

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 31日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390079

研究課題名（和文）肝細胞の増殖と分化を相反的に制御する分子実体の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms that reciprocally regulate growth and differentiation of mature hepatocytes

研究代表者

中村 敏一（NAKAMURA TOSHIKAZU）

大阪大学・産学連携本部・特任教授

研究者番号：00049397

研究成果の概要（和文）：

成熟肝細胞の増殖と分化は細胞密度によって相反的に制御されている。

- (1) 高細胞密度で HGF による LAR の活性化機構として、Furin 様プロテアーゼの関与を明らかにした。
- (2) TDO プロモーター制御下で GFP を発現するトランスジェニックマウスの解析から、種間で保存されている相同性領域を見出し、結合する転写因子として C/EBP- α を同定した。
- (3) 肝細胞増殖に必須であるプロリンは、コラーゲン合成を介してサイクリン D, E の蓄積を引き起こすことを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Growth and differentiated functions of mature hepatocytes are reciprocally regulated by cell density.

- (1) We found that a furin-like protease activity is involved in HGF-mediated LAR activation under high-cell density conditions.
- (2) Using TDO promoter-EGFP transgenic mice, we found that a conserved homologous region exists among the species. Furthermore, C/EBP- α can bind its site and activate promoter activity.
- (3) Proline is an essential amino acid for hepatocyte growth. Proline increased accumulation of cyclin D and E proteins via newly synthesized collagen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

肝臓は血糖調節、血漿蛋白質や脂質の合成・分泌、アミノ酸代謝、尿素合成など多彩な機能を営んでおり、生体恒常性維持において最も重要な臓器である。これら肝機能のほとんどを担っているのが成熟肝細胞である。正常の肝臓では成熟肝細胞は増殖を停止した G0 期にあり、この状態で肝特異機能は最大限に発揮される。一方、肝臓は旺盛な再生能を有する臓器として知られている。肝臓に傷害が起こると成熟肝細胞の細胞周期は G0 期から G1 期に移行し、増殖因子に応答して速やかに増殖を開始する。その後、肝再生が完了すれば増殖を停止し再び元の G0 期に戻る。この様に高度な分化機能と活発な増殖能を有している成熟肝細胞は、細胞の増殖・分化や再生研究において非常に有用なモデルシステムであると言える。正常肝細胞では、増殖と分化の制御が厳密に行われていることによって生体は恒常性を維持している。さらに、この制御機構の破綻は細胞の異常増殖、癌化につながると考えられる。よって、成熟肝細胞の増殖・分化の制御機構を解明することは、生体の恒常性維持、組織再生ならびに癌化のメカニズムの理解に役立つと考えられる。

HGF (hepatocyte growth factor) は、成熟肝細胞の増殖を促進する分子として発見されたが、その後の解析から HGF は肝臓のみならず様々な組織・臓器の再生・保護において重要な役割を果たす内因性の再生・修復因子であることが明らかになっている。HGF による肝細胞の増殖は細胞密度に依存している。すなわち、肝細胞が HGF に応答して DNA 合成を開始するのは低細胞密度の培養状態であり、細胞間接着が形成される高細胞密度状態では、たとえ過剰の HGF が存在しようとも DNA 合成は起こらない。この現象は、他の正常細胞でも細胞同士が接着するような細胞密度になると増殖が停止し、**contact inhibition of growth** として知られている。細胞密度依存的な HGF 応答性のメカニズムの一つとして、HGF 受容体である c-Met がチロシンフォスファターゼ LAR によって脱リン酸化されることが明らかになっている。LAR の発現は細胞密度に関係なく一定であり、LAR の活性化は高細胞密度条件に HGF 刺激が加わって初めて起こることから、ネガ

ティブフィードバック機構として働いている。即ち、細胞間接着を認識する分子からのシグナルが HGF シグナルを感知して、抑制的に働くことによって調節されていると考えられる。

TDO (tryptophan-2,3-dioxygenase) は肝細胞の最終分化マーカーとして知られており、成熟肝細胞に分化して初めて発現するようになる。TDO はホルモン (グルココルチコイド) によって誘導されることが示された最初の酵素であるが、ホルモンによる TDO の発現誘導も細胞密度依存的な制御を受けている。この場合、TDO の発現量は肝細胞密度が高い時ほど上昇する。さらに、肝細胞の細胞密度依存性応答が細胞間接着によるものかどうかを調べるため、低細胞密度で培養した肝細胞に精製した細胞膜を添加し細胞間の接着状態を模倣すると、あたかも高細胞密度で培養した場合のように HGF による DNA 合成量は抑制されるが、逆に TDO の発現量は上昇する。このように肝細胞には、細胞間接着からのシグナルが細胞増殖には抑制的に働き、分化機能に対しては促進的に働く調節機構が備わっている。

