

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25年5月7日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659245

研究課題名（和文） オートファジーからみた病的肝再生の病態解明

研究課題名（英文） The biological role of autophagy in liver regeneration in pathological condition.

研究代表者

調 憲 (SHIRABE KEN)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：70264025

研究成果の概要（和文）：本研究により、肝再生にオートファジーがエネルギー産生の面で重要な役割をになっていることが明らかになった。肝特異的コンディショナル Atg-5 ノックアウトマウスを作成したところ、Atg-5 ノックアウトマウスでは 70%肝切除後のオートファゴゾームの消失をはじめとしたオートファジーの抑制が見られ、肝細胞の分裂の遅延、アポトーシスが認められた。90%肝切除モデルではオートファジーがノックアウトされることで全例が死亡した。70%肝切除後にはノックアウトにより肝 ATP の低下、ミトコンドリアの膜障害、ネットワーク形成不全を伴っていた。一方、肝重量はノックアウト群で有意に増加していた。肝細胞の分裂遅延が起きる際には肝重量の低下を示すことが一般的である。しかしながら、本モデルでは肝重量はむしろ増加していた。さらにアルブミン合成の遅延など肝機能障害を伴う肝細胞の肥大を認めた。Scenescence associated β galactosidase をはじめとした細胞老化のマーカーが強発現しており、細胞老化が惹起されている可能性がある。今後の展開としてオートファジーを制御する遺伝子群の各種病態における発現を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：This research project has revealed that the autophagy of hepatocytes play important role in energy production during liver regeneration. The impairment of autophagy induces cell cycle arrest of hepatocytes and apoptosis, dysfunction of mitochondria. Thereafter hepatocyte hypertrophy occurs and this may due to cell scenescence of hepatocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 0 | 1,900,000 |
| 2011年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2012年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 300,000 | 3,200,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは低酸素、飢餓のストレス状態で活性化される細胞のリソソームを蛋白分解の場とする非選択的・大規模な蛋白質

の分解経路で、細胞内蛋白質やオルガネラの再編成を行い、エネルギーを産生するとともに、細胞機能の維持を行う機構である。

一方、肝再生は莫大なエネルギーを消費す

る生命現象として知られており、肝再生の開始直後から肝臓における ATP の産生能は亢進するが、エネルギーチャージは低下することが報告されていた。すなわち、肝再生期の肝臓はエネルギー枯渇状態にあり、これが何らかの要因で増悪すれば肝不全が招来されるし、エネルギー枯渇が回避できればさらに肝再生が促進されるのではないかと考えられる。

また、肝再生期におけるオートファジーの役割は明らかではなかった。そこで本研究の第一の目標として肝再生時におけるオートファジーの役割の解明とその障害時におきる病態の解明をオートファジーの重要な因子である Atg 5 のノックアウトマウスを用いて行うこととした。

さらに研究を進める過程で、最近オートファジーを制御している遺伝子の解明が進んできた。例えば、当初長寿遺伝子として注目を集めた SIRT1 は NAD 依存性のヒストン脱アセチル化酵素であり、エネルギーセンサーを持つ HDAC としての重要な役割が解明されつつある。SIRT1 はわれわれがノックアウトした ATG5 の脱アセチル化を行うことにより、オートファジーを制御することが明らかになってきた。われわれは SIRT1 が加齢や肝癌発がんの肝臓ではその活性が低下している可能性を指摘した。すなわち、このような病態においては SIRT1 の活性低下に伴い、オートファジーが低下している可能性がある。

2. 研究の目的

肝再生におけるオートファジーの役割を明らかにし、オートファジーが抑制されるとされる高齢、脂肪肝などの病態におけるオートファジー活性化による再生促進を図り、臨床応用を行うための基礎研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

Mx-Cre トランスジェニックマウスを作成することで、肝特異的 Atg5 のノックアウトマウスを作成し、肝再生に与える影響を検討する。オートファジーの指標として LC-3 の form I, II と Beclin 1, p62 の発現を検討し、電子顕微鏡にてオートファゴゾームの定量を行った。肝細胞分裂に与える影響として分裂のマーカー、FACS 解析による細胞周期に与える影響、アポトーシスマーカー、p21 などを検討した。エネルギー調達系として肝 ATP、ミトコンドリア膜電位、 β 酸化に関連する遺伝子発現の RT-PCR による評価、ミトコンドリア膜電位、形態的なミトコンドリア・ネットワーク形成の評価を行った。また、細胞のサイズを E-cadherin 染色後の面積として評価した。細胞老化のマーカーとして

scenescence associated β galactosidase 染色、IL8、Poly Ub 蛋白を western blotting にて評価した。

