

令和元年5月23日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10163

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達に着目した肝再生制御機構の解明と腫瘍細胞増殖制御への応用

研究課題名(英文)Regulating liver regeneration and hepatocyte tumor proliferation in modulating intracellular signal transduction

研究代表者

丸橋 繁 (Marubashi, Shigeru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20362725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス70%肝切除モデルを用い、サイトカイン経路(IL-6、HGF)を選択的に遮断した結果、2剤投与群では対照群に比べ有意に再生が抑制されていた($p=0.028$)。また、リン酸化アレイで、特徴的な分子M2を同定した。この分子は、2剤投与群では相乗効果的に活性化抑制がみられ、肝再生におけるRegulation moleculeである可能性が示唆された。

本研究で、IL-6、HGFの両方を抑制した肝再生モデルでは、優位に肝再生を抑制し、シグナル伝達経路の解析から、特徴的ないくつかの分子が同定された。特にM2は、肝再生制御における重要な役割を果たしている可能性があり、今後の発展的研究が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝再生の制御が可能となれば、肝障害や肝不全さらには肝腫瘍の増殖制御にも関わり大変意義深い。一方で、他の臓器腫瘍では、様々な分子標的薬の有効性が示されている一方で、肝細胞癌や肝内胆管癌といった肝腫瘍においては、ほとんど有効性のある薬剤が登場していない。これは、肝再生や腫瘍増殖において、肝細胞特有の増殖メカニズムが働いていると考えられる。

今回の研究で、肝再生に関連する複数のサイトカインのシグナル伝達が相互に影響し合う事が見出された。今後、関連分子を中心にそのメカニズムを解明することで、有効な臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Liver regeneration was significantly suppressed in the 70% hepatectomy mice with blocking of IL-6 and HGF signal transductions ($P=0.028$). Furthermore, Phosphorylation Array revealed specific molecules which play a pivotal role in liver regeneration via these cytokine transductions. Importance of these characteristical molecules in liver regeneration will be further studied for regulating liver regeneration.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝再生 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝切除後に肝再生が起こることは古くから知られているが、そのメカニズムは依然として不明な点が多い(Cell Stem Cell 2014;15:340-349)。現在肝再生は複数のシグナル経路からの情報が、オーケストラの様につながり合い形成されていると考えられている (Science 1997;276(5309):60-6, Hepatology 2006;43:S45-53)これらの肝再生シグナルはすべてサイトカインとその受容体によって開始され、細胞内シグナル伝達機構によって制御されている。これまでの多くの研究で、サイトカインの中でも、IL-6/TNF 系、HGF/c-MET系、EGFRによる伝達系がその中心的役割を担っていることが報告されてきた (Hepatology 1987;7(6):1189-94, Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014 Jun 26;1-11 Epub)。

細胞内シグナル伝達機構の解析には、ノックアウトマウスが有用であるが、IL-6 や HGF をノックアウトすれば発生の段階で死亡してしまうことから、肝細胞のみにおける発現をノックアウトするコンディショナルノックアウトマウスを作成する方法や、受容体抗体を使用する方法が試みられている (Proc Natl Acad Sci 2004;101(13):4477-82 , J Exp Med 1998;188:1955-1965, J Biol Chem 2003;278:11281-11288)。

HGF の肝再生作用に関しては、当教室での研究で報告した (Surgery. 2004;136(5):1028-37) ように、肝切除後の門脈血流および門脈圧の増加により活性化された Urokinase receptor が肝細胞マトリックスに存在する HGF 重合体を splicing することにより活性化され、さらに肝細胞において c-met シグナル伝達経路が活性化され肝再生のトリガーとなると考えられている。

一方で、これらの研究は各々独立のシグナル伝達経路を検討しており、それぞれの相互作用についてはこれまでほとんど報告がない。実際には、これらの様々なサイトカインは互いに相互作用をしており、ネットワークが複雑に絡み合っている。近年開発された遺伝子レベルおよび蛋白レベルでの網羅的解析は、このような相互作用・ネットワークの解析に適した方法である。特に細胞内シグナル伝達機構では、蛋白のリン酸化による活性化が重要な指標となるが、この蛋白リン酸化を網羅的に解析する方法が開発され、注目されている (Methods Mol Biol. 2011;779:287-302)。

