

平成22年 4月16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790182

研究課題名（和文）新規な t-PA 依存性肝再生メカニズム

研究課題名（英文）Novel mechanisms of t-PA-dependent liver regeneration

研究代表者

河尾 直之 (KAWAO NAOYUKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：70388510

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、血栓溶解に中心的な役割を果たすプラスミノゲンアクチベーター/プラスミン系の肝再生過程における役割について検討した。その結果、プラスミノゲンアクチベーター/プラスミン系は肝細胞の増殖に寄与する可能性が示唆された。さらに、生体内では肝障害後、プラスミノゲンが一連の修復反応を惹起するために必須の分子であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The roles of plasminogen activator (PA) /plasmin system in liver repair was examined. Then, the PA/plasmin system contributes to hepatocyte proliferation. In addition, plasminogen is essential for triggering a cascade of sequential repair responses after liver injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：t-PA, 細胞内シグナル伝達, 肝再生

1. 研究開始当初の背景

線溶系酵素である組織性プラスミノゲンアクチベーター（t-PA）およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（u-PA）は、内皮細胞、神経細胞、および肝細胞など様々な細胞で産生・放出され、プラスミノゲンをプラスミンに活性化するセリンプロテ

アーゼである。t-PA および u-PA のプロテアーゼ活性は、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1（PAI-1）によって制御されている。血管内に形成されたフィブリン血栓は主に t-PA/プラスミン系によって溶解されるが、この作用は t-PA が内皮細胞に発現するアネキシン II と結合することで増強

される (Cesarman GM et al., 1994, J Biol Chem. 269:21198-203.)。t-PA は内皮細胞以外の細胞においても、細胞膜に発現する受容体を介して生理的・病態生理的役割を果たすことが明らかになりつつあり、神経細胞において t-PA は NMDA 受容体の NR1 サブユニットに結合し、プロテアーゼ活性依存性に NMDA 受容体の活性増強を引き起こす (Nicole O et al., 2001, Nat Med. 7:59-64.)。さらに興味あることに、t-PA は神経細胞に発現する low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) に結合し、ERK1/2 経路の活性化を介して組織リモデリングに関わる matrix metalloproteinase-9 を誘導することが知られている (Wang X et al., 2003, Nat Med. 9:1313-7.)。

プラスミノゲンアクチベーター (PA)/プラスミン系は皮膚、肺、腎臓において、障害後の再生過程で重要な役割を果たしており、その作用の一部は細胞表面でのプロテアーゼ活性に依存して引き起こされることが報告されている (Collen D, 2001, Hematology. 1-9. Review.)。また、四塩化炭素によって引き起こされる肝障害後の再生過程に、PA/プラスミン系による細胞外基質の分解や障害細胞のクリアランスが重要であることが報告されている (Okada K et al., 2004, J Hepatol. 40:110-6.)。さらに、著者は肝細胞においてプラスミンが ERK1/2 経路の活性化を介してアポトーシス抑制性タンパク質 Bim の分解を促進することを報告し、線溶系因子によって誘起される細胞内シグナルに着目し研究を行ってきた (Kawao N et al., 2007, Biochim Biophys Acta. 1773:718-27.)。しかしながら、これまでの肝再生過程における PA の役割に関する報告では、u-PA を中心に検討されており、t-PA の役割に焦点をあてた報告はほとんどない。また、本研究計画を開始する直前に t-PA が胆管結紮による肝障害に対して保護的に働くことが明らかになった (Wang H et al., 2007, Hepatology. 45:1527-37., and 2007, FEBS Lett. 581:3098-104.)。また、肝細胞には t-PA 受容体として働き、その活性化で細胞内シグナルを惹起する LRP が非常に多く発現している。これらのことから、t-PA は肝再生過程において単なるプラスミノゲンを活性化するプロテアーゼとして働くだけでなく、細胞内シグナルを惹起し、様々な細胞作用に関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

肝障害・再生過程における t-PA の新しい生理的・病態生理的役割の一端を明らかにし、その詳細な分子メカニズムの解明を試みる。さらに、肝修復過程における t-PA/プラスミン系の役割について検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス肝細胞の初代培養