2. 研究の目的

成熟肝細胞の増殖能と分化機能は、細胞密度 (細胞間接着) に依存して相反的に変化する。HGF 等の増殖因子による DNA 合成活性で示される増殖能は低細胞密度ほど高く、高細胞密度になるほど顕著に抑制される。これとは逆に、肝特異酵素である TDO の発現を指標とした分化機能は、低細胞密度ではその発現が低く高細胞密度ほど高くなる。このように肝細胞には、細胞間接着からのシグナルが細胞増殖には抑制的に働き、分化機能に対しては促進的に働く調節機構が備わっている。細胞密度による細胞応答性の変化は古くから知られているが、その分子実体は未解明である。本研究では、肝細胞の増殖・分化を制御する分子機構の全容を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞密度依存的な LAR 活性化機構の解析
初代培養肝細胞を低細胞密度と高細胞密度で培養し、HGF 刺激によって生じる LAR の maturation form を解析した。

(2) TDO の発現誘導因子の解析

TDO プロモーター制御下でレポーター遺伝子 (GFP) を発現するトランスジェニックマウス (TDO-GFP マウス) を作製した。このマウスの肝細胞における GFP の発現解析から、TDO 遺伝子発現に重要であると思われるプロモーター領域を見出した。この領域に結合する転写因子をデータベースより検索した。さらに、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により、転写因子と TDO プロモーターとの結合を確認した。また、レポーターアッセイにより、TDO 遺伝子の転写活性化に関与しているかどうかを解析した。

(3) 肝細胞増殖におけるプロリンの作用機構の解析

プロリンの有無の条件下で肝細胞の初代培養を行い、細胞周期関連分子の発現を調べた。さらにプロリンの作用点と、細胞内シグナル伝達経路を解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞密度依存的な LAR 活性化機構の解析

肝細胞の増殖は細胞密度に依存しており、高細胞密度では HGF 刺激を加えても細胞増殖は起こらない。この時、c-Met のリン酸化状態が持続せず、LAR によって脱リン酸化される。LAR は細胞密度に関係なく発現しているが、その活性化は高細胞密度培養下で HGF 刺激に依存して引き起こされる。そこで LAR 活性化機構を解析したところ、LAR は Furin 様プロテアーゼによって shedding されて活性化することが明らかになった。

(2) TDO の発現誘導機構の解析

TDO は成熟肝細胞で強く発現しており、さらに細胞密度が高まるほど強く誘導される。TDO の発現調節機構を解析するため、TDO プロモーター制御下で EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。その結果、TDO 遺伝子の 5' 上流約 22 kbp の範囲のうち、-10 kbp から -22 kbp の領域が TDO の肝臓特異的発現に重要であることが明らかになっている。この領域をさらに詳細に解析したところ、ヒト、マウス、ラット種間で保存されている領域を見出し、マウスでは約 15 kb の領域に存在する。この領域に結合する転写因子を TFSEARCH プログラムにより検索したところ、C/EBP- α が候補に挙げられた。さらに、肝細胞内における結合を ChIP アッセイにより確認した。次に、C/EBP- α が TDO の

転写活性に影響を及ぼすかどうかを調べるため、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、マウスの約 15 kb の領域を含むコンストラクトは C/EBP- α に依存してルシフェラーゼ活性が上昇した。以上より、TDO 遺伝子の 5' 上流に存在する相同性領域は、C/EBP- α を介して TDO の発現に関与していることが示唆された。

(3) 肝細胞の増殖に必須であるプロリンの作用機構の解析

肝細胞の増殖にはプロリンの存在が必須である。そこで、細胞周期関連分子の発現を調べたところ、プロリンが細胞周期 G1/S 期のサイクリンである cyclin D および cyclin E の蛋白レベルでの発現蓄積を引き起こすことを見出した。cyclin E の蓄積は、増殖因子からのシグナルにより発現誘導された cyclin D の下流で起こる細胞増殖に必須な現象である。しかし、プロリンの作用は増殖因子の存在に関わらず、プロリン添加のみで認められる。次に、プロリンの作用に関わる細胞内シグナルを解析した。その結果、PI3K 阻害剤によってプロリンによるサイクリン E の蓄積は完全に消失した。また、プロリンはコラーゲンの主要構成アミノ酸であり、コラーゲン合成阻害剤によって初代培養肝細胞の DNA 合成は阻害される。そこで、コラーゲン合成阻害剤が cyclin E の発現に及ぼす影響を調べたところ、プロリンによる cyclin E の蓄積は認められなかった。以上の結果より、プロリンから合成されたコラーゲンによって PI3K/Akt 経路が活性化され、cyclin E の蓄積に関与していることが示唆された。

