

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008~2009

課題番号：20790958

研究課題名（和文）肝再生制御因子としてのソニックヘッジホッグ発現機序の解明に関する研究

研究課題名（英文）Expression of sonic hedgehog signaling for regulation of liver regeneration after massive hepatectomy of the rat liver

研究代表者

森根 裕二 (Morine Yuji)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60398021

研究成果の概要（和文）：

本研究では肝再生における新たな調節因子をなりうるソニック・ヘッジホッグ(SHH)の作用機序についてラット肝切除モデルを用いて検討した。PCNA labeling index (L.I.)は術後 24 時間が最も高値で、非実質細胞では PCNA L.I.は術後経時的に上昇した。全経過において、肝実質細胞・非実質細胞ともに PCNA L.I.は 90%肝切除モデルが有意に高値であった。Shh に関しては 90%・70%肝切除モデル間に発現強度の差はないが、肝実質細胞では術後 24 時間で最も高値で、術後経時的に上昇した非実質細胞は異なる発現パターンであった。肝実質細胞では各 Zone に均等に発現していたが、非実質細胞では Zone 1 にのみ発現増強していた。Gli-1 は Shh 発現と同様の発現パターンを呈した。本研究は Shh pathway が肝再生において、肝実質細胞・非実質細胞の再生と肝組織構築に重要な役割を果たすことを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Background: This study was conducted to clarify the possible functional involvement of Hh signaling, especially in Sonic hedgehog (Shh) in liver regeneration. **Methods:** Six-week-old male Wister rats were performed 70% hepatectomy (70%Hx, n=6) and 90% hepatectomy (90%Hx, n=6). The liver/body weight ratio and immunohistochemistry by anti-PCNA, anti-Shh and anti-Gli-1 antibody were evaluated their expression in each groups. **Results:** Hepatocytes were strongly stained by PCNA at 24 hr after Hx. Regarding non-parenchymal cells, they gradually stained by PCNA from 24hr to 72hr after Hx. Shh and Gli-1 expressions of hepatocytes were higher in 24 hr than other time point. In non-parenchymal cells, they gradually increased after Hx, and Shh and Gli-1-positive non-parenchymal cells mainly existed in zone I. **Conclusions:** Those findings indicated some relations between Shh pathway and liver regeneration. It is possible that they induced efficient and smooth hepatic reconstruction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
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：外科臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学・ソニックヘッジホッグ・

1. 研究開始当初の背景

大量肝切除後の肝不全は肝臓外科における深刻な合併症の一つである。また移植後肝不全の発生には graft size が重要な因子であり、small-for-size (SFS) graft syndrome の克服は重要な課題である。SFS graft syndrome の成因として、肝容積に対して過剰な門脈血流による類洞の障害と、肝再生機序の混乱があげられる (Transplant Proc 2001, Ann Surg 2003)。肝切除術後肝再生のメカニズムは大きく肝細胞と他の間葉系細胞の再生により構成され (図1)、初期の肝細胞増殖に引き続き類洞内皮細胞が増殖することにより肝血流が保たれる。しかし大量肝切除術後の過度の肝細胞増殖と比較して類洞内皮細胞増殖が相対的に減少する結果、肝微小循環障害が惹起され、機能的肝細胞数減少により術後肝不全が引き起こされることが判明している。

さらにソニック・ヘッジホッグ (Sonic hedgehog, SHH) は、ヘッジホッグ (HH) ファミリーに属する5種類のタンパク質の内の1つで発生において最も重要なモルフォゲンとして、四肢や、脳脊髄正中線構造などの、多くの器官系のデザインの形成に必須である。特に肝胆膵領域では膵細胞の発生に重要な役割を果たし、抑制的に働くことや (Stem Cells. 2007)、activin β 投与により SHH が過剰発現し、発生過程での細胞分化の調節の役割を担う可能性などが報告されている (Stem Cells. 2007 図3)。しかし、現在のところ肝再生と SHH に関する報告はまだない。

一方、TGF- β supergene family に属する activin は肝細胞増殖を抑制するとともに、肝類洞内皮細胞の増殖を促進することが報告されており (J Clin Invest 1993, J Hepatol 2004)、特に大量肝切除術後肝再生における制御因子として重要な役割を担っていると思われる。