マウス肝細胞の初代培養を既報に従って行なった (Kawao N et al., 2007, Biochim Biophys Acta. 1773:718-27.)。マウスをペントバルビタールによって麻酔し、門脈よりコラゲナーゼ溶液を灌流した後に肝臓を採取し、遠心分離法によって肝細胞を分取した。分取した肝細胞は 10% FBS 含有 Williams' medium E 中で培養した。

(2) マウス初代培養肝細胞における細胞増殖能の測定

マウス初代培養肝細胞を分取後 24 時間培養し、実験に使用した。増殖能の測定を WST-1 assay 法によって行なった。また、DNA の合成能をチミジンアナログである iododeoxyuridine の取り込み量によって評価した。

肝細胞を 1% FBS 含有 Williams' medium E 培地中で 24 時間培養した後、t-PA 10 μ g/ml を添加し、その 48 時間後に細胞増殖能を測定した。

各阻害実験では、肝細胞をセリンプロテアーゼであるアプロチニン、t-PA 阻害薬である t-PA STOP あるいは u-PA 阻害薬である u-PA STOP 存在下で 48 時間培養し、増殖能を測定した。

(3) ウェスタンブロット法

初代培養肝細胞を 1% FBS 含有 Williams' medium E 培地中で 24 時間培養した後、t-PA 10 μ g/ml で刺激した。細胞を PBS によって洗浄した後、細胞溶解液を回収した。細胞溶解液を SDS-PAGE 法によって分離した後、PVDF 膜に転写した。各種 1 次抗体を反応後、陽性シグナルを ECL 法によって検出した。

(4) フィブリンザイモグラフィ法

肝細胞培養液を採取し、遠心分離によって不溶成分を除去した溶液を、1/4 倍量のサンプルバッファーと混合した。サンプル 20 μ l をプラスミノゲンおよびフィブリノゲン含有 10% アクリルアミドゲルで電気泳動し、分離した。次にゲルを 2.5% Triton X-100 溶液中で 1 時間、続いて 0.1 M グリシン溶液中で 18 時間インキュベーションした。プラスミノゲンアクチベーター活性を検出するためにゲルを CBB 染色した後、5% 酢酸 30% メタノール溶液で脱色した。

(5) 肝障害モデル

① 光化学反応誘起肝細胞傷害モデル

マウスをイソフルランによって麻酔し、開腹して露出させた肝臓外側左葉の表面に光線照射用プローブを設置した。次に頸静脈に挿入したポリエチレンチューブから光感受

性色素である Rose Bengal を持続注入し、先に設置したプローブを介して 540nm の緑色光線を 10 分間照射した。照射後、切開部を無菌的に縫合した。

②肝外傷モデル

マウスをイソフルランによって麻酔し、開腹して肝臓の外側左葉を露出させ、外科用メスによって長さ 3 mm、深さ 2 mm の傷を与えた。肝外傷部の止血を確認した後、腹部切開部を無菌的に縫合した。

③肝虚血再還流障害モデル

マウスをイソフルランによって麻酔し、開腹して、動脈用クランプによって肝臓の左葉と内側葉への血流を途絶させた。途絶 90 分後にクランプを除去して再還流させた後、切開部を無菌的に縫合した。

(6) 肝障害部位の評価

①障害部位の定量

マウスをペントバルビタールによって麻酔し、心臓から生理食塩水 20 ml を灌流した後、4%パラホルムアルデヒド溶液 30 ml を灌流して肝臓を固定し採取した。次に採取した肝臓をパラフィンに包埋し、4 μ m の切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した後、顕微鏡下で観察し、障害部位の面積を画像解析ソフトによって測定した。