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 27 件) 全て査読あり

(1) Mizuno S and Nakamura T. Improvement of sepsis by hepatocyte growth factor (HGF), an anti-inflammatory regulator: Emerging insights and therapeutic potential. **Gastroenterol Res Pract (e-Journal)**. Article ID 909350 (2012) DOI: 10.1155/2012/909350.

(2) Ohnishi H, Oka K, Mizuno S and Nakamura T. Identification of mannose receptor as a receptor for HGF β -chain: A novel ligand-receptor pathway for enhancing macrophage phagocytosis. **J. Biol. Chem.** 287: 13371-13381 (2012) DOI: 10.1074/jbc.M111.318568.

(3) Noma S, Ohya-Shimada W, Kanai M, Ueda

K, Nakamura T, Funakoshi H. Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. **Neurosci. Res.** 73: 115-121 (2012) DOI: 10.1016/j.neures.2012.03.001.

(4) Nakamura T. Introduction: Hepatocyte Growth Factor and Met receptor, from discovery to therapeutic implications. **Curr. Signal Transduct. Ther.** 6: 143-145 (2011) DOI: 10.2174/157436211795659937.

(5) Mizuno S, Ohnishi H and Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF), an endogenous pulmonary regulator, for the rescue of acute and chronic lung diseases. **Curr. Signal Transduct. Ther.** 6: 210-220 (2011) DOI: 10.2174/157436211795659946.

(6) Funakoshi H and Nakamura T. Hepatocyte Growth Factor (HGF): Neurotrophic Functions and Therapeutic Implications for Neuronal Injury/Diseases. **Curr. Signal Transduct. Ther.** 6: 156-167 (2011) DOI: 10.2174/157436211795659982.

(7) H. Funakoshi, M. Kanai and T. Nakamura. Modulation of Tryptophan Metabolism, Promotion of Neurogenesis and Alteration of Anxiety-Related Behavior in Tryptophan 2,3-Dioxygenase-Deficient Mice. **Int. J. Trp. Res.** 4: 7-18 (2011) DOI: 10.4137/IJTR.S5783.

(8) Mizuno S, Ikebuchi F, Fukuta K, Kato T, Matsumoto K, Adachi K, Abe T and Nakamura T. Recombinant human HGF, but not rat HGF, elicits glomerular injury and albuminuria in normal rats via an immune complex-dependent mechanism. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 38: 192-201 (2011) DOI: 10.1111/j.1440-1681.2011.05483.x.

(9) Kato T, Mizuno S and Nakamura T. Preservations of nephrin and synaptopodin by HGF in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice. **Nephrology** 16: 310-318 (2011) DOI: 10.1111/j.1440-1797.2010.01392.x.

(10) Sakai K, Nakamura T, Kinoshita T, Nakamura T, Matsumoto K. HGF-Antagonists: Structure, Activities, and Anti-cancer Approach. **Curr. Signal Transduct. Ther.** 6: 191-199 (2011) DOI: 10.2174/157436211795659964.

(11) Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Human Hepatocyte Growth Factor Promotes Functional Recovery in Primates after Spinal Cord Injury. **PLOS one** 6: e27706 (2011) DOI: 10.1371/journal.pone.0027706.

(12) Esaki S, Kitoh J, Katsumi S, Goshima F, Kimura H, Safwat M, Yamano K, Watanabe N,

Nonoguchi N, Nakamura T, Coffin RS, Miyatake SI, Nishiyama Y, Murakami S. Hepatocyte growth factor incorporated into herpes simplex virus vector accelerates facial nerve regeneration after crush injury. **Gene Ther.** 18: 1063-9 (2011) DOI: 10.1038/gt.2011.57.

(13) T. Nakamura and S. Mizuno. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc. J. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 86: 588-610 (2010) DOI: 10.2183/pjab.86.588.

