

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008 年度

課題番号：19590777

研究課題名（和文）肝再生治療への応用を目指した細胞周期関連分子の機能制御の基礎的検討

研究課題名（英文） The basic analysis of cell cycle association molecules by controlling the function aiming at application to liver regeneration treatment.

研究代表者

永濱 裕康（NAGAHAMA HIROYASU）

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60381000

研究成果の概要：

進行した肝疾患に対する肝再生医療は、肝硬変や劇症肝炎患者に対する治療として注目されている。本研究では細胞周期を制御する遺伝子に着目し、その遺伝子改変マウスの骨髄細胞を用いた移植を行い、その効果について検討した。急性肝障害モデル、慢性肝障害モデルいずれにおいても、ALT の改善、生存期間の延長、線維化の改善などの点で効果は認められたものの、有意差を得るまでには至らなかった。しかし肝組織内での遺伝子発現変化は DNA マイクロアレイを用いた解析では、早期より細胞周期関連分子の発現の上昇が認められた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2008 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓病学・再生・骨髄移植・トランスクリプトーム

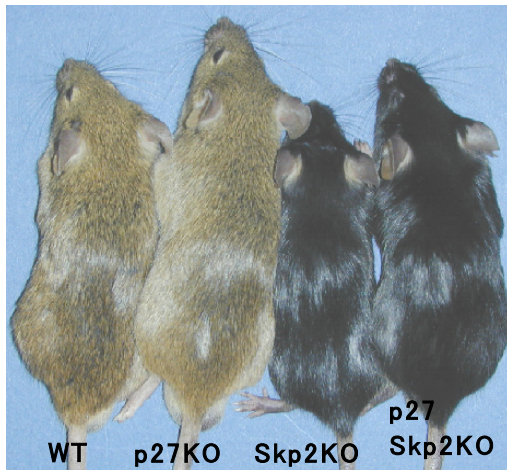
1. 研究開始当初の背景

(1) 肝は再生能力の強い臓器であるが、慢性肝疾患が原因で高度に進行した慢性肝不全ならびに発症後急速に進行する急性肝不全はいずれも肝再生能力が著明に低下した状態であり、致死性である。中でも劇症肝炎は、急激かつ広汎におこる肝細胞壊死に基づく高度の肝機能不全を起こす、極めて予後不良な疾患である。最近、生体肝移植がその治療法として導入されるようになり、以前より救命率は改善したものの、いまだ満足のいく結果は得られていない。また生体肝移植はドナー不足や移植後の拒絶といった問題

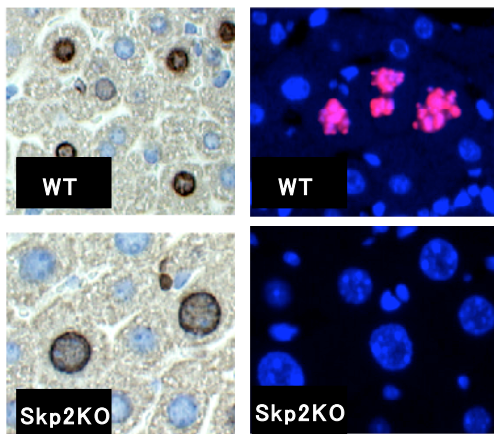
もあり、肝移植以外の侵襲の少ない治療法の開発が望まれる。近年自己骨髄細胞を用いた肝再生療法の有効性が報告され、これら肝不全への応用が期待されるが、頻回な自家骨髄移植は困難なため、その治療による有効性にも限界があることが報告されている。また肝再生自体についてもいまだ不明な点も多いため、そのメカニズムの解明が急務である。

(2) 我々はこれまでに細胞周期を負に制御する CDK インヒビターの一つである p27^{Kip1} が肝にも強い発現を認め、そのノックアウトマウスでは個体のサイズが大きくなるとともに、発生過程で肝を含

めた各臓器の肥大化を起こすことを報告してきた (Cell 1996、Dev.Cell 2004)。



また p27^{Kip1} のユビキチンリガーゼである Skp2 ノックアウトマウスを用いた解析では、個体のサイズが小さくなるとともに、肝切除モデルマウスを用いた研究において、肝細胞は M 期に入らず、細胞分裂を起こすことなく肝細胞の腫大をおこすことにより肝全体のサイズの回復が起こることも明らかにしている (Cancer Res. 2002)。



これは細胞数が増加して肝再生を起こす一般的な再生とは異なり、細胞分裂を経ない新たな肝再生メカニズムが存在することを示唆している。

2. 研究の目的

骨髄細胞移植による肝再生を人為的に亢進させることができるかを、細胞周期関連分子をノックアウトした様々なマウスを用いて、その骨髄細胞移植を行う事により解析する。さらに肝再生に関与する遺伝子の発現をトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を行う事により、新規の肝再生促進因子の同定を行い、新たな肝再生治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 正常マウスまたはノックアウトマウスの大腿骨