②免疫染色法

上記の方法によって作製した切片を各種 1 次抗体と反応させ、TSA 法によって可視化して顕微鏡下で観察した。

③コラーゲンの蓄積

上記の方法で作製した切片をマッソン・トリクローム染色し、細胞外基質の検出を行なった。

肝組織中に含まれるヒドロキシプロリン量を既報に従って測定した (Choi SS et al., 2006, Hepatology. 44:1267-77.)。

③血管新生

マウスにチミジンアナログである BrdU を 4 日間 1 日 2 回皮下投与した。上記の方法によって組織切片を作製し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 と BrdU の二重染色を行なった。

4. 研究成果

(1) t-PA による肝細胞増殖能の亢進

マウス肝細胞の初代培養細胞を t-PA 存在下および非存在下で 48 時間培養した時の細胞増殖能を図 1 に示す。肝細胞の増殖能は

t-PA 刺激によって有意に亢進した (図 1)。さらに、DNA 合成能も t-PA 刺激によって有意に亢進した。これらの結果から、t-PA が肝細胞の増殖に寄与することが示唆された。

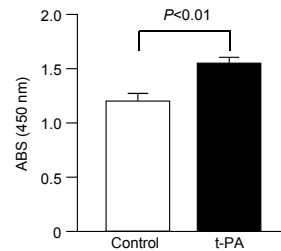


図1 t-PA刺激によるマウス初代培養肝細胞の増殖促進

(2) マウス初代培養肝細胞における t-PA による ERK1/2 のリン酸化

マウス肝細胞初代培養細胞を t-PA で刺激した時の ERK1/2 のリン酸化を図 2 に示す。t-PA 刺激 5 分後から明らかな ERK1/2 のリン酸化が観察され、このリン酸化は 15 分後をピークとして 60 分後まで観察された (図 2)。これらの結果から、t-PA が ERK1/2 シグナル経路を活性化することが明らかになった。

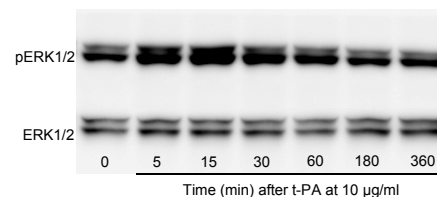


図2 マウス初代培養肝細胞におけるt-PA刺激による ERK1/2のリン酸化

(3) PAI-1 遺伝子欠損マウス由来肝細胞における増殖能の亢進

PAI-1 遺伝子欠損 ($PAI^{-/-}$) マウスから採取した肝細胞初代培養細胞の培養上清中において非常に強い t-PA 活性が認められた (図 3)。さらに、細胞増殖能は野生型マウス由来肝細胞と比較し $PAI^{-/-}$ 肝細胞では有意に亢進していた (図 4)。また、 $PAI^{-/-}$ 肝細胞における増殖能の亢進はセリンプロテアーゼ阻害薬アプロチニンおよび t-PA 阻害薬 t-PA STOP によって有意に抑制されたが、u-PA 阻害薬である u-PA STOP は無効であった (図 5)。これらの結果から、 $PAI^{-/-}$ 肝細胞における増殖能の亢進に t-PA/プラスミン系が関与することが示唆された。

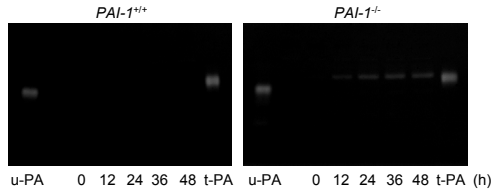


図3 PAI-1遺伝子欠損マウスから採取した初代培養肝細胞の培養液中のt-PA活性

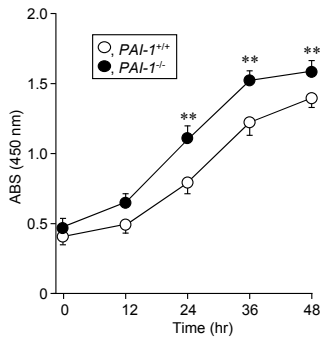


図4 PAI-1遺伝子欠損マウスから採取した初代培養肝細胞の増殖

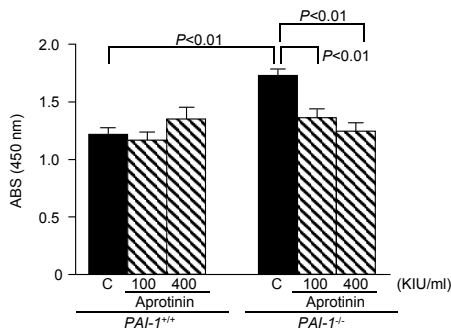


図5 PAI-1遺伝子欠損マウス由来初代培養肝細胞の増殖促進に対するアプロチニンの効果

(4) 肝修復過程におけるプラスミノゲンの役割

① プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおける肝障害部位減少の遅延

プラスミノゲン遺伝子欠損 ($Plg^{-/-}$) マウスおよびその野生型 ($Plg^{+/+}$) マウスに、光化学反応によって肝細胞傷害を誘起した後の障害部位の面積を図6に示す。障害部位は $Plg^{+/+}$ マウスでは14日後にはほぼ消失したが、 $Plg^{-/-}$ マウスでは56日後においても大部分の障害部位が残存していた(図6)。また、肝外傷モデルにおいても同様に $Plg^{-/-}$ マウスでは障害部位の減少が遅延した。これらの結果から、プラスミノゲンが肝障害部位の除去に中心的な役割を果たすことが明らかになった。

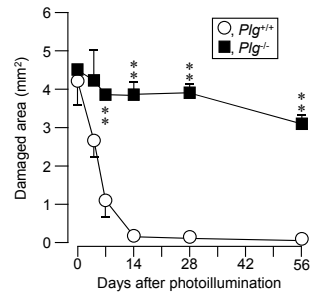


図6 プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおける肝修復の遅延

② プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおけるマクロファージ集積の抑制

光化学反応誘起肝傷害4日後の障害部位と正常部位の境界領域の様子を示したHE染色を図7A、Bに、マクロファージのマーカーであるF4/80の免疫染色を図7C、Dに示す。 $Plg^{+/+}$ マウスでは境界領域にマクロファージの著明な集積が観察された(図7A、C)。一方、 $Plg^{-/-}$ マウスではマクロファージの集積は認められず(図7B、D)、 $Plg^{+/+}$ マウスと比較して有意に減少した(図7E)。また、肝外傷モデルおよび肝虚血再還流モデルにおいても同様の結果が得られた。これらの結果から、障害部位周囲におけるマクロファージの集積にプラスミノゲンが寄与することが明らかになった。

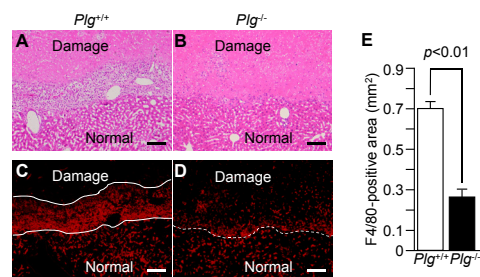


図7 プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおけるマクロファージ集積の抑制

③ プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおけるMCP-1発現好中球集積の抑制

光化学反応誘起肝細胞傷害モデルにおいて、障害1日後の障害部位への好中球集積に $Plg^{+/+}$ マウスおよび $Plg^{-/-}$ マウス間で有意な差は見られなかった(図8A-C)。一方、障害4日後では、 $Plg^{-/-}$ マウスの障害部位周囲における好中球集積が有意に抑制された(図8D-F)。また、肝外傷モデルおよび肝虚血再還流モデルにおいても同様の結果が得られた。これらの結果から、障害4日後の障害部位周囲における好中球の集積にプラスミノゲンが寄与することが明らかになった。

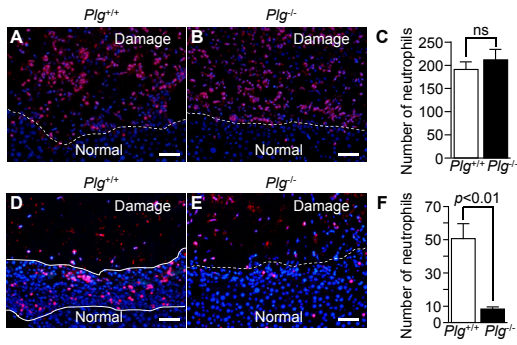


図8 プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおける好中球集積の抑制

障害1日後(A-C)および障害4日後(D-F)の好中球の免疫染色の写真。好中球を赤色、核を青色に発色させた。

光化学反応による肝障害4日後、 $Plg^{+/+}$ マウスにおいて障害部位周囲に集積した好中球にMCP-1免疫陽性反応が多く観察された(図9A)。一方、 $Plg^{-/-}$ マウスでは好中球自身の集積が観察されなかった(図9B)。

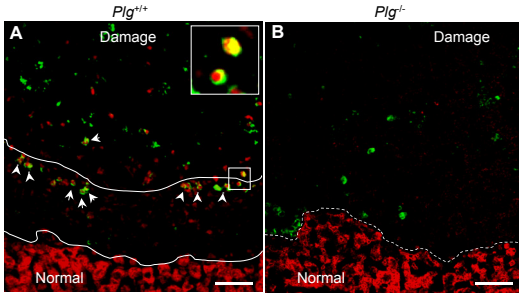


図9 障害部位周囲に集積した好中球におけるMCP-1の発現

障害4日後の障害部位周囲におけるMCP-1と好中球の二重染色の写真。MCP-1を赤色、好中球を緑色に発色させた。

障害4日後において、 $Plg^{-/-}$ マウスでは $Plg^{+/+}$ マウスと比較してMCP-1発現量が有意に減少した(図10A)。また、MCP-1中和抗体の投与によって障害部位周囲におけるマクロファージの集積は有意に減少した(図10B)。これらの結果から、障害部位周囲に集積した好中球がMCP-1産生を介してマクロファージの集積に寄与することが示唆された。

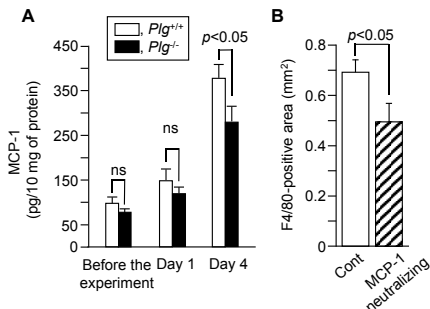


図10 障害部位におけるMCP-1発現量とマクロファージ集積に対するMCP-1中和抗体の効果

④ プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおける細胞外基質蓄積の抑制

活性化星細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (α -SMA)の免疫染色を図11に示す。障害4日後において、 $Plg^{+/+}$ マウスでは障害部位周囲に活性化星細胞の集積が観察されたが(図11A)、 $Plg^{-/-}$ マウスではほとんど認められなかった(図11B)。

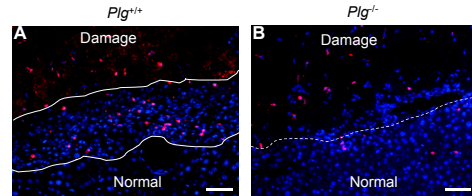


図11 プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおける活性化星細胞集積の抑制

障害4日後の障害部位周囲における α -SMAの免疫染色の写真。 α -SMAを赤色、核を青色に発色させた。

障害7日後において、 $Plg^{+/+}$ マウスでは細胞外基質の著明な蓄積が観察されたが(図12A)、 $Plg^{-/-}$ マウスではほとんど認められなかった(図12B)。また、障害部位におけるヒドロキシプロリン量は $Plg^{+/+}$ マウスでは著明に増加したが、 $Plg^{-/-}$ マウスでは増加が認められなかった(図12C)。これらの結果から、障害部位周囲における活性化星細胞の集積とそれに伴う細胞外基質の蓄積にプラスミノゲンが寄与することが明らかになった。