(14) M. Kanai, H. Funakoshi and T. Nakamura. Implication of Tryptophan 2,3-dioxygenase and its novel variants in the hippocampus and cerebellum during the developing and adult brain. *Int. J. Tryptophan Res.* 3: 141-149 (2010) DOI: 10.4137/IJTR.S4372

(15) T. Nakamura, K. Sakai, T. Nakamura and K. Matsumoto. Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26: 188-202 (2011) DOI: 10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x.

(16) Y. Suzuki, K. Sakai, J. Ueki, Q. Xu, T. Nakamura, H. Shimada, T. Nakamura, and K. Matsumoto. Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer* 127: 1948-1957 (2010) DOI: 10.1002/ijc.25197.

(17) LiF Nandini CD. T. Hattori, X. Bao. D. Murayama, T. Nakamura, N. Fukushima, and K. Sugahara. Structure of pleiotrophin- and hepatocyte growth factor-binding sulfated hexasaccharide determined by biochemical and computational approaches. *J. Biol Chem.* 285: 27673-27685 (2010) DOI: 10.1074/jbc.M110.118703

(18) K. Ohira, H. Hagihara. K. Toyama, K. Takao, M. Kanai, H. Funakoshi, T. Nakamura and T. Miyakawa. Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in mature granule cells of the adult mouse dentate gyrus. *Mol. Brain* 3: 26 (2010) DOI: 10.1186/1756-6606-3-26

(19) K. Sakai, K. Oka, K. Matsumoto and T. Nakamura. p27 nuclear localization and growth arrest caused by perlecan knockdown in human endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392: 403-408 (2010) DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.035

(20) K. Sakai, T. Nakamura, K. Matsumoto and T. Nakamura. Angioinhibitory action of NK4 involves impaired extracellular assembly of

fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. J. Biol. Chem. 284: 22491-22199 (2009) DOI: 10.1074/jbc.M109.025148

(21) M. Kamimoto, S. Mizuno and T. Nakamura. Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of HO-1 in macrophages for attenuation of hepatic injury in a mouse model of endotoxemia. Int. J. Mol. Med. 24: 161-170 (2009) DOI: 10.3892/ijmm_00000219

(22) M. Kanai, H. Funakoshi, H. Takahashi, T. Hayakawa, S. Mizuno, K. Matsumoto, and T. Nakamura. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. Mol. Brain 2: 8 (2009) DOI: 10.1186/1756-6606-2-8

(23) M. Kamimoto, S. Mizuno, K. Matsumoto and T. Nakamura. Hepatocyte growth factor prevents multiple organ injuries in endotoxemic mice through a heme oxygenase-1-dependent mechanism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 380: 333-337 (2009) DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.01.080

(24) M. Kanai, T. Nakamura and H. Funakoshi. Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: Differential regulation in the mouse nervous system during development. Neurosci. Res. 64: 111-117 (2009) DOI: 10.1016/j.neures.2009.02.004

(25) S. Tanaka, T. Miyata, T. Fujita, E. Kawahara, K. Tachino, H. Funakoshi and T. Nakamura. Differing responses of satellite cell activity to exercise training in rat skeletal muscle. J. Phys. Ther. Sci. 21: 141-145 (2009) DOI:

(26) K.X. Liu, Y. Kato, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Kaku and Y. Sugiyama. Characterization of the enhancing effect of protamine on proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes. Pharm. Res. 26: 1012-1021 (2009) DOI: 10.1007/s11095-008-9810-1

(27) Y. Kishimoto, S. Hirano, A. Suehiro, I. Tateya, S. Kanemaru, T. Nakamura and J. Ito. Effect of exogenous hepatocyte growth factor on vocal fold fibroblasts. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 118: 606-611 (2009) PMID: 19746761

〔学会発表〕(計16件)

(1) プロリンによるサイクリン E1 の蓄積には PI3K/Akt シグナルが必要である。岡清正、島田(大谷)若菜、水野信哉、中村敏一 第84回日本生化学会 2011年9月21~24日 京都

(2) HGF- β chain はクッパー細胞の貪食作用を亢進する。大西浩之、岡清正、水野信哉、中村敏一 第84回日本生化学会 2011年9月21~24日 京都

(3) Differential effects on systemic kynurenine levels by tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) under physiological conditions and interferon treatment. 金井将昭、船越洋、中村敏一 第84回日本生化学会 2011年9月21~24日 京都