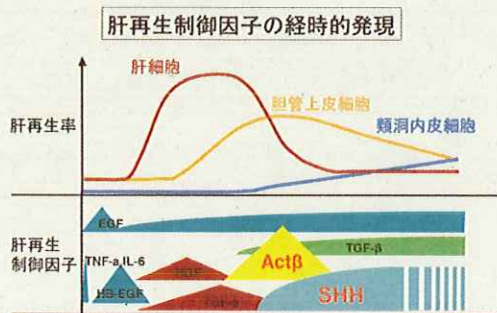


図1: 各種肝再生制御因子により肝構成細胞の増殖が調節される。

2. 研究の目的

肝再生には多くの cytokine が関与しており、TGF- β supergene family に属する activin とその結合蛋白で肝細胞増殖因子である follistatin は、協調作用により肝再生の制御と肝の定常状態の維持に関与することが知られている。我々は、activin の肝細胞増殖抑制効果と、follistatin による肝細胞増殖促進効果に注目し、研究を進め以下の項目について発表してきた。

(1) 70%肝切除術後のアクチビンの経時的発現と変動

(Hepatogastroenterol.2005)

(2) follistatin 投与による肝再生促進効果 (Hepatogastroenterol.2005)

(3) 90%大量肝切除術モデルにおけるアクチビンの経時的発現と変動 (Hepatogastroenterol.2007)

これらの研究結果と SHH における最近の知見により SHH と activin が肝再生過程において何らかの interaction を有し肝再生を制御している可能性が強く示唆される (図2)。本研究では肝再生における新たな調節因子をなりうる SHH の作用機序について解明する。

Activin-Sonic Hedgehog シグナルによる肝再生調節機構



図2: Activin β によるSonic Hedgehogを介した肝再生調節機構

3. 研究の方法

肝再生調節機構における SHH、activin の役割を解明するため、以下を検討する。

- (1) 肝細胞および類洞内皮細胞の増殖における SHH、activin が及ぼす影響 (*in vitro*)
- (2) 大量肝切除後の再生肝における cytokine の経時的変動と SHH、activin との関連
- (3) 大量肝切除後の amiloride (SHH 阻害剤) 投与による肝再生への影響
- (4) amiloride 投与に引き続いての follistatin (activin 抑制因子) 投与による肝細胞増殖促進効果と SHH 発現の変動

4. 研究成果

(1)(2)

Wistar Rat 7週齢を用いて、肝左葉・中葉切除(70%肝切除)、肝左葉・中葉・右葉切除(90%肝切除)を施行し術後経時的(0、24、48、72時間)に検討した。

肝再生率は90%肝切除モデルにおいて術後全経過において有意に高値で(図1)、肝実質・非実質細胞ともにPCNA L.I.も実質細胞では術後24時間で最も高値であり、非実質細胞では術後経時的に上昇した(図2,3)。

図1

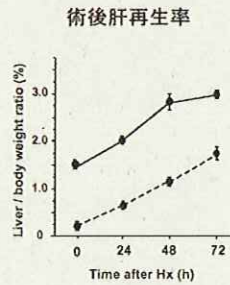


図2

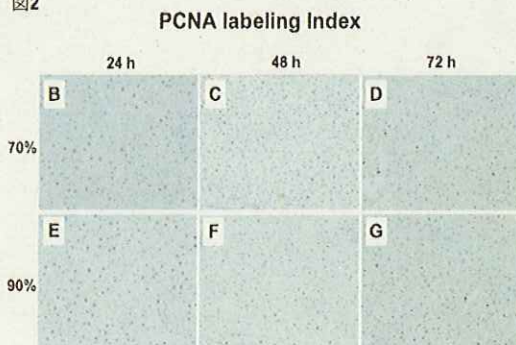
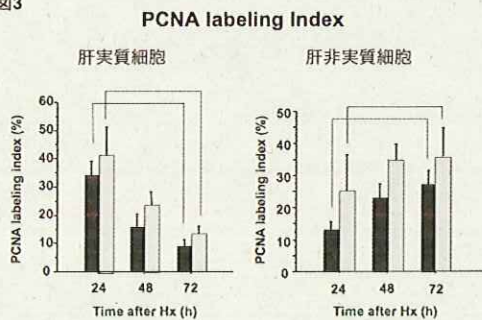


