

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26670591

研究課題名(和文)細胞死による積極的な肝機能維持・再生制御機構の解明と臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Basic study of the relevance of programmed cell death in the maintenance and regulation of liver function and regeneration for the future clinical use.

研究代表者

伊 敏 (Yi, Min)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40292007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓に対する治療は、肝臓の持つ本来の再生能を期待して行なわれる。肝を再生させることは、肝臓治療の根幹であるが、肝再生および肝障害の調節機構に関しては、まだ十分に理解されていない。今回、肝切除・肝障害直後の再生開始プロセス、維持あるいは停止プロセスに対して、細胞死というイベントがどのような役割を果たしているか検討する目的で、プログラムされた細胞死に対するプローブの開発を行った。アポトーシス、ネクロプトーシス、およびオートファジーに関与する分子に対するプローブを作製し、肝細胞、また、一部プローブは小動物の生体肝にて機能することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Liver regeneration is an essential event in the treatment of various liver diseases. Most therapeutic strategies are based on the natural regenerative capability of liver. However, the precise mechanisms of liver regeneration have not fully elucidated. Here, we tried to study the roles of programmed cell death such as apoptosis, necroptosis and autophagy in post-hepatectomy liver regeneration.

We designed and developed our original optic probes for apoptosis, necroptosis and autophagy (based on molecular mechanism of caspase, necroptosis and autophagy pathway, respectively). Some of these probes functioned at least hepatic cells in the in vitro system. We examined the functions of the apoptotic activity probe with Fas-induced acute liver failure model in mouse as well as cell experiments. The probe for apoptotic activity was proved to be sufficient for even in vivo assay. We hope to elucidate the physio-pathology of various liver conditions by these probes.

研究分野：肝臓病態学、分子生物学、ストレス応答、細菌感染症学、免疫学

キーワード：肝障害 プログラム細胞死 光プローブ

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。肝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。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なってきた。

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することは出来ない。我々の最近の検討で、細胞増殖・成長といった“ポジティブコントロール”と同様に、アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジーといった細胞死誘導機序による“ネガティブコントロール”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。アポトーシスおよびオートファジーは、発生・分化のみならず、生体内の恒常性の維持に関与するとも考えられており、腫瘍細胞などにおける役割も研究されている。ネクロプトーシスは比較的新しい細胞死の概念であるが、ネクロプトーシスもアポトーシス同様にプログラムされた積極的細胞死である。以上より、これら細胞死の肝再生等の病態生理における役割を解明することは、臨床的に非常に重要と考えられる。

2. 研究の目的

アポトーシス、ネクロプトーシスおよびオートファジーが、肝機能の維持、肝再生において合理的かつ積極的な役割を果たし、細胞増殖、細胞成長あるいは肝全体としての機能制御のメカニズムをイメージング法にて動的に解析し、“肝の様々なプロセスのポジティブ/ネガティブな揺らぎ制御機構”の一端を解明することを目的とする。肝切除直後の速やかな肝再生機序・肝傷害のメカニズムに新たな側面を与えるという学際的意義を有するのみならず（細胞死の側面から臓器機能を理解するのみならず）、細胞死を積極的にコントロールすることにより、さらに有効な肝再生療法、移植療法あるいは逆に制癌療法を開発できる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

肝再生・障害におけるアポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジーなどの細胞死誘導機序、および細胞増殖の関係を分子生物学的に解析するとともに、それぞれの機能を捉える光プローブを作製する。その光イメージング法をもちいて、肝再生・障害制御機構を主に細胞死の側面から動的に捉えるための

方法を検討する。さらに肝病態（劇症肝炎モデル等）の細胞死現象をとらえる試みを行う。

(1) アポトーシスとネクロプトーシスおよびオートファジーを生体レベルで検出する光プローブを作製する。発光酵素（ルシフェラーゼ）をベースとして、我々が独自に開発した“ルシフェラーゼ再構成”の理論に基づいて、アポトーシス、ネクロプトーシス、オートファジーに大きく関与する分子を選定し、それら細胞死誘導機序をトレースするための光プローブをデザインし、作製する。また同様に、細胞増殖・成長を制御する分子に対する分子機能プローブの作製も行う。

(2) 細胞実験によりプローブの機能的有効性と生体レベルで通用するシグナル強度（S/N比）を確認する。各プローブは、個々に適した細胞死誘導刺激等の投与によりその機能性を検討する。

(3) 小動物実験：マウスの病態モデル（劇症肝炎モデル）を用いて、プローブの有効性を確認し、その病態生理学的意義を解析する。Fas/Fas リガンド系はアポトーシスを誘導する細胞死因子であり、これをマウス肝に投与し、劇症肝炎モデルとする。このモデルにて生体（光）イメージングの手法を取り入れ、肝細胞死のイメージングを試みる。

(4) 今回、細胞に対する生理病態的な応答としての細胞死（アポトーシスおよびネクロプトーシス）とそれに関連するオートファジーを捉える側面から検討するが、肝臓の病態生理（とくに外科侵襲に対する応答・応答不全）に関与する細胞内分子機序について、生化学・分子生物学的にも解析する。

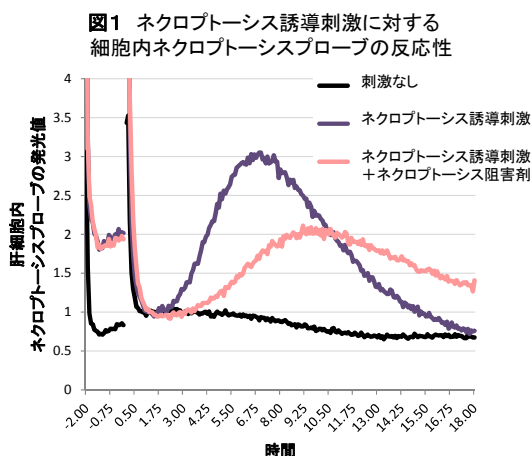
4. 研究成果

本研究の目的である細胞死に対する光プローブの作製に関しては、初年度に予定したほぼ全ての種類の光プローブに着手し、プロトタイプのプローブをデザイン・作製することが出来た。一部プローブは、目的刺激に対して機能することが確認できた。しかし、生体で使用可能とするためには、シグナル強度を強める必要があるため、プローブによってはデザイン等の再検討を行った。また、本研究における検討で生体レベルにて十分使用可能と考えられるプローブが完成し、実際に生体でその現象（細胞死）をとらえることを確認した。

(1) アポトーシスによる細胞死の評価のための光プローブ：アポトーシス誘導に大きく関わるカスパーゼ分子（特に分子の切断機能）に着目し、この分子をもちいてプローブを作製した。これに関しては十分な反応性と高いシグナル強度が得られ、ほぼ完成したと考えている。細胞実験により、アポトーシス誘導薬剤（Fas リガンド）、低酸素刺激などでのプローブの良好な反応と生化学的な解析結果とが一致し、生体レベルでの光プローブ

として十分使用可能なものと考えられた。また、後述のネクロトーシス評価プローブとの比較検討で、細胞死誘導薬刺激における細胞死進行のモニタリングに成功した。これらの結果から、細胞死におけるアポトーシス・ネクロトーシス、それぞれの役割解析を試みることができた。

(2) ネクロトーシス評価に対するプローブ：細胞内ネクロトーシス誘導分子の二量体化を利用して活性化する光プローブをデザインし作製した。プローブ導入細胞にネクロトーシス誘導試薬を刺激すると、プローブの発光上昇が確認できた。さらにこの反応は、ネクロトーシス阻害剤の投与により半減した(図1)。このように、ネクロトーシス強制誘導系にて、本プローブが比較的強い強度で確かに機能することが確認できた。また、前述のように、アポトーシスプローブとの比較により、種々のプログラム細胞死が誘導される機序解析にも有用であった。

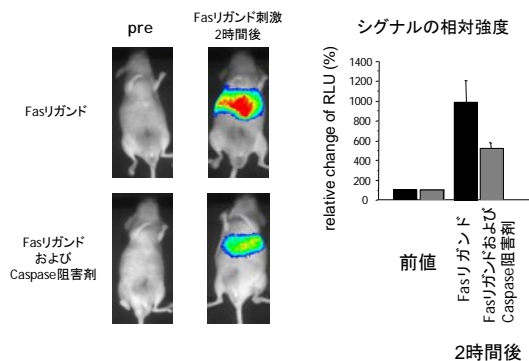


(3) オートファジーに対する光プローブは、当初、オートファジーに関与する2つの分子の結合を利用したプローブをデザイン・作製する予定であったが、より上流を検討するために、分子自体の遺伝子発現を測定する光プローブの作製に変更した。現在、細胞実験にてその機能性を検討中である。

(4) 小動物をもちいた検証実験：本検討には、細胞死誘導薬刺激(Fasリガンド)投与による劇症肝炎マウスモデルをもちいた。マウスにアポトーシスプローブを導入し観察することで、Fasリガンド刺激によって引き起こされる肝細胞死において、アポトーシスの関与を経時的にかつ半定量的にモニタリングすることに成功した。それにより、その時空間的な病態をより詳細に理解することができた(図2)。

(5) 細胞増殖能を示すプローブ(肝細胞の増殖能を示すシグナルであるSTAT3二量体化(活性化)を指標とするプローブ)作製に関

図2 Fasリガンド刺激によるマウス肝障害の光イメージング(アポトーシスプローブによる測定)