(4) トリプトファン 2,3 ジオキシゲナーゼ遺伝子のプロモーター領域の解析。岡清正、松本邦夫、中村敏一 第83回日本生化学会 2010年12月9日 神戸

(5) Perlecanによるp27の発現ならびに細胞内局在の制御を介した血管内皮細胞の増殖制御。酒井克也、岡清正、中村隆弘、中村敏二、松本邦夫 第83回日本生化学会 2010年12月9日 神戸

(6) プロリンが初代培養肝細胞増殖を制御する分子機構。島田(大谷)若菜、岡清正、松本邦夫、中村敏一 第83回日本生化学会 2010年12月8日 神戸

(7) 骨髄由来 DC の遊走およびサイトカイン産生に対する HGF の調節作用。大西浩之、岡清正、水野信哉、中村敏一 第83回日本生化学会 2010年12月8日 神戸

(8) 肝細胞における Met/HGF 受容体 Ser985 リン酸化と受容体活性化の制御。中山瑞穂、山下敦子、中村隆弘、徐慶、中村敏一、松本邦夫 第83回日本生化学会 2010年12月8日 神戸

(9) トリプトファン代謝と情動: TDO ノックアウトマウスの解析。船越洋、金井将昭、中村敏一 第83回日本生化学会 2010年12月7日 神戸

(10) Perlecanによるp27の発現ならびに細胞内局在の制御を介した血管内皮細胞の増殖制御。酒井克也、岡清正、中村隆弘、中村敏二、松本邦夫 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日 大阪

(11) HGFによる初代培養肝細胞のAkt活性化は、EGFの場合と異なり持続して認められる。岡清正ら 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 神戸

(12) NK4による血管新生阻害作用の解析-プロテオグリカン結合を介したフィブロネクチン構築阻害- 酒井克也ら 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 神戸

(13) 培養マクロファージを用いたHGFによるHMGB1放出抑制機構の解析。神元幸ら 第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸

(14) HGFによる胆管上皮細胞の代償性成長を介した胆管硬化症の進展制御機構の解析。水野信哉ら 第82回日本生化学会大会 2009年10月23日 神戸

(15) ヒト悪性中皮腫細胞のコラーゲンゲル内浸潤性増殖におけるHGF-Met系の役割とNK4による阻害。鈴木芳典ら 第82回日本

生化学会大会 2009年10月24日 神戸
(16) NK4によるプロテオグリカン結合を介したフィブロネクチン構築阻害。酒井克也ら
第68回日本癌学会学術総会 2009年10月3日 横浜

〔図書〕(計4件)

- (1) Mizuno S and Nakamura T: Chapter 930. MET, *In* Brenner's Online Encyclopedia of Genetics, 2nd Edition, (Edited by Maloy S and Hughes K) Elsevier Contact, in press.
- (2) S. Mizuno and T. Nakamura (2011) Hepatocyte growth factor: Cardiotrophic roles and potential therapeutics for cardiovascular disease. (eds. I.C. Tintou, J.J. Popma, J. Bae, A. Rivard, A.R. Galassi and G. Cristian), Coronary Stent Restenosis. Chapter 24, 341-357.
- (3) S. Mizuno and T. Nakamura (2011) Chapter 6. Endocrine Delivery System of NK4, an HGF-Antagonist and Anti-Angiogenic Regulator, for Inhibitions of Tumor Growth, Invasion and Metastasis. In: Hydrodynamics-Advanced Topics (eds. Harry Edmar Schulz and Luiz Andrade.): In Tech-Open Access Publisher.
- (4) 福田一弘、松本邦夫、中村敏一 バイオ医薬の開発技術とシーズ (山本重夫 監修) (株)シーエムシー出版 (2009) 新規がん分子標的薬 — NK4 (HGF アンタゴニスト/血管新生阻害分子)の開発— pp. 66-78.

〔その他〕

ホームページ等

<http://onbich.casi.osaka-u.ac.jp/japanese/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 敏一 (NAKAMURA TOSHIKAZU)
大阪大学・産学連携本部・特任教授
研究者番号：00049397

(2) 研究分担者

岡 清正 (OKA KIYOMASA)
大阪大学・産学連携本部・特任准教授
研究者番号：70314474
福田 一弘 (FUKUTA KAZUHIRO)
大阪大学・先端科学イノベーションセンター・招聘准教授
研究者番号：90379264
(H21)

(3) 連携研究者

船越 洋 (FUNAKOSHI HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：40273685
水野 信哉 (MIZUNO SHINYA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10219644