より採取した骨髄細胞を、細胞の生着の際の追跡マーカーとして PKH26GL で染色を行い、正常またはそれぞれのノックアウトマウスの肝障害モデルに移植した。その後の肝臓への生着率ならびに増殖速度を従来法で行ったものと比較検討した。また血清学的検査により肝機能の改善の程度を評価した。

(2) ヒトへの応用を視野に入れ、アデノウイルスベクターを用いた siRNA による細胞周期関連分子の発現調節を行い、その臨床応用への可能性を探る。

(3) 肝切除前後の遺伝子発現変化を DNA microarray を用いて網羅的に解析し、これらの遺伝子以外の肝再生を担う遺伝子群を明らかにする。さらに肝切除刺激により反応性に誘導される新規責任分子群を抽出するために、2 次元電気泳動、および LC-MS ショットガン法によるプロテオーム解析を行う。これらを分子ネットワーク解析にかけることで、候補となる新規の肝再生責任分子ならびに細胞分子内のシグナルネットワークを絞り込む。

(4) このようにして同定した責任分子群の発現調節を行うことによる、障害肝の再生への寄与について検討を行い、その結果を元に細胞周期関連分子の機能を制御する新たな治療法を開発する。

4. 研究成果

(1) 急性肝障害モデルでの検討

① CCl₄ を単回投与した急性肝障害モデルマウスを用いた検討では、投与後 2 日後に最も ALT の値が高値であった。p27^{Kip1} KO マウス由来の骨髄細胞を移植したマウス (p27^{Kip1} KO 群) では、野生型マウス由来の骨髄細胞を移植したマウス (野生型群) および非移植群 (コントロール群) と比べ、肝障害誘発後の ALT のピーク値は抑えられた。またアルブミン値についても測定を行ったが、これについては 3 群間で差は認められなかった。

② 次に肝細胞での細胞周期促進の有無を確認するために CCl₄ 投与後 2 日後の肝組織を用いて Ki67 の免疫染色を行い positive index (PI) を測定したところ、p27^{Kip1} KO 群で 30.5 ± 7.1%、野生型では 19.7 ± 6.7% と p27^{Kip1} KO 群で PI が高値であったが、有意差は認められなかった。また p27^{Kip1} KO 群では野生型よりも CCl₄ 投与早期より上昇が認められた。

③ さらに投与 5 日後の肝組織を用いた Ki67 の免疫染色では、野生型群、非移植群いずれも陽性細胞は認められなかったが、p27^{Kip1} KO 群では少数の陽性細胞を認め、弱いながらも細胞増殖促進の継続が示唆された。また、これ以降の肝組織では、いずれの群においても陽性細胞は認められなかった。

④ これらの結果は p27^{Kip1} KO 群で ALT 値のピー

ク値が抑えられたことと合わせ、細胞周期促進に働くシグナルを介した調節を行う事により、肝再生を早期から促進させ、肝障害を軽減させることができる可能性を示唆している。しかしながら、生存率については p27^{Kip1}KO では野生型に比べて改善傾向にはあったものの、有意差を得るまでには至らなかった。

(2) 急性肝障害モデルにおける遺伝子発現の変化についての検討

① このような肝障害時に肝再生、増殖が行われる際に、細胞周期が回転し始める際のトリガーとなる遺伝子を検索する為に DNA マイクロアレイを用いた網羅的解析を行った。CCl4 による刺激以前に p27^{Kip1}KO マウスにおいて野生型に比べ発現が増加している遺伝子を除外する為に、そのコントロールとして野生型と比較した発現変化を確認し、その後 CCl4 投与後 8 時間後にそれぞれのマウスの肝を取り出し、遺伝子発現の変化を比較した。

その結果 CCl4 非刺激では p27^{Kip1}KO マウスと野生型で 3952 遺伝子の発現の差異が認められ、CCl4 刺激後では野生型で 1389 遺伝子、p27^{Kip1}KO で 1186 の遺伝子の発現変化が認められた。このうち、CCl4 非刺激では野生型と p27^{Kip1}KO の比較で 1.5 倍以上の発現変化が認められたものが 135 遺伝子、0.67 倍以下に減少していた遺伝子が 379 認められた。さらにこれらの遺伝子群より、細胞周期に関連する遺伝子を中心に gene ontology(GO)にて絞り込みを行ったところ、p27KO で野生型と比べ発現変化が 1.5 倍以上であった遺伝子については、GO:82: G1/S transition of mitotic cell cycle は 1 遺伝子、GO:86: G2/M transition of mitotic cell cycle は 1 遺伝子、GO:74: regulation of progression through cell cycle は 6 遺伝子、GO:51726: regulation of cell cycle は 6 遺伝子、GO:45787: positive regulation of progression through cell cycle は 1 遺伝子など、それぞれの経路に促進系に関連すると考えられる遺伝子群の絞り込みが可能であった。