しては、いまだ十分な反応性が得られていない。また、生存能・インスリンシグナルを示すプローブとして、リン酸化Aktに対する光プローブに関しては、刺激に対する反応したが、プローブの観察方法および反応強度に課題が残されており、検討中である。

これらの積極的細胞死に対する光プローブが作製できたことは、今後小動物における病態解析の上で強力なツールになると考えられる。特に、アポトーシスに対する光プローブは、マウス肝へ導入された後、生体レベルにて十分に機能したことから、ネクロトーシス他の細胞死プローブとの組み合わせ、あるいはレドックス感受性プローブとの組み合わせなどにより、様々な病態の解析が可能となる。

今回の成果は、肝臓の病態解析のみならず、創薬、食品科学などの分野においても広く応用可能なユニークなものと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- ① Naoki Morita, Sanae Haga, Yoshihiro Ohmiya, Michitaka Ozaki. Long-term *ex vivo* and *in vivo* monitoring of tumor progression by using dual luciferases. *Analytical Chemistry* 査読有 497; 2016, 24-26. doi: 10.1016/j.ab.2015.12.007 doi: 10.1089/jir.2014.0107
- ② Yimin, M. Kohanawa, S. Zhao, M. Li, Y. Kuge, N. Tamaki, M. Watanabe. Regulatory effect of interleukin-4 in the innate inflammatory response to *Rhodococcus aurantiacus* infection in mice. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 査読有 35; 2015, 222-231. doi: 10.1089/jir.2014.0107
- ③ Yuma Yamada, Kohei Nakamura, Jiro Abe, Mamaru Hyodo, Sanae Haga, Michitaka Ozaki, Hideyoshi Harashima. Mitochondrial delivery of Coenzyme Q10 via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia/reperfusion injury in the mouse liver. *Journal of Controlled Release* 査読有 213; 2015, 86-95. doi:

- 10.1016/j.jconrel.2015.06.037
- ④ Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Yuma Yamada, Naoki Morita, Izuru Nagashima, Hiroshi Inoue, Yuka Inaba, Natsumi Noda, Riichiro Abe, Kazuo Umezawa, Michitaka Ozaki. p62/SQSTM1 plays a protective role in oxidative injury of steatotic liver in a mouse hepatectomy model. *Antioxid Redox Signal* 査読有 21; 2014, 2515-2530. doi: 10.1089/ars.2013.5391
- ⑤ Masanori Sato, Kazuaki Nakanishi, Sanae Haga, Masato Fujiyoshi, Motoi Baba, Kazuhiro Mino, Yimin, Haruki Niwa, Hideki Yokoo, Kazuo Umezawa, Yoshihiro Ohmiya, Toshiya Kamiyama, Satoru Todo, Akinobu Taketomi, Michitaka Ozaki. Anoikis induction and inhibition of peritoneal metastasis of pancreatic cancer cells by a nuclear factor kappa B inhibitor, (-)-DHMEQ. *Oncology Research* 査読有 21; 2014, 333-343. doi:10.3727/096504014X14024160459249

〔学会発表〕(計6件)

- ① 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田 直樹、伊敏。p62/SQSTM1 を基軸とした新たな肝臓・肝細胞保護・機能維持法の探索 第42回日本臓器保存生物医学会学術集会 2015年11月13日 いわて県民情報交流センターアイーナ(岩手県盛岡市)
- ② 伊敏。肝臓における早期サイトカインの感染性肉芽腫性炎症への寄与 第80回日本インターフェロン・サイトカイン学会 2015年7月17-18日 東京工業大学(東京都目黒区)
- ③ 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝。“光”を利用した肝細胞機能制御技術の開発 第22回肝細胞研究会 2015年6月5日 米子コンベンションセンター(鳥取県米子市)
- ④ 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝。“光”を利用した新たな細胞・臓器保存法の開発 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会 2014年11月28日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
- ⑤ 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、野田 なつみ、森田 直樹、小澤 岳昌。光イメージング技術を用いた肝病態の解析 第21回肝細胞研究会 2014年6月27日 東京医科歯科大学(東京都文京区)
- ⑥ 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、野田 なつみ、森田 直樹、服部 満、小澤 岳昌。光を応用した移植細胞機能・細胞環境のモニタリングと制御の試み 第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月3日 京都国際会館(京都府京都市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊 敏 (Yimin)
北海道大学・医学研究科・助教
研究者番号：40292007

(2) 研究分担者

芳賀 早苗 (HAGA, Sanae)
北海道大学・保健科学研究所・博士研究員
研究者番号：60706505

野田 なつみ (NODA, Natusmi)
東京大学・理学研究科・研究員
研究者番号：30624358