

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860255

研究課題名(和文)肝再生および肝腫瘍形成におけるJNK経路の意義とその制御機構

研究課題名(英文) Roles and mechanisms of JNK pathway in liver regeneration and tumor formation

研究代表者

大塩 貴子 (Ooshio, Takako)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：80723238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：JNKの上流キナーゼMKK7は肝細胞増殖や肝再生への関与が示唆されているが、不明な点が多い。我々は肝特異的MKK7ノックアウト(KO)マウスを用い、MKK7 KOは四塩化炭素投与による傷害の程度や肝細胞増殖に影響を与えないが、組織修復を遅延させることを見出した。初代培養肝細胞をコラーゲンゲル3次元培養したところ、MKK7 KOでは樹枝状形態形成が抑制され、transgelinとplasminogen活性化因子の発現が低下した。これらの遺伝子をMKK7 KO肝細胞に過剰発現させると、形態形成能が回復した。以上より、MKK7は肝細胞の運動に関与し、肝修復を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The MKK7 which is an upstream regulator of JNKs is suggested to be involved liver proliferation and regeneration, but roles of MKK7 in liver pathophysiology remain obscure. Here we examined the effects of hepatocyte-specific MKK7 knockout (KO) on liver regeneration and repair processes. After a single injection of CCl4, reparation of the injured liver was delayed in KO mice, despite the extent of liver injury and robust regenerative proliferation of hepatocytes that were comparable to control. In hepatocytic spheroids in collagen gel culture (CGC), MKK7 KO suppressed branching morphogenesis and reduced the expression of transgelin and plasminogen activators. Overexpressed these genes in cultured MKK7 KO hepatocytes rescued the attenuated branching morphogenesis in CGC. Our study demonstrates that hepatic MKK7 has important roles in repair processes following liver injury, possibly through promoting migration and morphogenesis of hepatocytes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：JNK MKK7 肝細胞増殖 肝修復

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答シグナルとして知られる JNK 経路は、細胞外からの物理・化学的ストレス刺激や炎症性サイトカインに応答し、細胞の増殖・生存・分化などに影響を及ぼす。JNK の活性化には上流キナーゼである MKK7 と MKK4 の両者が必須であり、これらのいずれかをノックアウトすることで JNK 経路が阻害される。MKK7 や MKK4 の全身ノックアウト (KO) マウスはいずれも肝発生を強く障害し、胎生致死となる (Ganiatsas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 195: 6881-6886, 1998; Wada *et al.*, Nat Cell Biol, 6: 215-226, 2004)。しかし、我々は Alb-Cre による肝細胞特異的 MKK7 KO では肝発生に明らかな異常が認められないことを確認しており、肝臓における MKK7 の役割は不明である。一方、肝細胞の MKK4 をノックダウンすると、その作用機序は明らかではないが、MKK7 と JNK1 が活性化し、傷害肝における肝細胞の増殖が促進されとの報告があり (Wuestefeld *et al.*, Cell, 153: 389-401, 2013), MKK7 が肝細胞増殖や肝再生に重要であることが示唆されている。

2. 研究の目的

肝細胞特異的 MKK7 KO マウス (MKK7^{flox/flox}, Alb-Cre) に四塩化炭素を投与して肝傷害を誘発し、その後の肝再生への MKK7 KO の影響を検討する。さらに、肝細胞での MKK7 の役割を明らかにするため、MKK7 KO マウスより肝細胞を分離し、コラーゲンゲル内に包埋し、樹枝状形態形成への影響を調べる。そして、MKK7 による肝細胞増殖および肝再生への関与を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

MKK7^{flox} マウスは東京医科歯科大学 仁科博史先生より供与された。Alb-Cre マウスはジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME) より購入した。MKK7^{flox/flox} マウスと Alb-Cre マウスを交配し、コントロール (MKK7^{flox/+}; Alb-Cre) および MKK7 KO (MKK7^{flox/flox}; Alb-Cre) 雄マウス (8-10 週齢) を実験に使用した。四塩化炭素による傷害は、四塩化炭素とオリーブ油 (1:4) を混合したものをマウスに 1mL/kg となるように皮下注射した。

(2) 顕微鏡観察

PBS 灌流した肝臓は 4% PFA で一晩固定し、パラフィン包埋した。パラフィン切片を 4 μm で薄切し、脱パラフィン後にヘマトキシリン・エオジン染色を行った。免疫組織化学は、Target Retrieval Solution (DAKO) で抗原賦活化を行った後、抗 Ki-67 抗体 (ニチレイ) と Envision POD (DAKO) を用いて染色した。核はヘマトキシリン染色を行った。

(3) 肝細胞分離と培養

初代培養肝細胞は 2 段階コラーゲン灌流

法により分離し、無血清 Williams' E 培地に EGF (10 ng/ml), insulin (10⁻⁷ M), dexamethasone (10⁻⁷ M) を加えて培養した。コラーゲンゲル培養 (CGC) の詳細は、Nagahama *et al.*, Am J Pathol. 184: 3001-3012. 2014 に記述している。

(4) マイクロアレイ解析

コントロールおよび MKK7 KO 初代培養肝細胞よりセパゾール (ナカライテスク) を用いて RNA を抽出した。CGC, CGC+TNFα, CGC+TGFβ の初代培養肝細胞の RNA を 1 色法マイクロアレイ (3D-Gene Microarray, TORAY) を用いて解析し、比較した。蛍光強度はバックグラウンドを差し引いた後、標準的なグローバルノーマライゼーション法を用いて補正した。

(5) 定量 reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

抽出された RNA を逆転写し、FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche Diagnostics) を用いて定量 RT-PCR を行った。ΔΔCt 法で解析し、その発現量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) にて補正された。

(6) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの作出と AAV8 の作製

Transgelin (*Tagln*), plasminogen activator urokinase-type (*Plau*), plasminogen activator tissue-type (*Plat*) の遺伝子は、CGC 初代培養肝細胞サンプルの cDNA を用いた PCR によってクローニングを行った。Gaussia luciferase (*Gluc*) cDNA をネガティブコントロールとして用いた。pCAG-WPRE-IRES-GFP ベクターにこれらの遺伝子を *NheI* および *XhoI* サイトに導入し、AAV ベクターを作出した。組み換え AAV8 の作製法は、Paterna J *et al.*, J. Virol. 78: 6808-6817, 2004 に記載された方法により行った。

(7) AAV8 感染スフェロイドの作製

コラーゲン塗布培養皿に初代培養肝細胞を播き、3 時間後に AAV8 を感染させた。5 日後にトリプシンを用いて細胞を浮遊させ、ultra-low attachment surface plates (Corning) 上で 2 日間培養し、スフェロイドを作製した。

(8) 統計解析

数値は平均±標準誤差で示した。有意差判定は Student's *t*-test を用いた。

4. 研究成果

(1) 四塩化炭素傷害における MKK7 KO 肝細胞の修復遅延

MKK7 KO および対照マウスに四塩化炭素を投与し、肝小葉中心部の肝細胞に傷害を与え

た. 肝傷害の程度を調べるために血漿中のアラニンアミノ基転移酵素 (ALT) を測定したところ, そのピークは四塩化炭素投与 1 日目であったが, MKK7 KO と対照マウスに差は見られなかった (図 1A). 次に, 肝細胞増殖を調べるために肝組織を Ki-67 で染色し, 陽性肝細胞の割合を検討した. Ki-67 陽性細胞は四塩化炭素投与 2 日目にピークを迎えたが, MKK7 KO による影響はなかった (図 1B). しかし, 四塩化炭素投与 4 日目の肝組織を観察したところ, 対照群に比べて MKK7 KO 肝では壊死した肝細胞が多く残存し, 肝修復が遅延していることが明らかとなった (図 1C). 傷害部を定量するために Fibrinogen 抗体で免疫染色を行ったところ, 四塩化炭素投与 2 日目は傷害部で強く染色されたが, MKK7 KO による影響は見られなかった (図 1D). 一方, 四塩化炭素投与 4 日目の肝組織では, 対照群に比べて MKK7 KO は陽性の面積が亢進していた (図 1E). 以上の結果より, MKK7 は肝修復に関与していることが明らかとなった.

