

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861081

研究課題名(和文) 新たな肝再生の分子機序-apelin/APJ系-の解明と治療応用への基礎的研究

研究課題名(英文) Elucidation of a new molecule mechanism of liver regeneration and usability of therapeutic option to facilitate efficient liver regeneration after liver surgery

研究代表者

吉屋 匠平 (Yoshiya, Shohei)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・共同研究員

研究者番号：20717079

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)：APJ-apelin系の阻害薬であるF13Aを用いて肝切除後肝再生への影響を検討した。F13A投与により肝重量/体重比は有意に亢進し、肝傷害の指標である血清肝酵素の上昇は有意に低かった。また肝細胞増殖および細胞周期シグナルも亢進していた。その機序としてクッパ-細胞の活性化(TNF- $\alpha$ の上昇)が認められ、IL-6上昇、細胞内シグナルとしてはSTAT3、MAPkinaseの亢進からの肝再生の促進が考えられた。in vitroで肝細胞、クッパ-細胞、星細胞への影響を検討したところクッパ-細胞のみ濃度依存性の影響を認めた。また大量肝切除モデルに対し生存率改善(15%→59%)の治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We used the specific APJ antagonist F13A on liver regeneration after hepatectomy in mice. Results: F13A-treated mice had significantly higher serum concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 than control mice, resulting from activation of Kupffer cells. Compared with untreated mice, F13A enhanced the STAT3 and MAP kinase pathways, stimulated cell-cycle progression, and promoted hepatocyte proliferation and liver regeneration without inducing apoptosis or inflammation in regenerating livers. In vitro, Kupffer cells expressed APJ and were activated directly by F13A treatment, releasing TNF- $\alpha$  and IL-6. Moreover, F13A-treated mice had a higher survival rate than untreated mice in the extended hepatectomy model.

Conclusion: F13A treatment promotes early phase liver regeneration after hepatectomy, increasing levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 by activating Kupffer cells. F13A treatment may become a therapeutic option to facilitate efficient liver regeneration after liver surgery.

研究分野：肝再生

キーワード：肝再生 apelin APJ クッパ-細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓(原発性肝臓、転移性肝臓)に対する治療は肝切除術が唯一の根治的治療である。また、本邦では非代償性肝硬変や急性肝不全に対する治療法として、生体肝移植術が幅広く行われており、その5年生存率は約75%と良好である(Duffy JP, et al. Ann Surg.2010)。しかし、症例数の増加や長期経過に伴い、数多くの臨床問題が浮き彫りになってきている。

肝臓患者に対する部分肝切除術においては、肝機能に合わせて切除量が規定されているが、病的肝(脂肪肝、NASH、糖尿病など)が背景にあり肝機能不良のため術後に良好な肝再生が期待できず(Bruix J, et al. Lancet 2009)、肝切除治療を断念する患者は日本では年間約3万5000人存在する。また、生体肝移植においては、ドナーの残肝の割合とレシピエント標準肝重量に対するドナー摘出肝の割合をもとに適応を決定し、近年では比較的安全でドナー・レシピエントともに良好な経過となっているが、ドナー残肝不足およびグラフト肝重量不足により救命できない肝硬変(肝臓合併を含む)・劇症肝炎の患者を年間約1万8000人と多数認める。多くの犠牲と労力、そして医療経済的な負担をしいられながら肝切除・肝移植は定着してきた(Schuppan D, et al. Lancet 2008)。この命題の克服は、肝臓及び末期肝硬変にとって残された最大の関門であり、行政機関含めた、肝切除・肝移植実施施設が総力を挙げて優先的に取り組むべき課題である。

この問題解決のため、我々はハイブリッド型人工肝臓の開発(Yamashita Y, et al. Cell Transplant. 2003)や、肝切除術後の高圧酸素療法による肝臓抑制効果(Ijichi H, et al. J

Hepatol. 2006, 図 A)、肝細胞の急激な増殖を抑制し、肝細胞・類洞内皮細胞のバランスのとれた再生による大量肝切除後の肝不全回避(Ninomiya M, et al. Am J Transplant.2010, 図 B)などについて研究し報告してきた。現在までに肝再生促進因子、肝再生シグナルの研究は世界的に非常に幅広く行われてきていたが、高度に組織化された生命現象である肝再生をコントロールし、実際に臨床応用まで至った、肝再生治療は認められない。

一方、apelin/APJ系は血管新生などを中心に近年急速に研究が進められているシグナルであり、種々の臓器において様々な生理活性作用が報告されている。その中には、肝再生に関わる細胞内シグナルも含まれており、またマウス肝不全モデルでの生存率への関与が報告されており(Yauzaki H, et al. Liver Int. 2013)、肝再生への関与の可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

現在、肝切除術・生体肝移植術における問題点の一つは、しばしば致死性である術後肝不全及び過小グラフト症候群であり、いずれも術後の肝再生遅延が原因とされており、肝再生を促進する治療法の開発が必須である。一方、apelin/APJ系は血管新生をはじめ種々の臓器での作用が報告されており、肝においてはマウス肝不全モデルでの生存率の向上を認めており、肝再生にも重要な役割を果たすと予想される。本研究では正常マウスの肝再生過程における apelin/APJ 系の動態評価を行い、受容体である APJ の競合阻害剤であるペプチド(F13A)を用い、肝再生へ及ぼす

影響の検討、in vitro での検証および、肝再生治療実用化を目指し、各種病的肝での肝切除術、肝移植術における治療効果の検討を行う。

### 3. 研究の方法

マウス 70%肝切除モデルを用いて肝再生中の apelin/APJ 系の動態(発現量、発現部位)を同定する。APJ 競合阻害ペプチド F13A 投与による肝再生への影響(肝重量体重比、血清学的肝障害度、肝細胞増殖活性、肝再生因子、肝細胞内シグナル)を解明し、in vitro 培養系を用いて単離細胞(肝細胞、Kupffer 細胞)に対する F13A の影響を検討する。最終的に肝再生治療実用化を目指し、各種病的肝における F13A 投与による肝再生への影響を検討する。

### 4. 研究成果

(1)F13A は肝切除後肝再生を促進する：F13A 投与群では肝切除後肝再生の指標である肝重量/体重比が有意に高値、血清 AST/ALT 値は有意に上昇が抑えられ、肝細胞増殖(Ki-67, BrdU)は有意に高値、肝組織中のサイクリン D1, E1, A2 の発現量が有意に高値であった。  
(2)F13A で促進された肝再生中にはクッパー細胞の活性化が促進され、肝再生が亢進：F13A 投与群では CD69 陽性クッパー細胞/マクロファージ数の有意な上昇を認め、活性化マーカーである TNF- $\alpha$  の肝組織中遺伝子発現量、血清濃度の上昇を認め、それに伴う血清 IL-6 濃度の有意な上昇を認め、肝再生亢進に寄与していた。また細胞内シグナル検討では、STA3, Erk1/2 のリン酸化が有意に強いことが示された。

(3)F13A 刺激はアポトーシス、炎症は誘導せず肝再生の亢進に寄与する：F13A 投与群ではカスパーゼ遺伝子発現量を増加させず TUNEL 陽性細胞数の増加は認めず、急性期反応タンパクである血清アミロイド A1、フィブリノーゲンの発現量は両群間で有意差を認めなかった。

(4)F13A は in vitro でクッパー細胞の活性化を促進する：単離クッパー細胞を F13A で刺激培養すると、濃度依存性に TNF- $\alpha$  および IL-6 の培養上清中濃度が増加し、非刺激群に比して有意な増加であった。また初代肝細胞及びヒト肝星細胞株の LX-2 細胞に F13A 刺激培養したが肝細胞増殖が亢進されることはなく、肝細胞が TNF- $\alpha$ 、IL-6 を分泌することもなかった。F13A 刺激によって LX-2 細胞株の HGF 発現量が増加することも認められなかった。

(5)F13A は大量肝切除モデルの術後生存率を改善させる：コントロール群では術後 7 日目の生存率が 15%(3/20)、F13A 投与群では 50%(10/20)であり、有意に術後生存率の改善を認めた。

### 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 1 件)

Yoshiya S, Shirabe K, Imai D, Toshima T, Yamashita Y, Ikegami T, Okano S, Yoshizumi T, Kawanaka H, Maehara Y.

Blockade of the apelin-APJ system promotes mouse liver regeneration by activating Kupffer cells after partial hepatectomy. *J Gastroenterol*. 2015 May; 50: 573-82.

〔学会発表〕(計 2件)

・第 114 回日本外科学会定期学術集会(2014年 4月 3日～5日、京都)若手優秀演題賞

演題名：Apelin/APJ 系シグナル阻害による

肝再生促進効果に関する基礎的研究

・第 69 回日本消化器外科学会 (2014 年 7月 16日～18日、福島)ミニオーラル

演題名：Apelin/APJ 系を介した Kupffer 細胞活性化による肝再生促進効果に関する基礎的研究

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉屋匠平 (YOSHIYA Shohei)

九州大学・医学系研究院・共同研究員

研究者番号：20717079

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：