

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10167

研究課題名(和文) 脂肪肝の再生に於けるオートファジーの役割と分子機序の解明

研究課題名(英文) The roles of autophagy in liver regeneration in a steatotic liver

研究代表者

池上 徹 (IKEGAMI, Toru)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80432938

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)：オートファジー関連遺伝子(Atg5)のノックアウトマウスを作成し、70%肝切除時の再生肝を経時的に採取し、BrdU取り込み率、CyclinD1の活性、細胞周期S期への移行、血清ALT値などを比較検討することで、オートファジーの役割を明らかにすることができた。オートファジーKOマウスにおいて核の増殖能の低下(BrdU取り込み率の低下)、障害蛋白質の蓄積(p62蛋白質の蓄積)、血清アルブミン値の低下を術後早期に認めた。p21蛋白質に起因する細胞周期の遅延(細胞周期G2やS期の減少、CyclinDの低発現)や、肝組織中ATPの低下、細胞老化(cell senescence)の促進が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Murine autophagy suppressed model with Atg5 gene knock out was created using Cre-lox system, followed by hepatic resection and serial sampling of the regenerating liver tissues. It revealed reduced hepatic BrdU intake, accumulated p62 protein (injured protein), lowered serum albumin, p21 protein associated delayed cell cycle turn over with rescued G2 and S, and lower repression of Cyclin D1. These observation was also confirmed using fatty liver autophagy Ko model. In abnormal liver condition including massive hepatectomy, fatty liver, non-alcoholic steatosis, diabetes associated liver disease, autophagy is significantly suppressed and smooth regeneration was impaired.

研究分野：肝再生

キーワード：肝再生 オートファジー

### 1. 研究開始当初の背景

近年、メタボリック症候群の蔓延とウイルス性肝炎の減少により、近未来的に脂肪肝・NASH 関連肝疾患は我が国に於ける主要肝疾患になると予想される。肝臓外科領域においては、NASH を背景とした肝脂肪化は肝切除に伴う肝不全のリスクを極めて高くする。オートファジーはそもそも細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つであり、細胞内タンパク質の分解と合成に重要な働きを担っている。すなわち細胞内での異常タンパクの蓄積の防止、細胞内エネルギー環境の変化に対するエネルギーリサイクルなど細胞の恒常性維持に参与している。肝特異的オートファジー不能マウスにおいては、定常状態に於いても肝細胞内に異常オルガネラの蓄積を伴った肝障害が惹起されることが明らかとなっており、オートファジーは肝細胞の恒常性維持に極めて重要な役割を果たしている。

### 2. 研究の目的

今回我々はこの研究課題に対し、オートファジーを利用する。オートファジーは細胞内の蛋白質再編成とエネルギー産生に極めて重要な役割を果たしており、肝再生という高度に組織化された生命現象をコントロールする可能性は極めて高いと考えられるが、肝再生における役割はいまだ不明である。

今回の研究では、正常マウスの肝再生におけるオートファジーの動態評価の結果をもとに、オートファジーノックアウトマウスを用いた基礎的研究を行うとともに、種々の病態(脂肪肝・非アルコール性脂肪肝炎・肝硬変モデル)においてオートファジーの制御による肝再生治療実用化にむけた基礎的研究を行う。

### 3. 研究の方法

正常肝及び病的肝(大量肝切除後、脂質代謝異常に基づく脂肪肝・非アルコール性脂肪肝炎・糖尿病などの再生におけるオートファジーの役割を明らかにし、オートファジーの制御を利用した肝再生治療実用化を目的として研究を計画した。

A. オートファジーKO マウスを用いた肝再生におけるオートファジー抑制の影響に関する検討(コントロールマウスとの比較)  
肝重量体重比、BrdU 取り込み率、肝組織 ATP、肝脂質量の変化、ミトコンドリアを介した酸化によるエネルギー産生を検討し、肝再生過程におけるオートファジーの役割を明らかにする。

B. 病的肝の再生過程における、オートファジーの役割に関する検討

A と同様の実験を病的肝(大量肝切除後、脂質代謝異常に基づく脂肪肝・非アルコール性脂肪肝炎・糖尿病など)で行い、病的肝におけ

る肝再生の分子機序解明をひも解く。モデルは下記の通りである。

大量肝切除モデル: 90%肝切除モデル、脂肪肝・NASH モデル: 高脂肪食ウェスチン試料、肝硬変モデル: CCl<sub>4</sub> 投与

### 4. 研究成果

(1) マウス再生肝においてオートファジー(AP)の発現は術後 12 時間後より高値となり以降漸減した。AP 抑制によって cyclin D1 の発現低下及び細胞周期 S 期の減少した。(3) オートファジーKO マウスでは、肝組織 ATP の低下を認めるとともに、BrdU 取込率の低下、血清 ALT 及びアポトーシス増加、ユビキチン化蛋白質の蓄積を認めた。ミトコンドリア(Mt)の障害を認めるとともに 酸化関連酵素の低発現を認めた。以上より、AP は再生時の肝細胞で活性化し、肝再生に重要な役割を果たしていた。この機序としては Mt における酸化を介したエネルギー産生が重要であると考えられた。

### 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 10 件)

1. Sugiyama M, Yoshizumi T, Yoshida Y1, Bekki Y, Matsumoto Y, Yoshiya S, Toshima T, Ikegami T, Itoh S, Harimoto N, Okano S, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y. p62 Promotes Amino Acid Sensitivity of mTOR Pathway and Hepatic Differentiation in Adult Liver Stem/Progenitor Cells. 査読有、Cell Physiol. 2017;232:2112-2124. doi: 10.1002/jcp.25653.
2. Ikegami T, Ueda Y, Akamatsu N, Ishiyama K, Goto R, Soyama A, Kuramitsu K, Honda M, Shinoda M, Yoshizumi T, Okajima H, Kitagawa Y, Inomata Y, Ku Y, Eguchi S, Taketomi A, Ohdan H, Kokudo N, Shimada M, Yanaga K, Furukawa H, Uemoto S, Maehara Y. Asunaprevir and daclatasvir for recurrent hepatitis C after liver transplantation: A Japanese multicenter experience. Clin Transplant. 査読有、2017;31.doi:10.1111/ctr.13109.
3. Ikegami T, Shimagaki T, Kawasaki J, Yoshizumi T, Uchiyama H, Harada N, Harimoto N, Itoh S, Soejima Y, Maehara Y. Eversion Technique to Prevent Biliary Stricture After Living Donor Liver Transplantation in the Universal Minimal Hilar Dissection Era. Transplantation. 査読有、2017;101:e20-e25. doi: 10.1097/TP.

4. Ikegami T, Yoshizumi T, Yoshida Y, Kurihara T, Harimoto N, Itoh S, Shimokawa M, Fukuhara T, Shirabe K, Maehara Y. Telaprevir versus simeprevir for the treatment of recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. 査読有、Hepatol Res. 2016;46:E136-45. doi: 10.1111/hepr.12546.
5. Ikegami T, Yoshizumi T, Sakata K, Uchiyama H, Harimoto N, Harada N, Itoh S, Nagatsu A, Soejima Y, Maehara Y. Left lobe living donor liver transplantation in adults: What is the safety limit? Liver Transpl. 査読有、2016;22:1666-1675. doi: 10.1002/lt.24611.
6. Kimura K, Shirabe K, Yoshizumi T, Takeishi K, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Uchiyama H, Okano S, Maehara Y. Ischemia-Reperfusion Injury in Fatty Liver Is Mediated by Activated NADPH Oxidase 2 in Rats. Transplantation. 査読有、2016;100:791-800. doi: 10.1097/TP.0000000000001130.
7. Morita K, Shirabe K, Taketomi A, Soejima Y, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Yamashita Y, Sugimachi K, Harimoto N, Itoh S, Ikeda T, Maehara Y. Relevance of microRNA-18a and microRNA-199a-5p to hepatocellular carcinoma recurrence after living donor liver transplantation. Liver Transpl. 査読有、2016;22:665-76. doi: 10.1002/lt.24400.
8. Shimoda S, Hisamoto S, Harada K, Iwasaka S, Chong Y, Nakamura M, Bekki Y, Yoshizumi T, Shirabe K, Ikegami T, Maehara Y, He XS, Gershwin ME, Akashi K. Natural killer cells regulate T cell immune responses in primary biliary cirrhosis. Hepatology. 査読有、2015;62:1817-27. doi: 10.1002/hep.28122.
9. Takeishi K, Maeda T, Shirabe K, Tsujita E, Yamashita Y, Harimoto N, Itoh S, Ikegami T, Yoshizumi T, Maehara Y. Clinicopathologic Features and Outcomes of Non-B, Non-C Hepatocellular Carcinoma After Hepatectomy. Ann Surg Oncol. 査読有、2015;22 Suppl 3:S1116-24. doi:

10.1245/s10434-015-4728-4.

10. Konishi H, Shirabe K, Nakagawara H, Harimoto N, Yamashita Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Oda Y, Maehara Y. Suppression of silent information regulator 1 activity in noncancerous tissues of hepatocellular carcinoma: Possible association with non-B non-C hepatitis pathogenesis. Cancer Sci. 査読有、2015;106:542-9.

〔学会発表〕(計 6件)

1. Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Recent progresses in understanding and treatment of small-for-size syndrome. 46th Congress of the Korean Association of HBP Surgery (Symposium). March 31 - April 1, 2017, Jeju, Korea
2. Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Hepatic anatomy and liver volume for living donor hepatectomy LDLT Study Group Colloquium in Vietnam (Symposium). February 18, 2017. Ho-Chi-Minh, Vietnam
3. Ikegami T, Harimoto N, Itoh S, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Small LL-LDLT: What is the lower limit? ILTS 22nd annual international congress (Symposium). May 4-7, 2016, Seoul, Korea
4. Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Harada N, Harimoto N, Itoh S, Nagatsu A, Motomura T, Maehara Y. Living Related Transplant: State of the Field. American Collage of Surgeons Clinical Congress 2016 (Panel symposium). October 16-20, 2016. Washington, DC, USA
5. Ikegami T, Harimoto N, Itoh S, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Small LL-LDLT: What is the lower limit? ILTS 22nd annual international congress (Symposium). May 4-7, 2016, Seoul, Korea
6. Ikegami T, Ninomiya M, Kayashima H, Yonemura Y, Hiroshige S, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y. Optimal volumetric assessment of liver volume. LDLT Study Group 2015 (Symposium). November 07-08, 2015, Seoul, Korea

〔産業財産権〕(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 徹 (IKEGAMI, Toru)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：80432938

(2) 研究分担者

副島 雄二 (SOEJIMA, Yuji)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：30325526

池田 哲夫 (IKEDA, Tetsuo)  
九州大学・大学病院・准教授  
研究者番号：60585701

吉住 朋晴 (YOSHIZUMI, Tomoharu)  
九州大学・医学研究院・准教授  
研究者番号：80363373

(3) 連携研究者

該当なし  
研究者番号：

(4) 研究協力者

該当なし