

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659601

研究課題名(和文)肝再生および肝障害におけるずり応力とカベオラのメカニズムの研究

研究課題名(英文)The research of mechanisms between shear stress and caveola in the liver regeneration and liver injury

研究代表者

佐藤 好信(Sato, Yoshinobu)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20313538

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)：昨年度研究機関が移動となったため、当初予定の実験を組むことができなくなってしまった。そこでCaveolin-1とPAI-1の肝における役割を包括的に解明するため、再生肝、脂肪肝炎、大腸癌肝転移、肝細胞癌について臨床病理学的検討を行い、肝における再生、癌化、炎症、癌浸潤転移のメカニズムを解明することとした。まずこれまでの肝転移切除70症例や肝切除例の切除前後の標本を採取した。caveolin-1, PAI-1, MT1-MMP, Ki67, CD44をパイロット症例を選択し免疫染色した。大腸癌5型において肝転移巣と原発巣のPAI-1の発現が増強している興味ある知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Last year, I changed my work location from Niigata Univ. to Showa Univ. Therefore, I could not perform the scheduled program. We intended to investigate comprehensively about a role of Caveolin-1 and PAI-1 in the liver. The clinicopathological analyses were made in the regenerative liver, steatotic liver, metastatic liver, and primary hepatocellular carcinoma and the mechanisms of regeneration, carcinogenesis, inflammation, and cancer metastasis were studied. Pilot study by immunological staining of the metastatic liver of colon cancer with caveolin-1, PAI-1, MT1-MMP, CD44 were performed. I could recognize the interesting findings that both the specimen of metastatic liver and primary colon cancer in Type 5 of colon cancer revealed the augmentation of PAI-1 staining.

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 癌化 転移 ずり応力 caveolin-1 PAI-1 脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

肝切除後肝再生は、四塩化炭素の肝障害と違い stem cell が関与しない再生として、肝障害のない肝再生であると Fausto によって分類された。しかし障害のない再生はあり得ず、なにが再生のトリガーとなり自然に収束するのが一つの大きなテーマであった。我々は血管内皮細胞の再生のトリガーとなっている shear stress に注目した。血管内皮細胞に対する単純な物理的なずり応力である shear stress がトリガーとなり再生が開始する shear stress theory を提唱した (Surg. Today 1997;27:518, Surg.Today 1999;29:1)。実際に分離培養肝細胞に shear stress を加えるとマトリックス関連で再生の早期に重要な働きをすると報告されている PAI-1 mRNA の発現が増強し、その産生もずり応力に比例して増加することを安藤らとの共同研究で報告した (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 ;291:G26-34)。この肝細胞の再生においてこのずり応力を感知する門脈圧センサーが存在するのではないかと考えた。実際安藤らは、単純な物理的な力である shear stress が、内皮細胞の応答のなかで、1.形態変化、2.生理活性物質の産生、3.抗血栓活性、4.遺伝子発現の変化に深く関わっていることを報告している。さらに内皮細胞に shear stress の情報を細胞内に伝達する感知機構の存在が提唱されてきている。内皮細胞に shear stress を加えるとその1点からカルシウムの脱分極が起こり細胞の再生が起こる。このように shear stress の情報伝達にカルシウム・シグナリングを介した機構が存在する。そして caveolae(カベオラ)がその機構を担っている可能性を報告している (J Cell Sci 2002;115:475, Am J Physiol Heart Circ Physiol 2007;293:H1646)。血管内皮細胞には1個のカベオラが存在しているが、再生能力がさかんな肝細胞には複数のカベオラが存在している。肝における再生、癌化、炎症、癌浸潤転移のメカニズムに関与していることも報告されている。

2. 研究の目的

肝再生研究は、古くて新しいテーマである。そのメカニズムは多くの研究者によって明らかになってきている。我々は肝切除後の肝再生メカニズムについて、shear stress(ずり応力)がそのトリガーになっていることを世界で初めて提唱した。また培養肝細胞に shear stress をかけることにより、matrix 関連遺伝子である PAI-1mRNA が重要な働きをすることを報告した。そしてまた血管内皮細胞に shear stress をかけることにより内皮細胞のカベオラ分子から脱分極を起こし細胞再生を起こすことが解っており、カベオラが内皮細胞再生のトリガーとなっているこ

とが解ってきた。本研究ではカベオラが豊富にある肝細胞における shear stress と肝細胞再生と肝障害のメカニズムを解明することである。血管内皮細胞には1個のカベオラが存在しているが、再生能力がさかんな肝細胞には複数のカベオラが存在している。我々はこの肝細胞におけるカベオラが、肝再生において大きな役割を果たしていると考えている。本研究ではカベオラが豊富にある肝細胞における shear stress と肝細胞再生と肝障害のメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

まずラット初代肝細胞培養細胞を用い、カベオラの重要な構成要素であるカベオリン-1を免疫染色、immunofluorescence microscopy にてその局在を同定する。さらに流れ付加装置で shear stress を付加し、ストレス加肝細胞と非ストレス加肝細胞でカベオリン-1の mRNA の発現の変化を検討する。また shear stress が肝細胞に作用すると ATP が放出され、それが ATP 受容体である P2X4 チャネルを活性化することで細胞外カルシウムが流入し、結果的に細胞内カルシウム濃度が上昇することで細胞内へ情報が伝達される。さらに shear stress による ATP 放出反応を高感度で実時間イメージングできるシステムにより、これは遺伝子工学的に作製したヒオチン化ルシフェラーゼ蛋白を細胞膜に結合させ、細胞から放出された ATP とルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を起こすことで発生するフォトン冷却 CCD カメラで捉えるものである。これにより肝細胞における shear stress のカベオラによるカルシウム・シグナリング情報伝達機構が明らかになるものと考え。カベオラノックアウトマウスにおける shear stress 下の PAI-1mRNA の変化の観察、さらに過剰な shear stress 付加下でのカベオラでのカルシウム・シグナリングを検討し、肝細胞の再生と死のメカニズムの解明を目指した。平成24年度 Wister ラットを用いコラゲナーゼ灌流し、初代肝細胞培養 (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2006 ;291:G26-34) 行い、90%以上の viability を確保しておく。初代肝細胞を William's 培養液に静置し、Caveolin-1RNA interference のための primer を用い、コントロールには luciferase を用いて24時間培養固定し、免疫染色及び PCR、Western blot 解析を行う。ラット初代肝細胞培養細胞を用い、カベオラの重要な構成要素であるカベオリン-1を免疫染色し immunofluorescence microscopy にてその局在を同定する。さらに流れ付加装置で shear stress を付加し、ストレス加肝細胞と非ストレス加肝細胞でカベオリン-1の mRNA

の発現の変化を検討する予定であったが、研究機関の移動のため、予定した実験ができなかった。

そこでCaveolin-1とPAI-1の肝における役割を包括的に解明するため、再生肝、脂肪肝炎、大腸癌肝転移、肝細胞癌について臨床病理学的検討を行い、肝における再生、癌化、炎症、癌浸潤転移のメカニズムを解明することとした。

まずこれまでの肝転移切除70症例や肝切除例の切除前後の標本を採取した。caveolin-1, PAI-1, MT1-MMP, Ki67, CD44をパイロット症例を選択し免疫染色した。

4. 研究成果

新しい施設においては流れ負荷実験、動物実験ができないため、臨床病理学的検討へ変更した。これまでの大腸癌肝転移切除標本70例や肝切除時の標本採取に時間が掛かってしまい、十分な検討には時間が足りなくなってしまう。まだパイロットの検討のみとなってしまう。caveolin-1, PAI-1, MT1-MMP, Ki67, CD44を用い、大腸癌原発巣と肝転移巣を染色した。このなかでまだ評価が不十分であるが、研究大腸癌5型において、肝転移巣と原発巣のPAI-1の発現が増強している興味ある知見が得られた。

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5件)

1. Yoshiaki Hara, Yoshinobu Sato, Satoshi Yamamoto, et al. Successful laparoscopic division of patent ductus venosus: Report of a Case. Surgery Today 43;434-438, 2013.
2. Yoshinobu Sato, Hiroshi Oya, Satoshi Yamamoto, et al. Heterotopic pancreas autotransplantation with spleen for uncontrollable hemorrhagic pseudocyst and disabling pain in chronic pancreatitis. Hepatogastroenterol 60; 425-427, 2013.
3. Sato Y, Tomiyama C, Yamamoto S, et al. Perioperative immunological differentiation in liver cirrhotic patients who underwent living related liver transplantation. Hepatogastroenterol 60;666-668, 2013

4. T. Kobayashi, K. Miura, H. Ishikawa, H. Oya, Y. Sato, et al. Laparoscope-assisted Hassab's Operation for Esophagogastric Varices After Living Donor Liver Transplantation: A Case Report. Transplantation Proceedings 46;986-988, 2014.

5. Aso-Ishimoto Y, Yamagiwa S, Ichida T, Miyakawa R, Tomiyama C, Sato Y, Watanabe H, Aoyagi Y. Increased activated natural killer T cells in the liver of patients with advanced stage primary biliary cirrhosis. Biomed. Res 35;161-169:2014

[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
1. なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
佐藤好信 (SATO YOSHINOBU)
昭和大学・医学部・講師
研究者番号： : 20313538

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし()

研究者番号: