

## 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：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590852

研究課題名（和文）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

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（和文）：細胞周期を制御する分子を介した方法で肝再生医療へ応用するため、G0期にある肝細胞をG1期へと再進入することが可能と考えられるエストラジオール(E2)を用いた肝再生促進モデルでその可能性について検討を行った。E2投与によりKi67の陽性率が増加したため、これを用いて肝障害マウスの生存を検討したところ、投与時期の違いでその生存率が異なる事を見いだした。このことより肝障害時には時期特異的な再生への関与があり、その解明により再生を効率よく促進出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the possibility of the method through controlling a cell cycle in a liver regeneration promotion model using estradiol (E2) which can promote hepatocytes entering into G1 period from G0 period. Because of Ki67 positive rates in hepatocytes increased by the E2 dosage, we used E2 for the liver damage mouse and revealed that survival rate was different in a difference of the dosage time. This result suggested that there was participation in specific regeneration at the time of the liver damage, and the possibility of promote regeneration efficiently by the elucidation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・トランスクリプトーム・プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

我々は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<sup>Kip1</sup>は肝にも強い発現を認め、そのノックアウト(KO)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(Cell 1996, Dev.Cell 2004)ことを報告してきた。この研究成果を背景に、骨髄

細胞移植を“より効率的に、かつより迅速に行なう”ことを目的として、細胞周期関連分子の機能制御に着目し、現在までに研究を行ってきた(平成19-20年度 基盤研究(C)『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』研究代表者 永濱裕康)。その研究の中でp27<sup>Kip1</sup>KOマウス由来の骨髄細胞を、CCl4

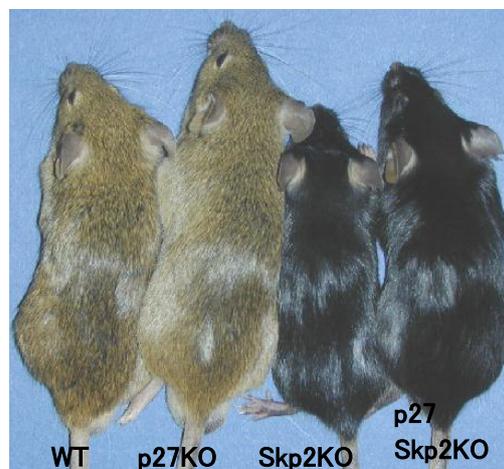
を用いた急性肝障害モデルマウスに投与することにより、その生存率、肝再生能の向上につながるかを検討したが、**p27<sup>Kip1</sup>KO**マウス由来の骨髄細胞を移植したマウスでは、肝障害誘発後のALTのピーク値は抑えられたが、生存率については改善傾向にあったものの、有意差を得るまでには至らなかった。次に8週間の長期にわたるCCl4投与による慢性肝障害モデルマウスにおいては、同様に線維化の改善や生存率が改善傾向にあったものの有意差は得られなかった。しかし**p27<sup>Kip1</sup>KO**マウスをレシピエントに用いた急性実験では、生存の延長が認められた。また急性肝障害モデルにおいて、肝組織内での肝障害刺激の前後の遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイを用いて解析を行なったところ、野生型と比べ**p27<sup>Kip1</sup>KO**マウス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。

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、トランスクリプトーム解析の結果も踏まえて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考え本研究を計画した。

多くの細胞はある程度増殖すると、増殖サイクルのG1期から逸脱し、G0期の状態になる。一旦G0期に逸脱した細胞は、何らかの増殖シグナルを受けない限りG0期に留まった状態で経過し、その後分化、老化、死といった方向へと進行する。肝細胞は様々な障害を受けると、G0期の状態から増殖シグナルを受けてG1期に再進入し、細胞分裂が開始するといった特徴を持つ。我々はこの肝細胞において、肝再生への一步を踏み出すG0期からG1期への再進入が増殖シグナルによって起こる点に着目し、この時に働く分子の発現をコントロールする事により、障害肝における肝再生を“より効果的に行なう”ことが出来ないかを検討することとした。

**p27<sup>Kip1</sup>**はG0期において核内に蓄積しCDK活性を抑制することにより細胞をG0期に停止させるが、G0-G1移行期にはG1早期サイクリンであるサイクリンD2に依存した細胞質への輸送がおり、そこでKPCにより分解を受けることにより、G1期への再進入が可能となる事を我々は明らかにしてきた(Nat.Cell Biol.2004、Mol.Cell.Biol.2007)。**p27<sup>Kip1</sup>**ノックアウトマウスは肝臓を含め体格や臓器の肥大が認められるが、**p27<sup>Kip1</sup>**を分解する**Skp2**とのダブルノックアウトマウス(DKO)では、体格や臓器のサイズは正常化する事より細胞

や器官の再生、増殖に必要な分子として**p27<sup>Kip1</sup>**は必要であり、その発現調節分子として**Skp2**は重要な役割を担っている事を我々は報告した(EMBO J 2000、Dev.Cell 2004)。



## 2. 研究の目的

G0期で停止した肝細胞に**p27<sup>Kip1</sup>**を分解することによるG1期への再進入により、肝再生を促進させる事が可能かを解析する。得られた結果を基に、臨床応用を目指した新たな肝再生治療の開発を行なう。

## 3. 研究の方法

肝再生を担う分子メカニズムとして、細胞周期関連分子、特に**p27<sup>Kip1</sup>**の発現、分解系に着目し、それを調節することによりG0期に留まっている肝細胞をG1期へと再進入させうるかを、培養細胞系ならびに肝障害モデルマウスを用いて、解析を行なう。

**p27<sup>Kip1</sup>**の分解が細胞周期を回転させる契機となることから、G0期ならびにG0-G1期に発現する、**p27<sup>Kip1</sup>**の輸送、分解に必要なサイクリンD2、**Skp2**、KPCをウイルスベクターを用いて細胞内に発現させることにより、肝細胞の分裂、増殖を促す事が可能となるかを探る。また自然経過で肝細胞が分裂する胎児期にも注目し、肝障害時の肝再生、増殖と発生、分化における肝細胞増殖との間で、細胞周期関連分子の発現の違いが認められるか否かについても比較検討を行い、生理的かつ安全な肝細胞増殖促進因子の存在を明らかにする。加えてG0期にある肝細胞をG1期へと再進入することのできるエストリオール(E3)の投与による、肝細胞増殖メカニズムについても細胞周期関連分子の発現の点から解析を行ない、その投与により肝細胞の増殖に対して、修飾効果が認められるかも検討を行なう。

## 4. 研究成果

前年度までの研究結果より、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ため、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考え研究を行った。肝再生を担う分子メカニズムとして、細胞周期関連分子、特に p27<sup>Kip1</sup> の発現、分解系に着目し、p27<sup>Kip1</sup> を介して G0 期にある肝細胞を G1 期へと再進入することが可能と考えられるエストロール (E3) ならびにエストラジオール (E2) を用いた肝再生促進モデルで検討を行った。それらの投与により Ki67 や BrdU の免疫染色を行ったところ、投与により陽性率が増加したため、細胞周期を促進させ肝再生の一端を担っている事は確認できたが、急性肝障害モデルマウスに対して投与を行った場合での有意な傷害改善効果は認められなかった。そのためこれらの実験系において実際に p27<sup>Kip1</sup> を介して再生促進が行われているかを検討する為に、p27<sup>Kip1</sup> の発現を Western blotting にて確認を行ったが、有意な発現の変化は認められなかった。また CCl<sub>4</sub> を用いた肝障害モデルマウスでの検討より、p27<sup>Kip1</sup> ノックアウトマウスでは CCl<sub>4</sub> 投与前後で apoptosis に関与する遺伝子の発現増加が認められた事より、肝再生において p27<sup>Kip1</sup> は逆に抑制系に関与している可能性も考えられた。

さらに、肝障害の刺激を与えた直後に E2 を投与した群では、逆に生存率が低下するといった、当初の予想と異なる結果が得られた。そこでこれらの実験系において肝障害後の E2 の投与時期を変えて再度検討を行なったところ、投与時期の違いにより生存率が異なる事を見いだした。そのためそれぞれの投与時期における細胞周期関連分子、ならびに apoptosis に関与する遺伝子の発現の違いが生存率の違いに結びついている可能性を考え、Western blot にて蛋白の発現解析を行なった。その結果、E2 の投与時期の違いにより細胞周期関連蛋白の発現パターンが異なること、また apoptosis の頻度も異なることを確認し、障害肝における再生において、時期特異的にこれらの分子が重要な働きをしていることが確認出来た。これらの結果を細胞レベルで確認するために、培養細胞系においても検討を行った。Huh7、HepG2 に E2 を投与し、その増殖を比較したところ、E2 投与群において若干の増加促進が認められたものの、有意差は得られなかった。

今後は培養細胞系、肝障害マウスそれぞれにおける時期特異的な細胞周期関連分子の発現解析ならびに DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行なうことにより、その発現のパターンを比較することにより再生に関与する責任分子の同定ならびに p27 の上流のシグ

ナルを担う責任分子の同定を行なうための研究を行う予定である。

## 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 12 件)

- (1) Watanabe T, Sasaki Y, Nakao M. (他 6 名、8 番目) Higher-Order Chromatin Regulation and Differential Gene Expression in the Human Tumor Necrosis Factor/Lymphotoxin Locus in Hepatocellular Carcinoma Cells *Mol Cell Biol* in press
- (2) Taura N, Sasaki Y, (他 13 名、7 番目), Sata M. The incidence of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C infection decreased in Kyushu area. *Med Sci Monit* 17:7-11, 2011
- (3) Sasaki Y. Insulin resistance and hepatocarcinogenesis. *Clin J Gastroenterol* 3:271-278, 2010 査読あり  
Tateyama M, Nagahama H, Sasaki Y, Ishibashi H. (他 9 名、6 番目) Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 46:92-100, 2011
- (4) Yokomine K, Y Sasaki Y and Nishimura Y. (他 14 名、16 番目) The Forkhead Box M1 transcriptional factor as a possible immune-therapeutic tumor-associated antigen. *Int J Cancer* 126:2153-63, 2010 査読あり
- (5) Dessouki O, Nagahama H, Sasaki Y, Okada S. (他 3 名、6 番目) Chronic hepatitis C viral infection reduced NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 393:331-337, 2010 査読あり
- (6) Ikeda K, Nagahama H, Tanaka M, Sasaki Y. (他 3 名、4 番目): Transcatheter arterial infusion chemotherapy with cisplatin-lipiodol suspension in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45:60-67, 2010 査読あり
- (7) Naoe H, Sasaki Y, Kuninaka S. (他 9 名、7 番目) The anaphase-promoting complex /cyclosome activator cdh1

modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol Cell Biol* 30: 3994-4005, 2010 査読あり

- (8) Ikuta Y, Sasaki Y, Nishimura Y. (他 8 名、8 番目): Identification of the H2-K<sup>d</sup>-restricted CTL epitopes of a tumor-associated antigen, SPARC, which can stimulate antitumor immunity without causing autoimmune disease in mice. *Cancer Science* 100:132-137, 2009、査読あり
- (9) Yokoo K, Sasaki Y, Saito H. (他 3 名、5 番目): Effects of oral administered S-1 on the pharmacokinetics of SN-38, irinotecan active metabolite, in patients with advanced colorectal cancer. *Ther Drug Monit* 31:400-403, 2009、査読あり
- (10) 佐々木裕、細胞死と免疫監視機構からの回避 特集 細胞死をめぐる最近のトピックス *Surgery Frontier* 2009 年 16 巻頁 60-65、査読無し
- (11) 佐々木裕、知っておきたい肝炎ウイルスと肝発癌 特集 肝細胞癌の治療 2009 ~2011 コンセンサス癌治療 2009 年 8 巻頁 121-125、査読無し
- (12) 紙屋康之、田中基彦、佐々木裕、分担 アルコールと肝癌 最新医学 別冊 新しい診断の ABC 62 「アルコール性肝障害」高後裕 編、頁 141-149、2009 年 最新医学社、東京、査読無し

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 瀬戸山博子、田中基彦、佐々木 裕  
アルブミンの構造的・機能的変化から見た分岐鎖アミノ酸治療の意義  
シンポジウム「肝硬変患者の栄養マネジメント、治療」  
JDDW2011 (第 15 回日本肝臓学会大会・第 53 回日本消化器病学会大会・第 9 回日本消化器外科学会大会・第 42 回日本消化吸収学会総会合同)  
2011 年 10 月 21 日、福岡
- 2) 田中基彦、福林光太郎、立山雅邦、葦原 浩、紙屋康之、吉丸洋子、永濱裕康、佐々木 裕  
当科における非 B 非 C 肝癌の臨床的特徴  
ワークショップ「非 B 非 C 肝癌の実態と特徴」  
第 47 回日本肝癌研究会  
2011 年 7 月 29 日、静岡
- 3) 瀬戸山博子、田中基彦、南雲恒平、工藤 洋子、福林光太郎、立山雅邦、紙屋康之、葦原 浩、永濱裕康、丸山 徹、佐々木 裕

慢性肝疾患におけるアルブミンの構造的・機能的変化の検討-特に抗酸化機能について-

ワークショップ「代謝・酸化ストレスの場としての肝臓」

第 47 回日本肝臓学会総会  
2011 年 6 月 2 日、東京

- 4) 直江秀昭、田中基彦、佐々木 裕  
遺伝子解析と蛋白質機能解析による肝癌の細胞死抵抗性の解明  
ワークショップ「DNA・マイクロ RNA 解析からの消化器疾患の診断・治療・病態解明」  
第 97 回日本消化器病学会総会  
2011 年 5 月 13 日、東京
- 5) 田中基彦、永濱裕康、佐々木 裕  
蛋白質翻訳後修飾解析による肝癌の治療抵抗性の解明  
シンポジウム 17「肝がんのメカニズムと治療戦略」  
第 52 回日本消化器病学会大会、  
2010 年 10 月 15 日、横浜
- 6) Sasaki Y, Dessouki O, Tanaka M, Nagahama H, Kamiya Y, Tateyama M, Suzu S and Okada S.  
Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion  
HCV 2010, Sep 12, 2010, Yokohama, JAPAN
- 7) 田中基彦、葦原 浩、福林光太郎、紙屋康之、工藤洋子、立山雅邦、永濱裕康、佐々木 裕  
当科初回治療例における非 B 非 C 肝癌の臨床的特徴  
ワークショップ 2 「非 B 非 C 肝癌の現況」  
第 46 回日本肝癌研究会、  
2010 年 7 月 8 日、大阪
- 8) 田中基彦、丸山 徹、佐々木 裕  
慢性肝疾患におけるアルブミンの構造的・機能的変化と病態への関与についての検討  
第 46 回日本肝臓学会総会 一般演題  
2010 年 5 月 28 日、山形
- 9) 田中基彦、丸山徹、佐々木裕  
肝疾患におけるアルブミン構造多様性変化の検討 パネルディスカッション「肝硬変の対策～原因療法から合併症の対策～」第 38 回日本肝臓学会西部会、2009 年 12 月 4 日、米子
- 10) 田中基彦、横峯和典、佐々木裕  
肝細胞癌に対する癌ワクチン療法を用いた治療戦略 パネルディスカッション「肝細胞癌の集学的治療の現状と近未来的治療 (分子標的治療を含めて)」第 13 回日本肝臓学会大会  
2009 年 10 月 15 日、京都
- 11) Tanaka M, Fukubayashi K, Ashihara H,

Kamiya Y, Kudo Y, Tateyama M, Nagahama H and Sasaki Y. Changes in clinical background of patients with hepatocellular carcinoma in Kumamoto. 3<sup>rd</sup> International HCC symposium, May 8, 2009, Kobe, JAPAN

〔図書〕（計 0 件）

## 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・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：70235282

### (3) 連携研究者

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