

平成 21年 6月 1日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007~2008
 課題番号： 19790488
 研究課題名 (和文) 肝細胞増殖因子により誘導され、抗アポトーシス分子の候補である N p n 3 の機能解析
 研究課題名 (英文) A functional analysis of HGF-induced Npn3, that is the candidate of the anti-apoptotic molecule.
 研究代表者
 森内 昭博 (MORIUCHI AKIHIRO)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号： 40359823

研究成果の概要：HGF 特異的に発現誘導される遺伝子として npn3 を同定した。さらに、human npn3 の発現ベクターを構築し、培養細胞へ遺伝子導入することでアポトーシス誘導に対して抵抗性を獲得することを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

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

1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子 (HGF) は種々の肝障害動物モデルにおいて生存率および肝機能を有意に改善させることが報告されている。このような結果を受けて、2002年7月から京都大学医学部附属病院探索医療センターにおいて「HGF肝再生医療プロジェクト」がスタートした。さらに、2005年9月から内科的治療による救命率が30%程度と予後不良の劇症肝炎患者を対象とした国内初の開発型医

師主導治験を開始している。一方、HGFの薬効はその肝細胞に対する増殖活性の誘導による肝再生によるばかりではなく、抗アポトーシス効果による肝細胞障害の進展阻止にもよると考えられている。HGFの抗アポトーシス効果はPI3K-Akt系によることが明らかになりつつあるが、その詳細は依然として不明であり、in vivoでの検討にいたってはほとんど進んでいなかった。In vivoでHGFの抗アポトーシス作用の責任分子が同

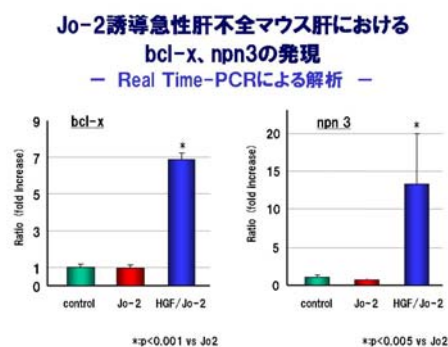
定できれば、劇症肝炎の治療薬の開発だけでなく、責任分子をターゲットとしたアポトーシス誘導ひいては癌治療薬の開発につながり、探索的創薬として相応しいテーマとして着想された。そこで我々は、2005年よりDNAマイクロアレイによる網羅的解析を用いた、HGFの抗アポトーシス作用の責任分子の同定を行なってきた。具体的にはagonisticな抗Fas抗体 (Jo-2) によって誘導される急性肝不全マウスを作製、このマウスにHGFを投与し非投与群とのmRNAの発現を網羅的に比較検討した。その結果、HGF特異的に発現誘導される遺伝子としてnpn3の同定に成功した。npn3は、抗アポトーシス作用を持つ分子として既知の分子であるbcl-xとパラレルな変動パターンを示し、HGFの抗アポトーシス効果発現に際して重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

HGFは成熟肝細胞の増殖を促進させる因子として発見されたが、種々の肝障害肝モデルにおいて肝障害の抑制、肝再生の促進および繊維化の抑制・改善などの多彩な生理作用を示すことが確認されている。rh-HGFによる肝再生医療の対象疾患である劇症肝炎は、その成因が多彩であり約50%をウイルス感染によるものが占める一方で、自己免疫性や薬物性がそれぞれ数%、成因不明も30%以上含まれる。その急激かつ広範な肝細胞障害と肝再生不全の引き金として、肝細胞のアポトーシスが関連していると考えられており、マウスのJo-2誘導急性肝不全モデルは人の劇症肝炎の病態を良く再現しているとされている (Kosai K. et al. Biochem Biophys Res Commun. 27: 683-690,

1998)。このモデルに対するHGFの効果は顕著であるが、その分子機構を詳細に解析した報告はなかった。

現在までの我々の検討から、npn3はJo-2誘導急性肝不全マウスモデルに対するHGFの劇的な作用を説明できる分子である可能性が示唆されている。



Npn3はマウス癌細胞の増殖過程において発現増強する遺伝子として同定された遺伝子であり (Sun Y. et al. Cancer Res. 54: 1139-1144, 1994)、酵母で同定されていた sulfiredoxin のホモログとされている。ヒト npn3 の機能解析に関する報告は一部抗酸化ストレスに関与する (Jeong W. et al. J Biol Chem. 281: 2006) との報告があるのみで、不明な点が多い。また、npn3 の発現が HGF で誘導されることや Npn3 が抗アポトーシス因子として機能する可能性があるとの報告は皆無である。Npn3 が抗アポトーシス能を持つことが確認されればその新規性・独創性は極めて高いものとなると考えられ、さらにトランスレーショナルリサーチの一環として、開発の候補分子になる可能性が期待される。