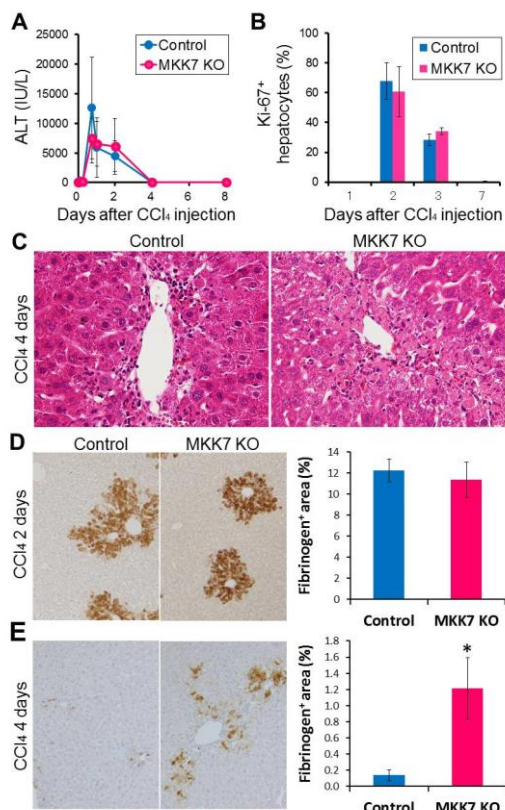


図1 MKK7 KOマウスでは肝傷害後の修復が遅延する。(A) CCl₄ 傷害後の血漿中のアラニンアミノ基転移酵素 (ALT). (B) CCl₄ 傷害後のKi-67 陽性肝細胞の割合. (C) CCl₄ 傷害後の4日目の肝組織像 (H&E染色). (D, E) CCl₄ 傷害後の2日目 (D) 4日目 (E) fibrinogen免疫組織化学と陽性面積の定量. *p<0.05.

(2) MKK7 KO 肝細胞のコラーゲンゲル培養 (CGC) 下での樹枝状形態形成の抑制

肝細胞での MKK7 の機能を詳細に解析するために, MKK7 KO および対照肝細胞を分離し, コラーゲンゲル培養 (CGC) を行った. 対照肝細胞では培養 2 日目において樹枝状形態形成が見られ, その反応は TNF α や TGF β を培地中に加えると促進され, dexamethasone (Dex) を加えると抑制された (図 2AB). 一方, MKK7

KO では上記のすべての条件において樹枝状形態形成が抑制されていた (図 2AB). 以上の結果より, MKK7 は肝細胞の運動を制御している可能性が示唆された.

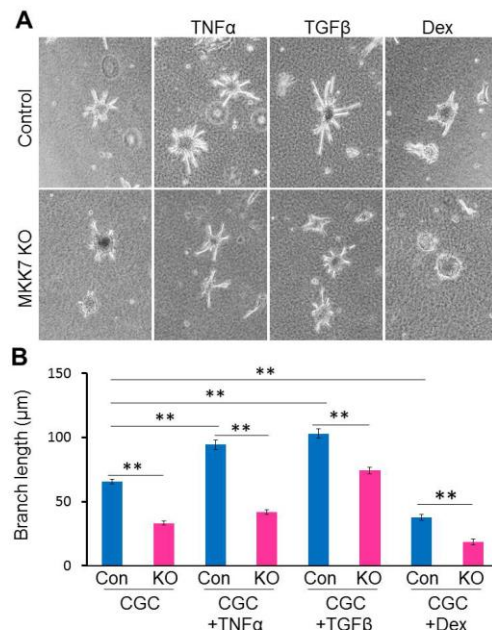
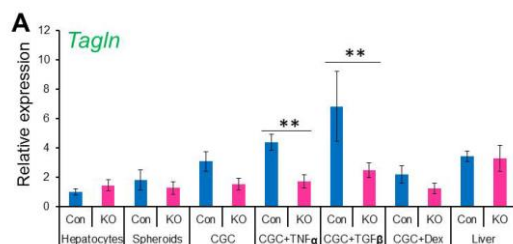


図3 MKK7 KO 肝細胞はコラーゲンゲル培養 (CGC) での樹枝状形態形成を抑制する。(A) CGC 2日後の樹枝状突起の伸長. (B) ImageJによる樹枝状突起の長さの定量. **p<0.01.

(3) CGC での樹枝状突起の伸長と発現の相関する遺伝子の同定

CGC した MKK7 KO および対照肝細胞の RNA を抽出し, マイクロアレイ解析を行った. そして, 樹枝状突起形成に関わる遺伝子を同定するために, 樹枝状突起の長さのパターンと発現が相関する遺伝子を抽出した. さらにその中で細胞の運動に関わるとの報告がある遺伝子として Transgelin (Tagln), plasminogen activator urokinase-type (*Plau*), plasminogen activator tissue-type (*Plat*) に着目した. CGC した肝細胞のこれらの遺伝子発現を RT-qPCR によって調べたところ, MKK7 KO によって発現が低下していることが明らかとなった (図 3ABC). これらの遺伝子が樹枝状形態形成に関与しているかを調べるために, MKK7 KO 肝細胞にアデノ随伴ウイルス (AAV) 8 を用いてこれらの遺伝子を導入し, CGC を行ったところ, 対照の *Gluc* 遺伝子を導入したものに対して, 優位に樹枝状形態形成が促進されることが明らかとなった. 以上の結果より, MKK7 KO では Tagln, uPA, tPA の発現が低下することにより, 肝細胞の運動が抑制されている可能性が示唆された.



