

## 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 4月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790272

研究課題名（和文） 肝臓における Periplakin の機能解析

研究課題名（英文） Studies on the roles of Periplakin in liver

研究代表者

伊藤 慎二（ITO SHINJI）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50362512

研究成果の概要（和文）：

Periplakin は Plakin ファミリーに属する、生体内での生理的役割が未解明の分子である。我々は、Periplakin が肝臓において、胆汁鬱滞あるいは胆汁鬱滞性肝炎に特異的な、著しい発現昂進を示すことを明らかにした。また、総胆管結紮によって *periplakin* ノックアウトマウスおよび野生型マウスに胆汁鬱滞を惹起させた際、両者の肝臓において、肝臓恒常性維持に関わる遺伝子群の発現プロファイルが有意に異なることを明らかにした。これらの結果から、Periplakin は肝臓の恒常性維持に関わる、新しい重要な分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Periplakin is one of the plakin family of cytoskeletal proteins whose physiological roles *in vivo* is not fully elucidated. We have revealed that periplakin massively accumulates in hepatocytes following cholestatic injury. In addition, *periplakin*-null mice exhibited difference in the expression of genes related to hepatic homeostasis. Therefore, periplakin is likely involved in keeping hepatic homeostasis under cholestatic situations in liver.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	80,000	240,000	1,040,000
2011年度	80,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学，医科学一般

キーワード：肝臓，遺伝子発現，恒常性維持

## 1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は消化吸収にとって必須であるばかりでなく、シグナル因子として様々な生理現象に関わることが近年明らかにされている。胆汁酸を内因性リガンドとする核内受容体 FXR (farnesoid X receptor) は、胆汁酸シグナル伝達において、中心的な役割を果たす分子である。我々は、今までに知られていない FXR・胆汁酸関連分子を見つけ出す目的で、FXR を欠損するマウスや、胆汁酸を混餌投与したマウスの肝臓の、網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、Plakin ファミリー分子の一つ Periplakin の発現が、FXR を欠損するマウスの肝臓で有意に減少する一方で、胆汁酸を投与したマウスの肝臓では著明に亢進することを見出した。Plakin が FXR や胆汁酸によって動的発現制御を受けるとの報告は全くなかったことから、Periplakin, FXR, 胆汁酸が、肝臓でどのように協働するのかについて興味を持たれた。

Plakin は、サイトリンカーとも呼称される棹状の巨大分子の一群であり、細胞接着複合体と細胞内骨格とを接続することによって、細胞の構造維持に寄与することが主要な役割である。Periplakin についても、アクチンや中間径フィラメント等、様々な構造分子と培養細胞内で結合することが示されていることから、同様のリンカー機能を持つ可能性が示唆されていた。また、Periplakin は、皮膚角質層の主要成分の一つであることが古くから知られており、天疱瘡などの自己免疫疾患における自己抗原となることも明らかにされていた。しかしながら、これら多くの知見にも関わらず、*periplakin* ノックアウトマウスが通常の飼育条件下では何の表現型も示さないことなどから(Aho S. et al, *Mol. Cell. Biol.*, 24(14): 6410-6418, 2004), 生体内での実際の機能については、長らく未解明のままであった。

我々が肝臓で見出した、胆汁酸や FXR を介した、Periplakin の動的発現制御は、Periplakin の機能を解明する上で、今までにない切り口となり、新しい展開やブレイクスルーにつながることを期待された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が見出した、FXR・胆汁酸関連分子 Periplakin の機能を、主に肝臓における役割に注目して解明することである。また、*periplakin* ノックアウトマウスを用いる *in vivo* 解析によって、これまでに様々な研究グループによって報告されてきた、*in vitro* 解析による知見を、包括的に統合することを目指した。さらに、本研究では、Plakin のような構造分子が、環境に応じて動的に発現を変化させ、生体恒常性維持に寄与するしくみを解明し、新しい概念として提出することを、中長期的な目標として設定した。

## 3. 研究の方法

(1) Periplakin の発現に影響する因子の網羅的探索 (各種モデルマウスの作製と Periplakin の発現解析)

野生型マウス (C57BL/6JJC1 (日本クレアより購入)) に対して、コール酸含有餌 (基本餌 (繁殖用 NMF (オリエンタル酵母より購入)) に対して、重量比で 0%, 0.1%, 0.25%, 1% となるようにコール酸を混合) を 7 日間投与する群, SDS 含有水 (通常の飲用水に対して、0%, 0.1%, 0.25%, 1% となるように SDS を混合) を 7 日間投与する群, Concanavarin A を尾部静脈に注射する群, 四塩化炭素

(carbontetrachloride (CCl<sub>4</sub>)) を腹腔内投与する群,  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate (ANIT) を経口投与する群, あるいは総胆管結紮を施す群を用意し、胆汁鬱滞を伴うものと、伴わないもの、急性のものから、慢性のものまで、様々なタイプの肝傷害モデルマウスを作製した。また、遺伝的に脂肪肝あるいは脂肪肝を発症するマウスである、*ob/ob* マウス (日本エスエルシーより購入) を基本餌で飼育することによって脂肪肝モデルマウスを用意した。

これらのモデルマウスを安楽死させた後、血液および肝臓を採取し、液体窒素で凍結した後、ディープフリーザー内で保存した。凍結保存した肝臓小片から total RNA および total protein を抽出し、Periplakin の発現を、mRNA レベルでは定量的 PCR によって、タンパク質レベルでは、抗 Periplakin 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって検討した。また、抗 Periplakin 抗体およ

び凍結切片を用いた免疫組織染色によって、Periplakin の組織、細胞内局在についても併せて検討した。

#### (2) *periplakin* ノックアウトマウスの作製 (遺伝的背景の純化)

様々な遺伝的背景 (genetic background) の混在する *periplakin* ノックアウトマウスを、C57BL/6JCl (日本クレアより購入) に複数回戻し交配 (backcross) することによって、遺伝的背景が純化された *periplakin* ノックアウトマウスを作製した。

本研究の大部分は、主に、戻し交配を3回行った群を用いて行った。同一コロニーに属する野生型マウスを対照群として用いた。

#### (3) *periplakin* ノックアウトマウスの表現型解析

*periplakin* ノックアウトマウスおよび野生型マウスに総胆管結紮を施し、2日後、1週間後、3週間後に安楽死させ、血液、および肝臓を採取し、血清学的、組織学的解析に供した。また、肝臓小片から total RNA を抽出し、定量的 PCR 法を用いて、遺伝子発現プロファイリングを行った。定量的 PCR は SYBR Green および遺伝子特異的プライマーを用いる *delta delta* Ct 法により行った。対照となる内部標準遺伝子 (internal control) としては、グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*)), あるいは U36B4 リボソーム RNA 遺伝子 (*36b4*) を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) Periplakin の発現亢進と胆汁鬱滞性肝炎との関連の発見

野生型マウスに胆汁酸混餌投与を含む様々な処置を施し、Periplakin の発現量や組織、細胞内局在を定量的 PCR、ウェスタンブロッティング、または免疫組織染色によって検討した。*periplakin* の mRNA レベルでの発現は、胆汁鬱滞を惹起させる処置によって、極めて強く亢進した。その他のほとんどの処置によっても、*periplakin* の mRNA 発現は、一定程度亢進したが、その程度は胆汁鬱滞を伴う傷

害時に比べて低かった。次に、タンパク質レベルでの発現を検討したところ、Periplakin タンパク質は、胆汁鬱滞を伴う傷害下で肝臓内に著明に蓄積し、その蓄積部位は主に肝細胞であることが分かった。これらの結果から、Periplakin は肝細胞で、胆汁鬱滞、あるいは、胆汁鬱滞性肝炎と密接に関連する機能を持つ可能性が示唆された。これまでに Periplakin が胆汁鬱滞、あるいは、胆汁鬱滞性肝炎に関連するとの報告は全く存在しなかったことから、本発見は、Periplakin の生理的役割を解明するための、重要な知見となると考えられた。

#### (2) *periplakin* ノックアウトマウスと野生型マウスの、総胆管結紮に対する反応性の違いの発見

*periplakin* ノックアウトマウス (2~3 ヶ月齢、雄)、および、性別と週齢をあわせた野生型マウスの総胆管を手術糸により2重に結紮し、2日後、1週間後、および3週間後の両者の肝臓における遺伝子発現プロファイルや、血清マーカープロファイルを網羅的に比較した。その結果、*periplakin* ノックアウトマウスの肝臓と、野生型マウスの肝臓とでは、肝臓の恒常性維持に関わる遺伝子群の発現に有意な差が認められた。これらの発見により、Periplakin が胆汁鬱滞時の肝臓の恒常性維持に寄与する可能性が示唆された。

#### (3) まとめと考察

以上の発見は、①Periplakin の生体内での役割の一端が初めて明らかにされたこと、②Plakin ファミリー分子が環境に応じた動的発現制御を受けて細胞に蓄積し、組織の恒常性維持に寄与するという、新しい概念を提出できたこと、という少なくとも2つの点において意義があった。

今後は、遺伝的背景の純化をより進めた群を用いて、*periplakin* ノックアウトマウスと、野生型マウスの差を、繊細に比較し、*periplakin* ノックアウトマウスの表現型を、肝臓のみならず、全身レベルで明らかにしていく必要がある。さらに、明らかにした表現型が顕れるメカニズムを解明し、Periplakin の分子的な作用機序を明らかにすることを目指したい。

## 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) Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system *in vivo*.  
Ken-ichi Tomiyama, Ryota Maeda, Itaru Urakawa, Yuji Yamazaki, Tomohiro Tanaka, Shinji Ito, Yoko Nabeshima, Tsutomu Tomita, Shinji Odori, Kiminori Hosoda, Kazuwa Nakao, Akihiro Imura, Yo-ichi Nabeshima.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010; 107(4): 1666-1671 (査読有) (DOI: 10.1073/pnas.0913986107)

(2) Intestinal hypoxia-inducible transcription factors are essential for iron absorption following iron deficiency  
Yatrik M. Shah, Tsutomu Matsubara, Shinji Ito, SunHee Yim, Frank J. Gonzalez  
*Cell Metabolism*, 2009; 9(2): 152-164 (査読有) (DOI: 10.1016/j.cmet.2008.12.012)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 慎二 (ITO SHINJI)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 50362512