

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462046

研究課題名(和文)肝血流低下による肝萎縮機構の解明とLSKLpeptideを用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)The mechanism of liver atrophy after portal vein hypoperfusion and therapeutic method using LSKL peptide

研究代表者

生田 義明 (IKUTA, Yoshiaki)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：70452894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスを用いて右門脈を結紮して部分的な肝萎縮を誘導した。結紮肝(萎縮肝)ではPCNAの発現は結紮後6時間をピークに上昇し、その後発現は低下した。TUNEL染色では核の染色が増加した。結紮肝では術後6時間以降、肝細胞細胞質でのTSP-1の発現が上昇した。また、肝切除術のため、門脈結紮術を行ったヒトの結紮肝、非結紮肝に対してcDNA microarrayを行い、132遺伝子のうち、TSP-1が非結紮肝に比較して結紮肝で最も発現が上昇していた。以上より、門脈血流の低下は肝細胞におけるTSP-1の発現上昇を促し、肝細胞の増殖抑制とアポトーシスが誘導されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Liver atrophy was induced right portal vein ligation of wild type mouse. PCNA expression elevated at 6 hour after portal vein ligation and decreased thereafter in ligated liver (atrophic liver). TUNEL stained nuclei in liver cells increased over time. TSP-1 expression in cytoplasm of ligated liver increased since 6 hour after portal vein ligation. cDNA microarray assay was performed on ligated and non-ligated human liver for therapeutic hepatectomy. TSP-1 was most induced among 132 genes in ligated liver than in none ligated liver. These results show hypoperfusion of portal vein induce TSP-1 expression in hepatocyte and suppress proliferation and induce apoptosis of hepatocyte.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：門脈血流低下 肝萎縮 TSP-1 肝細胞増殖抑制 肝細胞アポトーシス誘導

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓は、門脈(80%)と肝動脈(20%)より栄養されるが種々の原因(腫瘍、血栓、器質的狭窄など)により、静脈系である門脈血流は容易に低下し、肝萎縮、さらには肝不全を引き起こす。これまでに多くの肝再生機構に関する研究は行われているが、肝萎縮の分子機構に関しては全く不明である。TGF- $\beta$  は強力な肝細胞増殖抑制因子であるが、申請者は、TGF- $\beta$  活性化因子として知られる Thrombospondin-1 (TSP-1)が障害を受けた肝類洞内皮細胞から誘導され TGF- $\beta$ -Smad シグナルを活性化することで肝再生を負に制御していることを明らかにした(Hepatology, 2012)。これまでの実験結果と研究報告から門脈血流低下による肝萎縮には TSP-1 を介した TGF- $\beta$ -Smad シグナルの活性化が関与するという仮説に基づいて、本研究では門脈血流低下に起因する肝萎縮機構の解明さらには肝萎縮に対する新規治療開発の基礎を築くことを目的とする。

## 2. 研究の目的

a) 門脈血流低下に起因する肝萎縮・肝不全  
肝臓は、門脈と肝動脈の2系統の血管により栄養されるがその多くを門脈血流に依存しており、静脈系である門脈血流は器質的狭窄、腫瘍、血栓などにより容易に低下し、当該領域の肝萎縮をきたす。広範囲の門脈血流低下あるいは肝硬変を背景肝とする際には肝不全に至る可能性もある。

b) 肝再生における TGF- $\beta$ -Smad シグナルの解析

われわれは 70%肝切除術の術後早期に TSP-1 が誘導され TGF- $\beta$ -Smad シグナルを活性化することで肝再生が抑制されることを明らかにした(図1)。肝切除後には活性酸素が産生され、障害を受けた肝類洞内皮細胞で TSP-1 が産生される。この TSP-1 は細胞外マトリックスに貯蔵された TGF- $\beta$  を活性化し、TGF- $\beta$  受容体への結合を可能にし、リン酸化された Smad2 (pSmad2) は核内に移行して肝細胞の増殖抑制もしくは細胞死を誘導する。野生型マウスと比較して TSP-1 ノックアウトマウスでは術後 6-12 時間での Smad2 のリン酸化が抑制され、術後 24 時間後の BrdU の核内取り込みの増加を認め、TUNEL 陽性細胞も減少した(図2)。すなわ