2. 研究の目的

このような背景から、これまでの肝再生研究を、細胞内シグナル伝達経路とネットワーク機構の観点からその制御機構を解明することを着想した。

更に、腫瘍細胞における増殖は、細胞内シグナル伝達機構の異常活性化と考えることが出来る。腫瘍における、抗がん剤や分子標的治療薬の治療抵抗性は、これらの細胞内シグナル伝達機構の抜け道を通して活性化されていると考えられ、調節分子 (以下 Regulation molecules とした) が重要な役割を担っている可能性がある。

このように、肝再生のみならず、腫瘍細胞における増殖制御機構を解明し、その制御法を確立することにより抗癌治療法として臨床応用することを念頭に、本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

(1) 肝再生モデルにおける、細胞内シグナル伝達機構の解析と肝再生における調節分子 (Regulation molecules) の同定 (in vivo study): サイトカインによる細胞のシグナル伝達機構を解析する。コンディショナルノックアウトマウスや受容体抗体を用いた negative challenge とサイトカイン投与による positive challenge を行い、RNA レベル (cDNA マイクロアレイ、マイクロ RNA アレイ)、蛋白および蛋白リン酸化レベルを網羅的に解析 (iTRAQ リン酸化定量解析またはリン酸化抗体アレイ) し、Western blot で確認、Regulation molecules を同定する。

(2) 同定した Regulation molecules による肝再生制御機構の解明 (in vitro/in vivo study): 同定した Regulation molecules を、siRNA による RNA 干渉法、マイクロ RNA あるいは利用できる場合は分子標的薬 (シグナル伝達阻害剤) を単独あるいは組み合わせて用いることにより、肝細胞内でのシグナル伝達経路を抑制し、70%肝再生モデルにおける肝再生への影響を評価する。一方で Regulation molecules の mRNA をトランスフェクションすることにより強発現させ肝再生への影響を検討する。

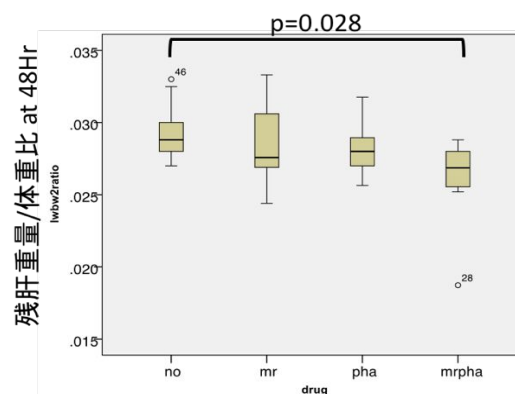
(3) 腫瘍増殖における Regulation molecules の影響と腫瘍増殖制御法の確立 (in vitro/in vivo study): siRNA による RNA 干渉法、マイクロ RNA あるいは利用できる場合は分子標的薬 (シグナル伝達阻害剤) を単独あるいは組み合わせて用いて、肝癌細胞株での Regulation molecules のリン酸化定量を行い、腫瘍増殖制御の評価を行う。さらに、Cancer Stem Cell (癌幹細胞、CSC) マーカーや EMT (上皮間葉転換、Epithelial mesenchymal transition) マーカーとの関連性も明らかにする。またヌードマウスに肝癌細胞株を皮下移植し、siRNA による RNA 干渉法、マイクロ RNA あるいは利用できる場合は分子標的薬 (シグナル伝達阻害剤) を単独あるいは組み合わせて用いて、腫瘍増殖制御法の確立を目指す。

4. 研究成果

マウス 70%肝切除モデル手技を安定させるため、C57BL/6J マウスを用意し 70%肝切除モデルを完成させた。サイトカイン経路(IL-6、HGF、EGFR)を選択的に遮断するため、分子標的薬(選択的 MET 阻害剤、PHA-665752、Chemscene、NJ)及び、選択的抗体阻害薬(Monoclonal Rat IgG2A Clone、#118627、R&D systems、MN)を購入し、投与した。また、IL-6系の受容体抗体である、抗マウス IL-6Rモノクローナル抗体(ラット)(MR16-1)(Immunology Letters 84(2002)231-240)を用意し、マウスに投与した。マウス70%肝切除モデル、肝切除後24時間および48時間の残肝の再生能を比較した。