同様に p27KO で野生型と比べ発現変化が 0.67 倍以下であった遺伝子については、GO:320: re-entry into mitotic cell cycle は 2 遺伝子、GO:45839: negative regulation of mitosis は 1 遺伝子、GO:45787: positive regulation of progression through cell cycle は 1 遺伝子、GO:45786: negative regulation of progression through cell cycle は 2 遺伝子などと、主に細胞周期制御での抑制系に関連する遺伝子群の絞り込みが可能であった。これらの遺伝子については、現在解析、検討を行っている途中である。

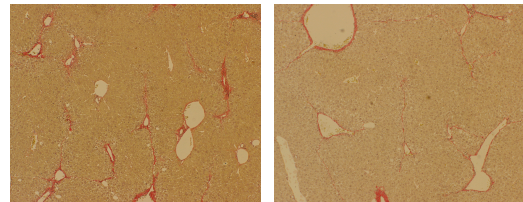
② 次に CCl4 による刺激後 8 時間での比較検討を行った。CCl4 刺激により野生型では 1.5 倍以上の発現の上昇が認められたのは 98 遺伝子、0.67 倍以下の発現低下が認められたのは 166 遺伝子であった。p27KO では 1.5 倍以上の発現の

上昇が認められたのは 521 遺伝子、0.67 倍以下の発現低下が認められたのは 325 遺伝子であり、野生型と比べ多くの遺伝子発現変化が認められた。野生型で 1.5 倍以上の発現変化が認められた遺伝子を GO にて絞り込みを行ったところ、GO:22403: cell cycle phase は 3 遺伝子、GO:82: G1/S transition of mitotic cell cycle は 1 遺伝子、GO:74: regulation of progression through cell cycle は 1 遺伝子など、絞り込みが可能であった。同様に野生型での発現変化が 0.67 倍以下であった遺伝子、p27KO での発現上昇、ならびに低下を認めた遺伝子についても GO による絞り込みを行い、現在解析中である。

③線維化に關与する MMP1、2、3、9、TIMP1、TIMP2 などの遺伝子発現の変化についても検討を行ったところ、いくつかの遺伝子については p27KO 群において有意に発現の変化が認められた。このことより、生存率には有意差が得られなかったものの、細胞周期制御分子を介しての肝障害改善を図る事は、再生治療を行う上で重要な位置を占めると考えられた。

(3) 慢性肝障害モデルでの検討

8 週間の長期にわたる CCl4 投与による慢性肝障害モデルマウスにおいては、急性肝障害モデルマウスと同様に、p27^{Kip1}KO マウス由来の骨髄細胞を移植したマウスでは野生型マウス由来の骨髄細胞移植と比べて、線維化の改善や生存率が改善傾向にあった。



野生型(左)では p27KO(右)に比べ線維化の改善が強い傾向にあった。

また、Ki67 の PI についても p27KO 群において野生型と比べ、陽性率が高い傾向にあった。しかし慢性モデルにおいても、急性モデルと同様に生存期間の延長、ならびに線維化の改善については有意差までは得られなかった。

このように、著明に進行した肝障害では、細胞周期制御による骨髄細胞移植のみでの予後改善効果には限界がある事が考えられた。

そこで、p27^{Kip1}KO を骨髄細胞移植のドナーとして用いるのではなく、レシピエントに用いて直接 CCl4 投与による影響について、急性実験で検討をおこなったところ、野生型と比べ有意に p27KO で生存期間の延長が認められた。そこでトランスクリプトーム解析の結果も踏まえて今後は、肝細胞そのものの増殖を誘発する事に焦点をあて、肝細胞における細胞周期関連分子の発現を直接制御する事により、細胞増殖を促

進する事が可能ではないかと研究を継続中である(平成 21 年度基盤研究 C『臨床応用を目指した細胞周期関連分子を介した肝再生促進メカニズムの解明』)

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)

①永濱 裕康、肝再生治療への応用を目指した細胞周期関連分子の機能制御の基礎的検討、Liver Forum in Kyoto 第 10 回学術集会記録集、65-70、2008、査読無し

[学会発表](計 1 件)

①永濱 裕康、肝再生治療への応用を目指した細胞周期関連分子の機能制御の基礎的検討、Liver Forum in Kyoto 第 10 回学術集会、2008 年 3 月 15 日、京都

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

永濱 裕康 (NAGAHAMA HIROYASU)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号:60381000

(2)研究分担者

佐々木 裕 (SASAKI YUTAKA)
熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号:70235282

中山 敬一 (NAKAYAMA KEIICHI)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号:80291508

(3)連携研究者