ち、TSP-1 を介した TGF- $\beta$ -Smad シグナルは肝細胞に対して、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導していると考えられる。

c) TSP-1 inhibitory peptide (LSKL peptide) 投与による肝細胞増殖促進効果  
また、野生型マウス(C57BL/6J)に対し、70%肝切除術を行い、TSP-1 に対する inhibitory peptide である LSKL peptide を投与することで、control 群と比較して LSKL peptide 投与群で Smad2 のリン酸化が抑制され、肝細胞における BrdU の取り込みの増加を認めた(図3)。つまり、TSP-1 に対する inhibitory peptide 投与により TGF- $\beta$  の活性化を抑制し、肝再生が促進されることを見出した。

d) 門脈血流低下モデルを用いた肝萎縮メカニズムの解明

門脈血流低下による肝萎縮においても障害を受けた肝類洞内皮細胞から TSP-1 分泌が誘導され、TGF- $\beta$ -Smad シグナルを活性化すること肝萎縮が誘導されていると予想される。本研究では野生型マウス(C57BL/6J)を用いて左右門脈のうち右門脈を結紮して部分的な肝萎縮を誘導する(結紮肝)。基礎実験では、門脈血流が低下した結紮肝の肝類洞内皮細胞での TSP-1 の発現上昇および肝細胞の核内でのリン酸化 Smad2 の上昇を免疫染色で確認した。さらに肝細胞での TUNEL 染色の濃染を認めた(図4)。すなわち、門脈血流が低下した結紮肝では TSP-1 の発現亢進とそれに引き続く TGF- $\beta$ -Smad シグナルの亢進により、肝細胞死が誘導されている可能性がある。

本研究ではさらに TSP-1 inhibitory peptide (LSKL peptide) を用いて、TSP-1 を介した TGF- $\beta$  シグナルを抑制することで肝細胞死抑制効果ひいては肝萎縮に対する新規治療開発を目指す。

## 3. 研究の方法

野生型マウス(C57BL/6J)を全身麻酔下にて、腹壁を正中切開し、右門脈を結紮する。対照群として sham 手術群を作成する。モデル作成後 6、24、48、72、168、336 時間に sacrifice する。萎縮肝における、TSP-1 の発現、Smad2 のリン酸化を Western blotting および免疫化学染色で評価し、control 群と比較する。また、Smad2 以下のシグナルについて細胞周

期関連因子である p21、cyclin A2、cyclin D1 の mRNA の発現を real time PCR にて解析し、門脈血流低下による細胞周期停止を確認する。さらに TGF- $\beta$ 1-Smad シグナルの活性化で誘導される細胞死を TUNEL 染色で定量的に評価する。また、TSP-1 inhibitory peptide である LSKL peptide を閉腹時および術後 6 時間後に腹腔内に 30mg/kg 投与し、萎縮肝での肝細胞死抑制効果ならびに肝萎縮抑制効果を Smad2 のリン酸化、細胞周期関連因子の mRNA 発現、TUNEL 染色、肝重量の定量により判定する。

#### 4. 研究成果

門脈血流低下による肝萎縮において障害を受けた肝類洞内皮細胞から TSP-1 分泌が誘導され、TGF- $\beta$ 1-Smad シグナルを活性化することで肝萎縮が誘導されていると予想される。野生型マウス (C57BL/6J) を用いて左右門脈のうち右門脈を結紮して部分的な肝萎縮を誘導した。門脈の結紮を行った肝右葉を結紮肝、結紮を行わなかった肝左葉を非結紮肝とした。門脈結紮したマウスは術後 6 時間、24 時間、48 時間後に sacrifice し、結紮肝および非結紮肝を摘出した。各タイミングで 5 匹の門脈結紮マウスを作成した。

摘出した肝臓は緩衝ホルマリン液に固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色、抗 PCNA 抗体による免疫染色、TUNEL 染色を行った。

結紮肝 (萎縮肝) では術後 6 時間以降に類洞の拡張を認め、48 時間以降で肝細胞核におけるヘマトキシリンの染色性が低下した。また、PCNA の発現は結紮後 6 時間をピークに上昇し、その後発現は低下した。TUNEL 染色は術後 6 時間後核の染色が増加した。一方、非結紮肝 (肥大肝) では術後 6 時間以降、PCNA の発現が上昇した。TUNEL 染色では核の染色は認めなかった。

抗 TSP-1 抗体および抗 pSmad2 抗体による免疫染色にて結紮肝では術後 6 時間以降、肝細胞細胞質での TSP-1 の発現は上昇し、核での pSmad2 の発現も上昇した。非結紮肝では肝細胞細胞質内での TSP-1 の発現、核での pSmad2 の発現を認めなかった。

また、肝切除術のため、門脈結紮術を行ったヒトの結紮肝、非結紮肝に対して cDNA microarray を行い、132 遺伝子のうち、TSP-1 が非結紮肝に比較して結紮肝で発現が最も

発現が上昇していた。

すなわち、門脈血流の低下は肝細胞における TSP-1 の発現上昇を促し、TGF- $\beta$ 1-Smad2 シグナルを介して肝細胞の増殖抑制とアポトーシスが誘導されていることが示唆された。

#### 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 5 件)

1. Heat injury to the inferior vena cava by bipolar tissue sealer.  
Chikamoto A, Kaida T, Arima K, Higashi T, Taki K, Ida S, Okabe H, Nitta H, Hayashi H, Hashimoto D, Watanabe M, Beppu T, Baba H. *Surg Endosc*. 2016 Apr;30(4):1519-22. DOI: 10.1007/s00464-015-4365-9. 査読有、オープンアクセス無、謝辞記載無
2. An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Cell-like Behaviors Contributing to Disease Progression.  
Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Oki E, Beppu T, Baba H. *Cancer Res*. 2015 15;75(22):4985-97. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-0291. 査読有、オープンアクセス無、謝辞記載無
3. Prognostic value of Ki-67 expression in conversion therapy for colorectal liver-limited metastases.  
Hayashi H, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yokoyama N, Higashi T, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Baba H. *Am J Cancer Res*. 2015 15;5(3):1225-33. DOI: 10.1007/s00464-015-4365-9. 査読有、オープンアクセス無、謝辞記載無
4. Functional assessment versus conventional volumetric assessment in the prediction of operative outcomes after major hepatectomy.  
Hayashi H, Beppu T, Okabe H, Kuroki H, Nakagawa S, Imai K, Nitta H, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H. *Surgery*. 2015 Jan;157(1):20-6. DOI: 10.1016/j.surg.2014.06.013. 査読有、オープンアクセス無、謝辞記載無

5. Thrombospondin-1 expression may be implicated in liver atrophic mechanism due to obstructed portal venous flow.  
Hayashi H, Kuroki H, Higashi T, Takeyama H, Yokoyama N, Okabe H, Nitta H, Beppu T, Takamori H, Baba H.  
**Hepatology Res.** 2016 Aug 18. [Epub ahead of print]  
 DOI: 10.1111/hepr.12792.  
 査読有、オープンアクセス無、謝辞記載有

〔学会発表〕(計 5 件)

- 第 117 回日本外科学会定期学術集会 ワークショップ・肝再生を考慮した肝切除 基礎から臨床へ 【International】 2017 年 4 月 27 日(パシフィコ横浜 神奈川県)  
 「肝再生および肝萎縮におけるトロンボスポンディン 1 の役割解明と臨床応用への探索」  
林 洋光、黒木 秀幸、東 孝暁、武山 秀晶、岡部 弘尚、新田 英利、橋本 大輔、近本 亮、別府 透、高森 啓史、馬場 秀夫
- 第 116 回日本外科学会定期学術集会 ポスターセッション  
 2016 年 4 月 16 日(大阪国際会議場 大阪府)  
 「肝切除後の血漿中 Thrombospondin-1 変化の肝障害の予測因子としての可能性-The change of Thrombospondin-1 in plasma after hepatectomy is useful for predicting perioperative liver damage-」  
 黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東 孝暁、橋本 大輔、新田 英利、近本 亮、石河隆敏、別府 透、馬場 秀夫
- 第 116 回日本外科学会定期学術集会 ポスターセッション  
 2016 年 4 月 15 日(大阪国際会議場 大阪府)  
 「Hippo-pathway を介した幹細胞性獲得機構の解明と治療への応用」  
林 洋光、東 孝暁、横山 奈穂美、甲斐田 剛圭、新田 英利、橋本 大輔、近本 亮、別府 透、高森 啓史、馬場 秀夫
- 第 27 回日本肝胆膵外科学会 一般演題  
 2015 年 6 月 12 日(ホテル グランパシフィック LE DAIBA 東京都)  
 「TSP-1 を介した TGF- $\beta$  活性化機構抑制による肝切除術後の肝再生促進療法」  
 黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東

孝暁、橋本 大輔、新田 英利、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫

- 第 51 回日本肝臓学会総会 一般演題  
 2015 年 5 月 21 日(ホテル日航熊本 熊本県)  
 「肝切除術後早期における血漿中 Thrombospondin-1 の術後肝障害の予測因子としての可能性」  
 黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東 孝暁、橋本 大輔、新田 英利、近本 亮、石河隆敏、別府 透、馬場 秀夫

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

生田 義明 (IKUTA, Yoshiaki)  
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
 研究者番号: 70452894

##### (2) 研究分担者

近本 亮 (CHIKAMOTO, Akira)  
 熊本大学・医学部附属病院・准教授  
 研究者番号: 10419640

馬場 秀夫 (BABA, Hideo)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授  
 研究者番号: 20240905

林 洋光 (HAYASHI, Hiromitsu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
 研究者番号: 80625773

##### (3) 連携研究者

無し

##### (4) 研究協力者

黒木 秀幸 (KUROKI, Hideyuki)  
 熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
 研究者番号: 50594876

三宅 慧輔 (MIYAKE, Keisuke)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・リサーチスペシャリスト  
 研究者番号: 無し