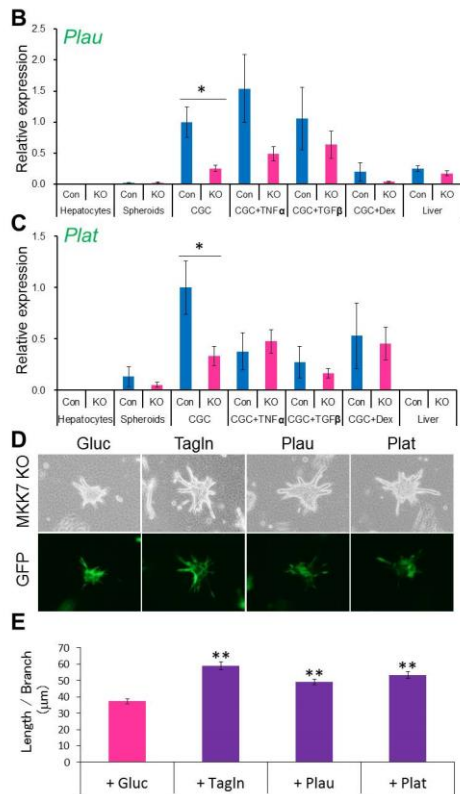


図4 MKK7 KO 肝細胞では *Tagln*, *Plau*, *Plat* の発現が低下する。(A-C) 定量RT-PCR。(D) 図示した遺伝子を導入したMKK7 KO肝細胞のCGC 2日目の樹枝状突起の伸長。AAV8感染細胞は、導入遺伝子とともにIRESを介して発現する Green fluorescent protein (GFP) 蛍光により確認できる。(E) ImageJによる樹枝状突起の長さの定量。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

(4)

<引用文献>

- ① Ganiatsas *et al.*, SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 195: 6881-6886, 1998
- ② Wada *et al.*, MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol*, 6: 215-226, 2004
- ③ Wuestefeld *et al.*, A direct in vivo RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver generation. *Cell*, 153: 389-401, 2013
- ④ Nagahama *et al.*, Contributions of hepatocytes and bile ductular cells in ductular reactions and remodeling of the biliary system after chronic liver injury. *Am J Pathol.* 184: 3001-3012. 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Xin B、他(10名中4番目) Critical role

of Myc activation in mouse hepatocarcinogenesis induced by the activation of AKT and RAS pathways、*Oncogene*、査読有、掲載決定、2017、<http://rdcu.be/rSb9>

- ② Chen X、他(9名中5番目) Differential reactivation of fetal/neonatal genes in mouse liver tumors induced in cirrhotic and non-cirrhotic conditions、*Cancer Sci.*、査読有、Vol. 8、2015 Aug、pp.972-981
DOI:10.1111/cas.12700

〔学会発表〕(計10件)

- ① 大塩貴子、肝組織修復におけるストレスキナーゼ MKK7 の役割:マトリックスを介した肝細胞移動能への影響について、第106回日本病理学会総会、2017年4月27日、京王プラザホテル(東京都)
- ② 大塩貴子、肝細胞 MKK7 による plasminogen 活性化因子の発現制御:急性肝傷害における病態生理学的意義、第39回日本分子生物学会、2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- ③ 大塩貴子、肝細胞特異的 MKK7 ノックアウトによる plasminogen activator 抑制:急性肝傷害後の修復遅延との関連性、第96回北海道医学大会 病理分科会、2016年10月15日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」(北海道・札幌市)
- ④ 大塩貴子、肝細胞におけるストレスキナーゼ MKK7 の役割:初代培養肝細胞を用いた検討、第23回肝細胞研究会、2016年7月7日、大阪大学中の島センター(大阪府)
- ⑤ 大塩貴子、ストレスキナーゼ MKK7 の肝組織リモデリングへの関与、BMB 2015、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(神戸市・兵庫県)
- ⑥ 大塩貴子、ストレスキナーゼ MKK7 の肝組織リモデリングへの関与、第48回北海道病理談話会、2015年10月17日、札幌医科大学(北海道・札幌市)
- ⑦ 大塩貴子、肝傷害後の組織修復におけるストレス関連キナーゼ MKK7 の役割、第104回日本病理学会総会、2015年5月1日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
- ⑧ 大塩貴子、マウス肝細胞 MKK7 ノックアウトによる肝修復遅延の影響、第22回プロメテウスの会、2015年3月28日、しいのき迎賓館(石川県・金沢市)
- ⑨ 大塩貴子、肝傷害後の組織修復における肝細胞 MKK7 の意義、第94回北海道医学大会 病理分科会、2014年10月11日、旭川グランドホテル(北海道・旭川市)
- ⑩ 大塩貴子、肝細胞増殖および傷害における MKK7 の機能解析、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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塩 貴子 (OOSHIO, Takako)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：80723238

(3) 連携研究者

西川 祐司 (NISHIKAWA, Yuji)
旭川医科大学・医学部・教授
研究者番号：90208166