肝切除後の肝再生を評価すると、正常肝に比べて

軽度障害肝では肝再生は亢進したが、高度障害肝では肝再生は著名に抑制された。PCNA免疫染色にて肝細胞増殖シグナルを評価したところ、正常肝に比べて軽度障害肝ではPCNA発現が増強していたが、高度障害肝ではPCNA発現が著名に減弱していた。しかし、肝再生促進因子として知られるCXC chemokine発現は高度障害肝で著名に増加しており、高度障害肝における肝再生促進因子に対する不応性の発現が示唆された。

肝切除後の肝再生にはCXC chemokineによるNF-kappaB活性亢進の関与が必要なため、当モデルでのNF-kappaB活性を評価したところ、正常肝に比べて軽度障害肝では活性の亢進を認めしたが、高度障害肝では活性の著名な抑制を認めた。我々は以前、I/R障害肝におけるNF-kappaB活性亢進にはPin1とNF-kappaB-p65との複合体形成が必要であることを報告した。よって、当モデルでのPin1発現を評価すると、正常肝に比べて軽度障害肝ではPin1発現は維持されていたが、高度障害肝ではPin1発現は著名に低下していた。また、Pin1-NF-kappaB-p65複合体の発現は、正常肝に比べて軽度障害肝で亢進していたが、高度障害肝では著名に抑制されていた。

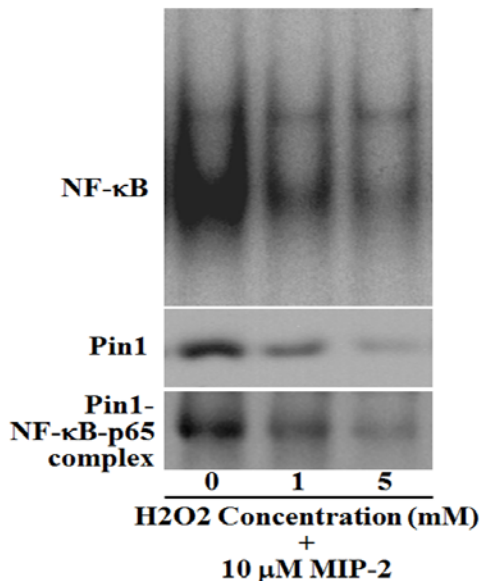
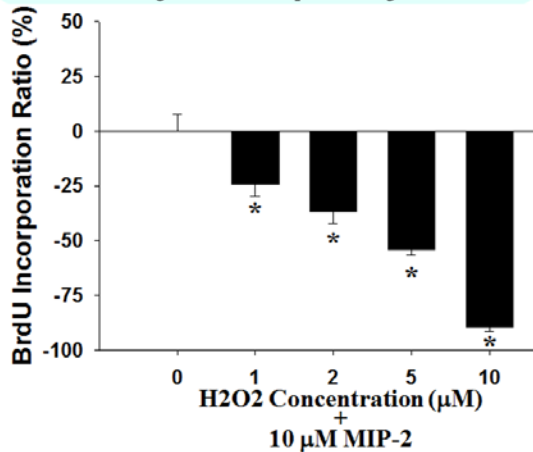


さらにはCXCR1&2 antagonistであるRepaertaxinを軽度障害肝モデルに投与したところ、軽度障害肝における肝再生促進作用は消失した。よって、軽度障害肝におけるCXC chemokine発現増強がPin1を介したNF-kappaB活性亢進を促して、肝切除後の肝再生を促進させることが示唆された。

(2) 高度阻血障害肝細胞におけるCXC chemokine等の肝細胞増殖促進因子に対する不応性発現機序を、マウス正常肝細胞のcell lineであるAML-12 cellを用いて *in vitro*にて検討した。CXC chemokine投与により、用量依存性に肝細胞増殖シグナルは亢進した。また、その増殖シグナルはCXCR1&2 inhibitorであるrepertaxinや、NF-kappaB inhibitorであるBAY11-7085により抑制された。

次にH2O2刺激により酸化ストレス障害肝細胞

Decreased NF- κ B activation on injured hepatocytes



胞モデルを作成し、CXC chemokineによる肝細胞増殖シグナルを検討したところ、障害の程度に応じて増殖シグナルは抑制された。また、高度障害肝細胞では CXC chemokine投与による肝細胞増殖シグナルは消失した。

その原因として NF-kappaB活性に着目した。H2O2濃度による肝細胞障害の程度に応じて、Pin1発現は低下し、それに伴い Pin1-NF-kappaB-p65複合体形成及び NF-kappaB活性は抑制された。さらには、Pin1 inhibitorであるJuglone投与により、用量依

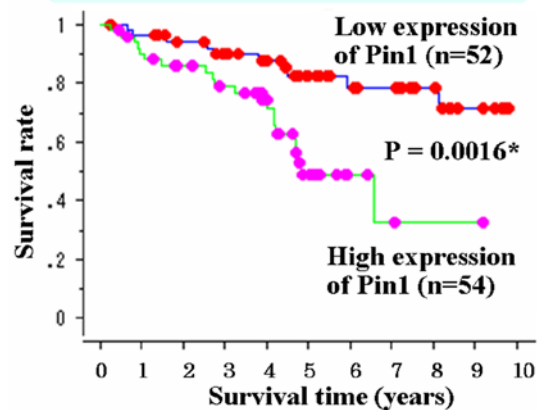
存性に Pin1- NF-kappaB-p65複合体形成及び NF-kappaB活性は抑制された。

これらに結果より、高度障害肝における肝細胞中のPin1発現低下が肝細胞中の NF-kappaB活性抑制を引き起こし、その結果として肝細胞増殖が抑制されると考えられた。

(3) Pin1によるNF-kappaB活性亢進の機序は癌でも成り立つとの予測のもと、HCC cell lineであるHep G2 cellをPin1 inhibitorであるJugloneで刺激すると、用量依存性に NF-kappaB活性は抑制され、それに伴い腫瘍細胞増殖も抑制された。

さらに、臨床検体を用いて、初回肝切除後の予後を検討したところ、Pin1高発現群ではPin1低発現群と比較して、有意に予後不良であった。また、Pin1高発現群では肝細胞癌におけるNF-kappaB活性が亢進している傾向を認めた。

Overall survival after surgery



(4) 以上より、高度障害肝における肝細胞増殖促進因子に対する不応性発現に伴う肝切除後の肝再生抑制の原因として、Pin1発現低下による NF-kappaB活性抑制が考えられるため、拡大肝切除術後や肝移植術後において肝細胞内のPin1発現を維持することが、術後肝不全を予防するための有用な治療法となり得る。また、Pin1はHCCにおける癌細胞増殖にも関与しており、Pin1は有用な分子標的治療としてのターゲットとなり得ると考えられた。

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2件)

1. Kuboki S, et al. Chylous Ascites After Hepato-Pancreato-Biliary Surgery. Br J Surg 100 (4):522-527;2013..

2. 久保木 知、他。「炎症と消化器癌」肝における PPAR-gamma 活性亢進に伴う抗炎症作用の解明及び肝細胞癌における PPAR-gamma

発現の意義。 消化器内科
54(6):739-743;2012.

久保木 知 (KUBOKI SATOSHI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 50571410

〔学会発表〕(計7件)

1. Kuboki S, et al. Pin1 is decreased in ischemically damaged liver and suppressed liver regeneration after hepatectomy through the inhibition of Pin1-mediated NF-kappaB activation in hepatocytes. 48th EASL 2013 (Oral e-poster session 選出), 2013/4月, Amsterdam, Netherlands.

2. Kuboki S, et al. Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on tumor growth in human hepatocellular carcinoma: Usefulness as a prognostic predictor and therapeutic target. DDW 2013 (Poster session), 2012/5月, San Diego, USA.

3. 久保木 知, 他。「阻血障害肝切除後の転写因子活性抑制に伴う肝再生遅延機序への Pin1 の関与の解明及びその対策」第113回日本外科学会総会 (パネルディスカッション) 2013/4月

4. 久保木 知, 他。「肝での Pin1 を介した NF-kappaB 活性と PPAR-gamma 活性の均衡調節による酸化ストレス制御及び抗 Pin1 抗体の肝細胞癌に対する腫瘍増殖抑制機序の解明」JDDW 2012 (パネルディスカッション) 2012/11月

5. 久保木 知, 他。「肝細胞癌における抗 Pin1 抗体の NF-kappaB 活性抑制と PPAR-gamma 活性亢進を介した腫瘍増殖抑制機序の解明及び分子標的治療薬としての可能性の追求」第67回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ) 2012/7月

6. 久保木 知, 他。「拡大肝切除及び肝移植術後の阻血障害肝再生抑制に伴う肝不全発生机序の解明及びその対策」第112回日本外科学会総会 (サージカルフォーラム) 2012/4月

7. 久保木 知, 他。「肝における PPAR-gamma 活性亢進に伴う抗炎症作用の解明および肝細胞癌における PPAR-gamma 発現の意義の検討」JDDW 2011 (シンポジウム) 2011/11月
〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者