

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010~2011

課題番号：21790263

研究課題名（和文） TRB ファミリーの機能解析による肝疾患の統合的理解

研究課題名（英文） Role of TRB family in liver disease

研究代表者

西條 栄子 (SAIJOU EIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・技術職員

研究者番号：60376647

研究成果の概要（和文）：肝臓は生体の恒常性を担う臓器であり、エネルギーの貯蔵、代謝、解毒作用など多種多様な機能を備えている。転写因子 C/EBP $\alpha$  は出生後に必須の糖新生系やアンモニア代謝系酵素の発現を制御する重要な転写因子である。TRB ファミリーの TRB1 は肝芽細胞に強く発現し、過剰発現により肝細胞分化マーカーの発現を負に制御した。対照的に、TRB1 欠損マウスでは肝細胞分化マーカーの発現が増加した。Luc アッセイの結果、肝芽細胞において TRB1 は量依存的に C/EBP $\alpha$  の転写活性を抑制する因子であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：TRB family member TRB1 was expressed in hepatoblast fraction in E14 fetal liver of mouse. Overexpression of TRB1 induced suppression of hepatocyte differentiation marker TAT. In contrast, hepatocyte differentiation marker expression was increased in fetal liver of TRB1 deficient mouse. Luciferase assay revealed that TRB1 inhibits C/EBP $\alpha$  transcriptional activity in a dose dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学

## 1. 研究開始当初の背景

Tribbles は、ショウジョウバエにおいて、細胞周期調節因子 CDC25 オルソログの String、転写因子 C/EBP オルソログの Slbo のタンパク分解を促進する因子としてとして単離された。哺乳類では、Tribbles オルソ

ログとして TRB1、TRB2、TRB3 の3つのファミリー分子が同定されており、TRB3 は、インスリンシグナルを調節することによりグルコースホメオスタシスに寄与することが報告されていたが、タンパク分解との関連

は不明であった。

申請者らは、TRB ファミリー分子による C/EBP のタンパク分解に焦点を当て、C/EBP が重要な役割を果たす脂肪細胞分化をモデル系として解析を行った。その結果、TRB2 が脂肪細胞分化誘導に応答して発現が減少すること、TRB2 の恒常的な発現は、C/EBP  $\beta$  のタンパク分解を介して脂肪細胞分化を抑制することが明らかになり、TRB ファミリー分子による C/EBP 分解機構が哺乳類でも保存されていることが示された (Naiki, Saijou et al. J Biol Chem 2007)。

TRB2 の C/EBP への関与については、マウス造血幹細胞において TRB2 を過剰発現することにより、C/EBP  $\alpha$  のタンパク分解を引き起こすこと、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia ; AML) の患者では、TRB2 の発現が亢進していることも報告されている (Tobias et al. Cancer Cell 2006)。このように、TRB2 が C/EBP のタンパク分解を促進することにより、細胞の分化や増殖を調節することが明らかになりつつある。

C/EBP  $\alpha$  は、出生後の肝臓の分化・増殖においても重要な役割を果たす分子である。肝細胞は、胎児期には増殖が活発であるが、成体では代謝酵素などを発現し、増殖を停止する。C/EBP  $\alpha$  は、出生後の代謝酵素の発現誘導、細胞増殖の抑制の両面で機能する分子である。TRB2 の発現は、胎児期に高く、成体では低い(図 1、未発表データ)。肝臓が損傷を受けた際には C/EBP  $\alpha$  による細胞増殖抑制は解除され、細胞周期が再び進行する。興味深いことに、細胞が増殖する肝再生期において、再び TRB2 の発現上昇が観察された(図 1、未発表データ)。

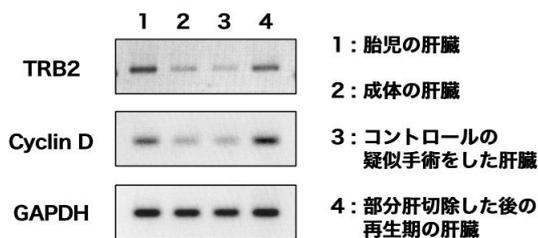


図 1 肝臓における TRB2 の発現  
細胞増殖の指標としてサイクリン D を、コントロールとして GAPDH を示した。

C/EBP  $\alpha$  の肝細胞の増殖への関与について、肝臓の細胞では C/EBP  $\alpha$  の機能が抑制されていること (Wang et al. Genes Dev 2004)、C/EBP  $\alpha$  の発現を亢進させることにより癌の罹患率が低下することが報告されている (Tan et al. Cancer Res 2005)。TRB2 に関して、肝臓との関連を検討した結果、サイクリン D の発現が上昇し細胞増殖が亢進している肝臓モデルマウスの肝臓では、TRB2 の発現上昇がみられた (図 2、未発表)。

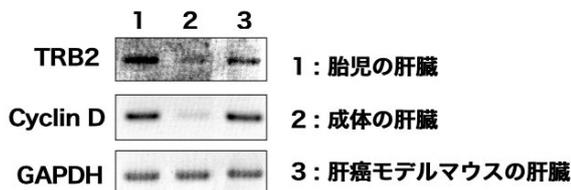


図 2 肝臓における TRB2 の発現  
細胞増殖の指標としてサイクリン D を、コントロールとして GAPDH を示した。

このような TRB2 の発現と細胞増殖との関連から、胎児期の肝細胞においては、TRB2 により C/EBP  $\alpha$  の機能が OFF にされているが、成体の肝細胞において TRB2 の発現低下により、C/EBP  $\alpha$  の機能が ON になり、肝再生期や肝臓では、TRB2 の発現上昇により、C/EBP  $\alpha$  の機能が OFF に調節される可能性が示唆されている

申請者は、肝臓の肝実質細胞に加え、肝星細胞において C/EBP が関与する現象にも研

究対象を広げつつある。肝星細胞はビタミン A を脂質滴として貯めているが、炎症により活性化すると肝線維化・肝硬変の実態である細胞外マトリクスを分泌する。通常時の脂質滴を蓄えた星細胞には、C/EBP  $\alpha$  および C/EBP  $\beta$  が発現しているが、活性化した星細胞では、C/EBP  $\alpha$  および C/EBP  $\beta$  の発現は低下すること、C/EBP  $\alpha$  の過剰発現は、星細胞の活性化を阻害することが報告されている (Huang et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2004)。TRB2 が、C/EBP の抑制を介して星細胞の活性化に関与する可能性について検討するためには、肝臓内の少数の星細胞を肝実質細胞と区別して評価する必要がある。申請者の所属する研究室では、星細胞の表面マーカータンパク質として p75 を同定し、p75 特異的な抗体とセルソーターを用いて星細胞を高度に分離する手法を確立しており (Suzuki et al. *Gastroenterology* 2008)、星細胞の動態を肝実質細胞と区別して評価する実験系が整いつつある。

## 2. 研究の目的

TRB ファミリー分子の研究は、TRB3 がグルコース代謝、メタボリックシンドロームとの関連性が注目を浴び、論文も多い。一方、肝疾患との関連については全く知られていない。本研究の目的は、独自に見出した C/EBP が関与する現象と TRB2 の発現の相関関係から出発し、肝臓の発生、肝硬変から肝臓へと至る過程において、病態の中心となる星細胞、肝実質細胞に焦点を絞り、TRB ファミリーの作用機序を明らかにすることである。肝硬変、肝臓では、「C/EBP の不活性化」という事実はあるが、その実像は不明である。本研究の意義は、肝臓に絡んだ「C/EBP の不活性化」の謎について、「TRB ファミリーによる C/EBP 制御」という観点から理解を深めることにある。

## 3. 研究の方法

マウス E14 胎児肝臓を酵素処理し、Dex、オンコスタチン M (OSM) などを含む培地で培養すると、成熟した肝細胞にまで分化する。この系に遺伝子導入をすることにより、注目している因子の過剰発現による肝細胞分化への影響を探ることができる。本研究では、TRB1 もしくは TRB2 のノックアウトマウスを導入した。これらのマウスの胎児肝臓を胎児肝培養系にて培養し、遺伝子欠損の肝細胞分化への影響を探った。また、胎児肝培養系を用いて Luc アッセイを行い、TRB の C/EBP  $\alpha$  転写活性に与える影響を検討した。

## 4. 研究成果

肝臓は生体の恒常性を担う臓器であり、エネルギーの貯蔵、代謝、解毒作用など多種多様な機能を備えている。多くの肝機能は出生前後に発現し、そのために多くの転写因子が関与する。我々は、C/EBP  $\alpha$  が出生後に必須の糖新生系やアンモニア代謝系酵素の発現を制御する重要な転写因子であることを報告している。まず、肝発生における TRB ファミリーの役割について検討した。E14 胎児肝臓において、TRB1 は将来肝細胞および胆管上皮細胞に分化する肝芽細胞画分に強く発現していた (図 3)。

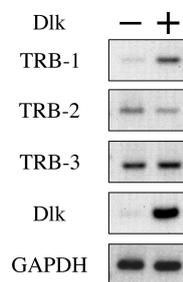


図 3 TRB1 は肝芽細胞画分に発現する

次に、胎児肝培養系にて TRB1 を過剰発現すると、肝細胞分化マーカー TAT の発現が抑制された (図 4)。

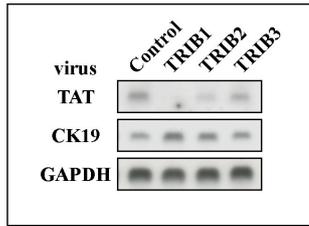


図4 TRB1 の過剰発現は肝細胞分化マーカーの発現を抑制する

対照的に、TRB1 欠損マウスの胎児肝培養系、および、出生前後の肝臓においては、肝細胞分化マーカーTAT の発現が促進されていた (図5)。

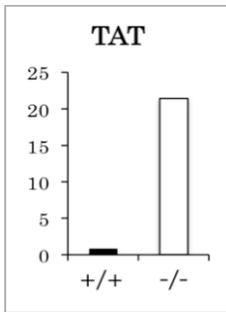


図5 TRB1 の欠損は肝分化マーカーの発現を促進する (定量 RT-PCR)

TRB1 の欠損は、胆管分化マーカーCK19 の発現を抑制しなかったことから、TAT の上昇は分化の方向性を変化させるためではないことが判明した。TRB1 が肝芽細胞で肝細胞分化マーカーTAT の発現を抑制する機構を検討するため、C/EBP $\alpha$  のタンパク質量をウエスタンブロットで検討したところ、野生型およびTRB1 欠損マウスの間では差が見られなかった。しかしながら、Luc アッセイにて C/EBP $\alpha$  応答エレメントからの転写活性に与える TRB1 発現の効果を検討したところ、TRB1 の量依存的に転写活性が減少した (図6)。

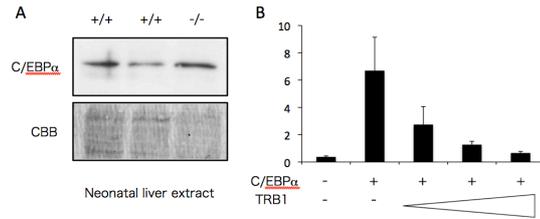


図6 TRB1 は C/EBP $\alpha$  の転写活性を抑える A ウエスタン B Luc アッセイ

したがって、TRB1 は C/EBP $\alpha$  のタンパク質量を減少させるのではなく、転写活性を抑えることで肝細胞分化を負に調節する因子であることが判明した。今後は成体肝臓での TRB1 の機能を探っていく予定である。

## 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)

[学会発表] (計2件)

(1) 発表者名 西條 栄子、内木 隆寛、宮島 篤  
演題 Tribbles2 (TRB2)による肝細胞成熟制御

学会 第19回肝細胞研究会

場所 札幌医科大学臨床研究棟講堂

発表日 2012年6月29日

(2) 発表者名 西條 栄子、内木 隆寛、宮島 篤

演題 肝臓の発生および代謝機能獲得におけるTribbles遺伝子の役割

学会 第35回日本分子生物学会年会

場所 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

発表日 2012年12月12日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 栄子 (SAIJOU EIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・技術職員

研究者番号：60376647