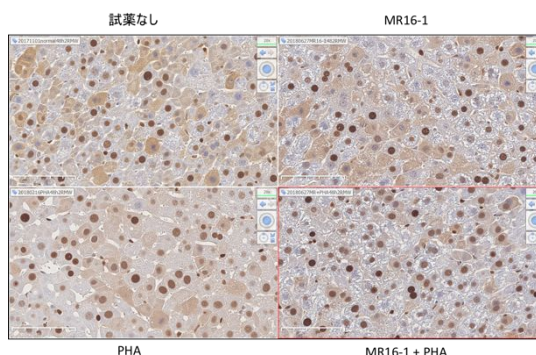
Group		Average	Median
1	Normal (n=13)	0.0292±0.0019	0.0275
2	MR16 (n=9)	0.0285±0.0027	0.0275
3	PHA (n=15)	0.0281±0.0015	0.0289
4	MR16+PHA (n=10)	0.0261±0.0028	0.0268

対照群では残肝重量/体重比が 0.0292 ± 0.0019 (n=13、48 時間)であったのに対し、MR16-1 投与群で 0.0285 ± 0.0027 (n=9、48 時間)P=0.861、PHA-665752 投与群で 0.0281 ± 0.0015 (n=10、48 時間)と統計学的には差を認めなかったが、MR16-1 と PHA-665752 を両方投与した 2 剤投与群では、0.0261 ± 0.0028 であり、対照群に比べ有意に残肝重量の増加が抑制された (p=0.028)。

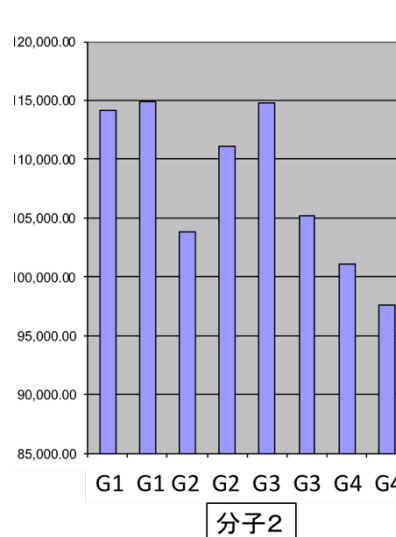


次に、肝再生に関わる因子として PCNA index を各群の切除肝組織で行ったものの、群間の有意な差は認められなかった。

また、シグナル伝達の活性化を評価するため、切除肝組織を用いてリン酸化アレイを行った。(AKT パスウェイ、リン酸化アレイ、Raybiotech Life, GA, USA)
<https://www.raybiotech.com/human-mouse-akt-array>



この中で AKT、JAK/STAT、MAPK、PI3K-AKT、Wnt/beta-Cateninシグナルパスウェイの活性化を調べた結果、特徴的な 2 分子を同定した。分子 1 (M1) は、PI3K-mTOR に関連する分子で、IL-6 シグナルの下流に存在する。この M1 は MR-16 投与マウスでは著明に抑制されていた一方で、PHA 投与マウスでは対照群とあまりさがなく、2 剤投与マウスでは逆に活性が上昇していた。これは、IL-6 シグナルのブロックに対し、他のシグナル伝達経路が活性化し、肝再生を補っていると解釈が可能である。分子 2 (M2) は、AKT シグナルのさらに下流に存在するが、この分子は MR-16 および PHA 投与マウスそれぞれで軽度の活性化抑制が起こり、2 剤投与群では相乗効果的に活性化抑制がみられた。双方のシグナル伝達経路で共通した分子となっており、肝再生における Regulation molecule である可能性が示唆された。



IL-6 および HGF の活性化をそれぞれ単独に抑制することで、70%肝切除における肝再生の進行はやや抑制される結果であったが、重量比による有意差まではえられなかった。一方で、IL-6、HGF の両方を抑制したモデルでは、対照群に比べ優位に肝再生を抑制した。本研究で、IL-6、HGF の両方を抑制した肝再生モデルでは、対照群に比べ優位に肝再生を抑制し、シグナル伝達経路の解析から、特徴的ないくつかの分子が同定された。特に M2 は、肝再生制御における重要な役割を果たしている可能性があり、今後の発展的研究が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 和田 浩志

ローマ字氏名: Wada Hiroshi

所属研究機関名: 地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)

部局名: 消化器外科

職名: 副部長

研究者番号(8桁): 00572554

研究分担者氏名: 浅岡 忠史

ローマ字氏名: Asaoka Tadafumi

所属研究機関名: 大阪大学

部局名: 医学系研究科

職名: 助教

研究者番号(8桁): 60528470

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: