

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659598

研究課題名(和文)肝ストレスの動的解析による肝機能障害・予備能の評価

研究課題名(英文)Evaluation of liver injury and function by dynamic analysis of stresses

研究代表者

佐藤 直樹 (Satou, Naoki)

北海道大学・大学病院・准教授

研究者番号：70205946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：(1)生体レベルで肝へのストレス評価を種々のストレス・マーカーに対する分子機能プローブを作製した。レドックスに感受性のあるGFPプローブを作製した。小胞体ストレスにたいするプローブの作製を行った。細胞死を示す新たなプローブの作製に成功した(ネクロプトーシス)。生存能を示すプローブ(リン酸化Akt)の作製を試みた。pH感受性プローブを示すプローブの作製に成功した。(2)それらを細胞実験により検討し、その有効性を確認した。(3)、¹に関して、小動物実験も行い、生体レベルでの有効性を確認した。

研究成果の概要(英文)：We have developed 5 optic probes to evaluate liver stresses targeting intracellular molecular markers and pH. 1. a redox-sensitive mutant GFP (roGFP) probe for oxidative stress, 2. an optic probe for ER stress, 3. an optic probe for cell death (necroptosis), 4. an optic probe for cell viability (Akt phosphorylation), 5. an optic probe for cellular pH. We have checked efficacy of these optic probes in liver cells. As for a roGFP probe and a pH-sensitive probe, we have checked usefulness of these probes in vivo, by using mice models.

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：光プローブ 小胞体ストレス 細胞死 pH 生体イメージング

1. 研究開始当初の背景

わが国では、メタボリックシンドローム患者の増加にともない国民健康に重大な問題を引き起こしている。平成20年度4月より特定健診が始まり、国をあげてのメタボリックシンドローム克服が期待される中で、メタボリックシンドロームの病因解明が進められている。メタボリックシンドロームの病態理解が進むにつれ患者数は急増し、これまでは見過ごされていた術後合併症への影響が注目されてきている。とくに、メタボリックシンドロームには、肝へのストレスが主要な病因のひとつであるのに加えて、肝の脂肪化、インシュリン抵抗性を伴うために、肝易傷性、再生能低下への影響が懸念されている。そのため、そのメタボリックシンドロームにおける各臓器レベルでの病態解明と(とくに外科的)治療面での検討が緊急課題となってきた(*Surgery for Obesity and Related Diseases*, 1:245; 2005, *Current Opinion in Lipidology*. 16:421;2005)。メタボリックシンドロームの主な病因としてインスリン抵抗性の存在が指摘されているが、肝におけるさまざまなストレスこそが、個体におけるインスリン抵抗性の要因である可能性が示唆されている。実際に、メタボリックシンドロームを引き起こす肥満が、肝における酸化ストレス・虚血・小胞体ストレスなどのさまざまなストレスを引き起こし、肝糖脂質代謝障害を誘導することによりインスリン抵抗性を発症することが報告されている(*J Clin Invest*. 15:1752;2004 など)。また、糖・脂肪代謝に関与する細胞内現象も注目されており、酸化ストレス、オートファジー、アポトーシス等の病態との関連・重要性が示唆されている。また、外科治療技術の向上により、高齢者における外科治療が一般化してきた。術前・術後の患者管理、術中麻酔・呼吸管理により、手術に伴う合併症は格段に減少した。また、術前の臓器機能の評価法も充実してきている。しかしながら、高齢者における外科治療に関しての分子生物学的な病態解析とストレスによる機能への影響(許容能)は十分に理解されておらず、経験的な理解(判断)から手術されていることが多く、またそのリスクファクターも明らかではない。肝臓は、脂肪組織・中枢神経をはじめとした様々な臓器と相関して生理的恒常性を維持しているが、それゆえに肝臓は様々なストレスに関して大いに寛容であり、許容能を有している。しかしながら、その限界を超えた場合には全肝臓として機能不全に陥り、個体の生命を脅かす。したがって、「許容される肝へのストレスを正確に解析し、その限界を非侵襲的に知る(あるいは術前後に知る)ことは、これからの外科治療のQOLを向上させる上で非常に重要な課題である」と考えられる。外科領域での治療では、こういったストレス

下にある肝(脂肪肝、糖尿病状態下あるいはインシュリン抵抗性にある肝、加齢肝)は、外科的ストレスに対して極めて敏感となっており、術後肝機能不全・再生不全、術後感染症、敗血症に直接関与すると考えられる。すなわち、メタボリックシンドロームに陥った患者あるいは高齢患者における肝へのストレスが、肝の基本的機能にどういった影響を及ぼすか、さらにはそれが外科治療(の経過・結果)にどの程度の影響を及ぼすか否かを、個々の個体レベルで非侵襲的に知ることは、今後更に医療の質、患者の治療後のQOLを求められる医療現場における重要なテーマのひとつと考える。

2. 研究の目的

我々は、これまで肝の障害および再生の分子メカニズムを長年検討してきており、また肝細胞内における分子レベルでの糖・脂肪代謝制御機構を研究してきた(*J Hepatol* 48; 422-432, 2008, *Nat Med* 10(2): 168-174, 2004, *J Clin Invest* 112:989-998, 2003, *生化学(総説)* 80:399, 2008, *Hepatology*: 49:204-214, 2009, *Lab Invest*, 90, 1718-1726, 2010.)

これらの研究結果をもとに、以下を検討する。(1)メタボリックシンドローム・加齢が及ぼす肝へのストレスと肝細胞および機能への影響を解析し(分子生物学的解析)(2)「外科侵襲」に対する肝の反応性低下の基盤にある病態を様々な細胞内イベントの観点から検討する(生化学的解析)(3)我々が新たに開発した光イメージング法により、肝へのストレスと反応を生体レベルでダイナミックにとらえ(光プローブによる動的解析)、外科治療へのリスクファクターを解析する。

光イメージング法による同一個体における経時的ストレス反応の解析は、試みはこれまで行なわれたことがなく、生化学、分子生物学的知見を実際の生物個体の中で検証・評価するものである。これらは非常にユニークであるため、将来臨床の場において有用な情報を与えるためのツール作製を試みるのが目的である。

3. 研究の方法

平成24年度は、主としてプローブの作製とその検証実験、正常なマウスを用いた小動物実験による実験(ストレスに対する急性反応をみるための実験)を行なう。平成25年度以降は、疾患モデルを用いた実験を行ない、ストレスに対する急性・慢性反応をみるための実験を行なう。生化学的な検討結果とあわせて、メタボリックシンドロームあるいは加齢における肝臓への外科的侵襲が肝再生機

能にどのように影響するかを総合的に検討し、肝のストレス応答に対して、外科侵襲がどのように影響しているかを検討する。

(1) 生体レベルで肝へのストレス評価を種々のストレス・マーカーに対する分子機能プローブの作製。

酸化ストレスを示す発光プローブの作製: レドックス感受性 GFP を利用するか (GFP の chromophore の近傍の cysteine に対する mutation) あるいはルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを修飾することにより発光プローブを開発する。プロトタイプは既に完成している。

小胞体ストレスに対するプローブ (CHOP あるいは PERK に対する発光による機能プローブを作製する): CHOP に対するプローブは完成しており、現在 AML12 肝細胞に安定導入している。

細胞増殖能を示すプローブ (リン酸化 STAT3 又は二量体 STAT3 に対する光プローブを作製)。

細胞死・生存能を示すプローブ (リン酸化 Akt に対する光プローブ、アポトーシス、ネクロトーシスに対するプローブの作製)。

pH 感受性プローブ・オートファジーを示すプローブ (pH に依存してコンフォメーション変化を起こす分子に対して、ルシフェラーゼ再構成法を応用して作製する)。

(2) 細胞実験: 細胞ストレス実験による上記プローブの機能の特異性およびシグナル強度の検証

上記のプローブ作製後、マウス非腫瘍性肝細胞株 (AML12 細胞) をもちいて、プラスミドにより transient transfection により細胞内に導入して、プローブの有効性を確認する。生体レベルでは、刺激によりベースラインのシグナル強度の 5 - 10 倍のシグナルを発する必要がある、細胞レベルでの検討により、必要に応じてプローブのデザインを再検討する。

細胞実験におけるストレスとしては、以下の実験を検討する。酸化ストレス、低酸素、高グルコース・ストレス、senescence (細胞老化: 細胞継代実験により行なう)。

(3) 上記検証実験にて、十分な特異性とシグナル強度をもつプローブに対しては、小動物 (肝臓) に導入するために、これらベクターをアデノウイルス・ベクターに組み込む。アデノウイルス・ベクターに組み込まれたプローブをマウス肝に一時的に導入することで、種々の病態における肝へのストレスを、生体イメージングにより生きたままの状態を経時的にフォローすることが可能となる (急性反応実験)。

(4) 小動物実験による肝へのストレス評価法の確立: 生化学的手法および作成したプローブによる種々の侵襲にたいする肝ストレスの評価

これまでの段階で作成され、アデノウイルス・ベクターに組み込まれたプローブを、個々にマウス肝に導入し、それぞれのプローブのアクセシビリティ目的にあった種々のストレス刺激を加えて、プローブ機能を生体レベルで確認するとともに急性ストレスの評価を行なう。肝切除後の肝再生および肝虚血・再灌流障害のモデルをもちいて、これらの侵襲に対する肝の急性ストレスを経時的に観察・評価する。

4. 研究成果

(1) プローブのデザインと作製および細胞実験による検証

酸化ストレスを示す発光プローブ (roGFP) の作製に成功した。このプローブをアデノウイルスベクターに組み込み、細胞レベルでの検証実験を行い、十分なシグナルを得た。

小胞体ストレスに対するプローブ (CHOP あるいは PERK に対する発光プローブを作製した): CHOP に対するプローブは十分効果的であり、AML12 肝細胞に安定導入した。PERK に対するプローブは、S/N 比が十分でなく、改良が必要であった。

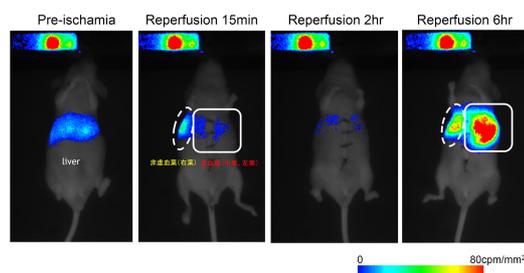
細胞増殖能を示すプローブ (リン酸化 STAT3 又は二量体 STAT3 に対する光プローブを作製)。現在も作製中である。

細胞死・生存能を示すプローブ (リン酸化 Akt に対する光プローブ、アポトーシス、ネクロトーシスに対するプローブの作製)。アポトーシスおよびネクロトーシスに対する光プローブはともに完成した。細胞実験にて、十分なシグナル強度が得られており、一部小動物実験に進んでいる。

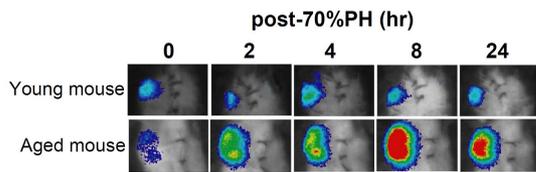
pH 感受性プローブを示すプローブ (pH に依存してコンフォメーション変化を起こす分子に対して、ルシフェラーゼ再構成法を応用して作製した)。

細胞実験では、十分なシグナルが得られ、in vivo での有用性が示唆された。

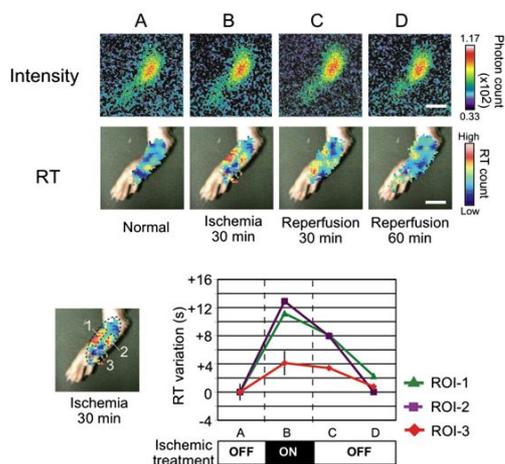
(2) 小動物 (マウス) による実験
Caspase-3 に対する光プローブに関しては、マウス実験を行い、肝虚血後再灌流時のストレスの可視化に成功している (下図: 点線・実線部分がそれぞれ非虚血・虚血肝のストレスを示している。虚血肝において、再灌流後ストレスがかかっていることが分かる。)



下図は、20月齢以上の加齢マウスの肝再生時の Caspase-3 活性イメージングであるが、加齢肝でストレスがかかっていることがわかる。



また、細胞内 pH 測定用プローブに関しては、アデノウイルスベクターにてマウス後肢に導入し、虚血・再灌流による pH の変化を可視化することに成功した(下図)。



今後、上記以外の光プローブも順次小動物実験にて、その有用性を検証する予定である。

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 3 件)

- Mitsuru Hattori, Sanae Haga, Hideo Takakura, Michitaka Ozaki & Takeaki Ozawa. Long-time Accurate Recording of Intracellular Acidification in Living Tissues with a Photo-controllable Bioluminescent Protein. Proc. Nat. Acad. Sci. USA PNAS. 110 (23) : 9332-9337, 2013、査読有
- Hongjiang Qiao, Riichiro Abe, Nao Saito, Yasuyuki Fujita, Sanae Haga, Chun Wu, Yoshihiro Ohmiya, Michitaka Ozaki, Hiroshi Shimizu. A Method for Intravital Monitoring of Human Cells Using a Far-Red Luminescent Probe in Graft- Versus- Host Disease Model Mice.

Journal of Investigative Dermatology . 133:841-843, 2013、査読有

- Michitaka Ozaki, Sanae Haga, Takeaki Ozawa. In vivo monitoring of liver damage by caspase-3 probe. Theranostics . 2(2):207-214, 2012、査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- 森田 直樹、芳賀 早苗、関 弥生、樋口 三保、呉 純、尾崎 倫孝、近江谷 克裕：分泌型ルシフェラーゼを用いた腫瘍細胞進展のモニタリング 第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- 尾崎 倫孝：「肝再生における分子メカニズムの解析」 第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日-2013 年 4 月 13 日、福岡国際会議場 (福岡市)
- S.Haga, H. Inoue, A. Kano, X. -Y. Fu, K. Terui, M. Ozaki: STAT3 plays a pivotal role in cell adhesion in mouse hepatocytes by regulating E-cadherin expression. 25 th European Congress of Pathology, Prague, 2012.9.8-12, Prague Congress Centre , (Prague, Ceskoslovensko)
- Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Michitaka Ozaki : Bioluminescent imaging of hepatic caspase-3 activity in mice. 第 14 回国際組織細胞化学会議、2012 年 8 月 26 日-2012 年 8 月 29 日、国立京都国際会館 (京都市)
- 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, Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 直樹 (SATOH NAOKI)
北海道大学・北海道大学病院・准教授
研究者番号：70205946

(2)研究分担者

芳賀 早苗 (HAGA SANAE)

北海道大学・大学院保健科学研究院・研究員

研究者番号：60706505

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

(3)連携研究者

なし