3. 研究の方法

human npn3 の発現ベクターを構築し、in

in vitroでの抗アポトーシス効果を確認する。さらに、培養細胞に対するnfn3に特異的なsiRNAの導入によりnfn3の発現を選択的に低下させ、アポトーシス刺激に対する感受性の変化を確認する。

一方、in vivoにおいてはnfn3発現アデノウイルスベクターを構築し、マウス肝において特異的なNfn3の発現を一過性に誘導する。この遺伝子導入マウスの抗Fas抗体感受性を検討することでNfn3の機能解析を行う。

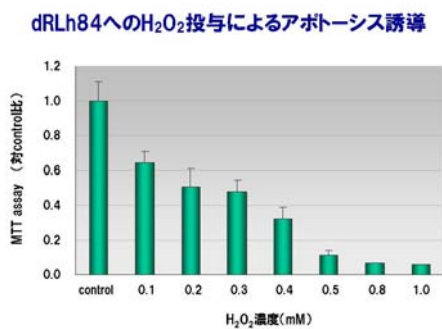
上記検討により、Nfn3の抗アポトーシス機能が明らかになれば遺伝子改変マウス(nfn3 KOマウスおよびnfn3 Tgマウス)を作成し、Nfn3の機能とその発現の意義についてさらなる検討を進める。

以上のように研究期間内の到達目標はNfn3の機能解析およびnfn3遺伝子改変マウスの作出であった。

4. 研究成果

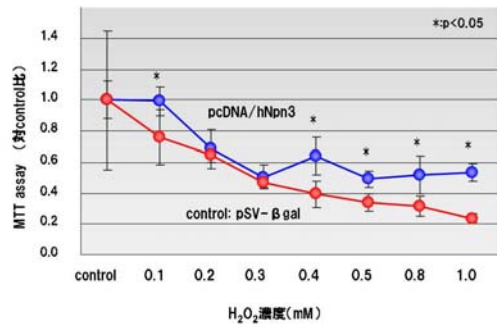
(1) nfn3発現ベクターの構築：インビトロジェン社のORF libraryよりhuman nfn3 クローンを購入、Gatewayシステムを利用しpcDNA™ 6.2/GFP-DEST Gateway® vectorへ組換え、Nfn3発現vector (pcDNA/hNfn3)を構築した。

(2) in vitroにおけるnfn3の抗アポトーシス効果の確認：dRLh84細胞に過酸化水素を添加すると濃度依存性にアポトーシスが誘導さ



れた。

次に、pcDNA/hNfn3をdRLh84に遺伝子導入後、過酸化水素水添加によりアポトーシスを誘導しMTT assayで生細胞数を評価した。dRLh84細胞へのpcDNA/hNfn3導入により、過酸化水素水添加によるアポトーシスを誘導に対して抵抗性を獲得することを確認した。



一方で、HepG2, HuH-7等のほかの細胞への遺伝子導入を試みたが、十分な導入効率を得られず、以降の評価が行なえなかった。

(3) その他：in vivoでの評価のためにアデノウイルスベクターを構築し、マウス肝特異的に一過性のNfn3発現を誘導し、抗Fas抗体感受性の検討を計画した。しかし、アデノウイルスベクターへの組換え効率や、組換え後のアデノウイルスベクターの増殖効率が著しく悪く、結果としてアデノウイルスベクターの構築に難渋し、構築に至らなかった。

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)

[学会発表] (計1件)

①森内昭博、井戸章雄、山路尚久、瀬戸山仁、重信秀峰、小原一憲、沼田政嗣、長谷川将、宇都浩文、桶谷真、坪内博仁、網羅的遺伝子発現解析を用いたHGFの抗アポトーシス機構

の解明. 2007年6月1日 第43回 日本肝
臓学会 総会 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森内 昭博 (MORIUCHI AKIHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助
教

研究者番号：40359823

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者