図3



Shhに関しては90%、70%モデル間の発現には差はないものの、肝細胞では術後24時間で最も高値であった(図4,5)。

図4

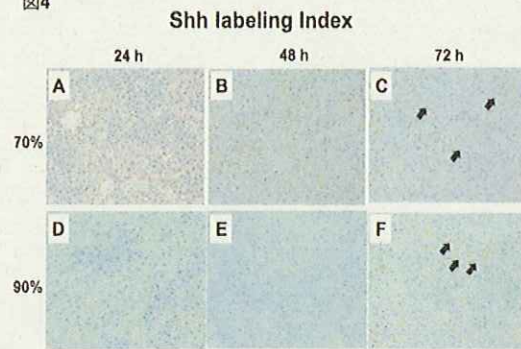
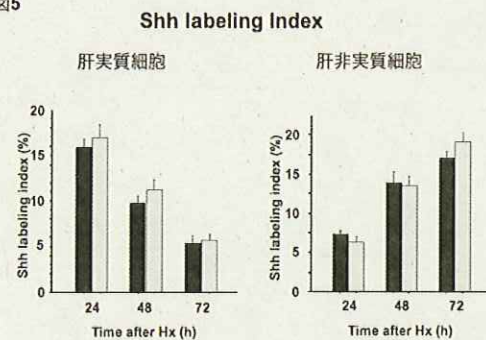


図5



Gli-1はShh発現とほぼ同様の発現パターンを呈した。またShh・Gliともに非実質細胞では術後72時間が最も発現していた。Ptch-1も発現を認めるが、sham、90%、70%、各時間で同様に染色され、差は見られなかった。

Real-Time PCRに関しては、70%・90%肝切除モデル両群においてShh、Ptch、Gliに有意差を認めず、また肝再生において一定の経時的な変化も示さなかった。

(3)(4)

Real-Time PCRに関しては、70%・90%肝切除モデル両群においてShh、Ptch、Gliに有意差を認めず、また肝再生において一定の経時的な変化も示さなかったことから、activin阻害剤やactivin抑制因子であるfollistatin投与による肝再生の影響への検討は行わなかった。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Yuji Morine

Optimal administration of tacrolimus in reduced-size liver. Dig Dis Sci. 2009; 54: 1789-1793. (査読有り)

2. Yusuke Arakawa

Beneficial effects of splenectomy on massive hepatectomy model in rats. Hepatol Res. 2009; 146: 391-397. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

1. 西 正暁

肝虚血再還流障害に対する高圧酸素療法 (HBO) の効果

第 45 回日本肝臓学会

平成 21 年 6 月 4-5 日 神戸

2. 荒川 悠佑

ラット Small-for-size graft model における脾摘術の有用性 (第 2 報) cDNA microarray を用いた遺伝子プロファイル解析

第 109 回日本外科学会

平成 21 年 4 月 2-4 日 福岡

3. 新居 章

Severe NAFL model rat における虚血再灌流障害に対する MHN-02 の効果

第 109 回日本外科学会

平成 21 年 4 月 2-4 日 福岡

4. 小笠原 卓

ラット大量肝切除における脾臓内遺伝子発現の変化 -microarray による網羅的解析-

第 109 回日本外科学会

平成 21 年 4 月 2-4 日 福岡

5. 花岡潤

ラット肝温虚血再灌流障害モデルに対する濃厚流動食 MHN-02 の有用性

第 45 回日本外科代謝栄養学会

平成 20 年 7 月 11 日 仙台

6. 西正暁

肝虚血再灌流傷害における Follistatin/Activin system に関する検討

第 26 回日本肝移植研究会

平成 20 年 6 月 20 日 横浜

7. 徳永卓哉

大量肝切除における SHH 発現とその役割に関する研究

第 108 回日本外科学会定期学術集会

平成 20 年 5 月 17 日 長崎

8. 金本真美

肝虚血再灌流傷害に対する follistatin の保護効果に関する検討

第 108 回日本外科学会定期学術集会
平成 20 年 5 月 15 日 長崎

[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

森根 裕二 (MORINE YUJI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 60398021

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

島田 光生 (SHIMADA MITSUO)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・教授

研究者番号: 10216070

居村 暁 (IMURA SATORU)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 90380021

池上 徹 (IKEGAMI TORU)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号: 80432938

金村 普史 (KANEMURA HIROFUMI)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・診療助教

研究者番号: 20467814

中村 隆範 (NAKAMURA TAKANORI)

香川大学・医学部・教授

研究者番号: 70183887