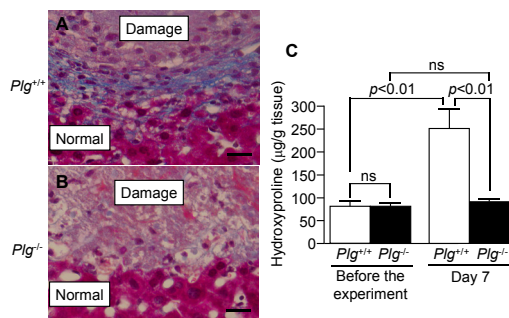


図12 障害部位周囲におけるコラーゲン線維の蓄積

障害7日後のマッソン・トリクローム染色の写真(A-B)。細胞外基質は青色に染色されている。コラーゲン線維の蓄積をヒドロキシプロリンの定量によって行なった(C)。

⑤ プラスミノゲン遺伝子欠損マウスにおける血管新生の抑制

光化学反応による肝傷害4日後の障害部位周囲において、*Plg*^{+/+}マウスではBrdUとCD31二重陽性を示す新生血管が多数観察された(図13A)。一方、*Plg*^{-/-}マウスでは新生血管はほとんど認められなかった(図13B)。これらの結果から、障害部位周囲での血管新生にプラスミノゲンが寄与することが明らかになった。

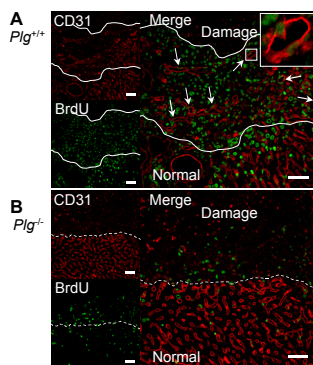


図13 障害部位周囲における血管新生

(5) 成果のまとめ

本研究課題遂行によって得られた成果は現時点で合計3報の学术论文に発表された。

マウス初代培養肝細胞の実験から得られた結果は、t-PAが細胞内シグナルを活性化して肝細胞増殖能を亢進することを示唆するものである。現在、t-PAが生体内において実際にどのような役割を果たしているか検討中であるが、この点は非常に興味深く、今後の発展が期待される。

肝再生過程におけるプラスミノゲンの役割については非常に多くの新知見が得られた。今回、新たにプラスミノゲンが肝障害部位にマクロファージを集積させ、それ以降の修復反応を惹起するために必須の分子であることが明らかになった。これらの結果は、肝疾患治療において非常に有益な知見であると考えられ、今後、t-PA/プラスミノゲン系をターゲットとした新たな肝疾患治療法の確立に繋がることが期待される。

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)

[雑誌論文] (計3件)

① Kawao N, Nagai N, Ishida C, Okada K, Okamoto K, Suzuki Y, Umemura K, Ueshima S, Matsuo O. Plasminogen is essential for granulation tissue formation during the recovery process after liver injury in mice. *J Thromb Haemost.* 査読有り, 2010.

In press.

② Kawao N, Nagai N, Okada K, Okamoto K, Ueshima S, Matsuo O. Role of plasminogen in macrophage accumulation during liver repair. *Thromb Res.* 査読有り. 2010. in press.

③ Okada K, Ueshima S, Kawao N, Okamoto C, Matsuo K, Akao M, Seki T, Ariga T, Tanaka M, Matsuo O. Binding of plasminogen to hepatocytes isolated from injured mouse liver and nonparenchymal-cell-dependent proliferation of hepatocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 査読有り. Vol.19. 2008. 503-11.

[学会発表] (計3件)

① 河尾直之、肝修復過程のマクロファージおよび好中球の集積におけるプラスミノゲンの寄与、第83回日本薬理学会年会 2010年3月16-18日、大阪

② 河尾直之、肝傷害後の炎症性細胞の集積におけるプラスミノゲンの役割、第32回日本血栓止血学会学術集会、2009年6月4-6日、福岡

③ 河尾直之、光化学刺激血栓モデルによる局所的肝傷害後の修復過程におけるプラスミノゲンの役割、第31回日本血栓止血学会学術集会、2008年11月20-22日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河尾 直之 (KAWAO NAOYUKI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：70388510

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：