4. 研究成果

本研究の成果として肝再生においてオートファジーがエネルギー産生の面で重要な役割をになっていることが明らかになった。

Atg-5 ノックアウトマウスでは western blotting にて Atg-5 は完全に消失し、活性化型の LC-3 form II や Beclin 1 の発現は減少した。その結果、形態学的にオートファゴゾームは消失した。

Atg-5 ノックアウトマウスに対して行った 90%肝切除後には全例死亡し、コントロール群に比べ、有意に生存率は不良であった。70%肝切除後の BrdU の取り込み低下、G0/G1 期の増加、Cyclin D の低下、p21 の増加をはじめとする肝細胞の分裂の遅延が著明であった。Cleaved PARP-1 をマーカーとするアポトーシスが認められた。これは肝 ATP の低下、MCAD、CPT、L-FABP、FAS などの β 酸化関連酵素の発現低下、ミトコンドリアの膜電位の低下、 β hydroxybutylate の低下、ミトコンドリアのネットワーク形成不全を伴っていた。アルブミンの産生低下、AST の上昇、などの肝機能の低下も伴っていた。

一方、肝重量はノックアウト群で有意に増加しており、肝細胞の肥大を認めた。これは通常肝再生の低下が起こる時には肝重量の減少することから、本実験モデルの際立った特徴と考えられる。この原因を解明するため、細胞老化を検討した。すなわち、心臓でオートファジーを障害すると心筋の機能低下を伴う心肥大が認められ、心筋細胞の老化による筋肉の肥大がその原因として考えられており、肥大型心筋症のモデルとして注目を集めている。したがって、肝臓においてもオートファジーが低下することによるエネルギー失調が原因となり、再生の低下や肝機能の低下については肝発がんが招来されている可能性があると考えた。

その結果、オートファジーノックアウト群では肝細胞における scenescence associated β galactosidase 染色は強陽性で、IL8、Poly Ub 蛋白の発現も亢進していた。これらは細胞老化の基準を完全に満たしている、

いまだ、肝細胞の細胞老化に関しては世界的にも研究が進んでいないために、これらの知見は極めて先進性の高いものと考えている。

さらに今後の展開として、われわれは SIRT1 の発現促進によるオートファジー再

活性化を目指す。すなわち、加齢や脂肪肝でオートファジーの活性が低下していることは報告されているものの、その機序は明確ではない。

われわれはウイルス性肝炎を伴っていない肝細胞癌切除症例の非癌部で SIRT1 活性が失われていることが明らかにしてきた。前述した通り、SIRT1 は ATG5 の脱アセチル化を介してオートファジーを制御している可能性がある。現在世界的に SIRT1 の活性化剤が開発されているところであり、SIRT1 が再活性化できればオートファジーの活性促進による肝再生の促進が現実化する可能性がある。

今後は病態肝モデルにおける SIRT1・オートファジーの関連を各種病態で明らかにし、高齢肝、脂肪肝の再生促進を目指す。

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 1 件)

- ① Toshima T, Shirabe K, Yoshiya S, Mano Y, Motomura T, Ikegami, T; Yoshizumi, T; Maehara, Y. Autophagy Enhances Hepatocellular Carcinoma Progression by Activation of Mitochondrial β -oxidation. J Gastroenterol 2013, In press.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 戸島剛男、武富紹信、調 憲、武石一樹、吉松正憲、本村貴志、間野洋平、武藤 純、的野る美、伊地知秀樹、原田 昇、内山秀昭、吉住朋晴、前原喜彦 パネルディスカッション演題名：肝再生におけるオートファジーの意義 JDDW2010 (2010 年 10 月 13 日～16 日、大阪)
- ② 戸島剛男、調 憲、武富紹信、武石一樹、吉松正憲、本村貴志、間野洋平、武藤 純、的野る美、伊地知秀樹、原田 昇、内山秀昭、吉住朋晴、前原喜彦 一般口演 演題名：肝細胞癌におけるオートファジーの意義 第 49 回日本癌治療学会 (2010 年 10 月 27 日～29 日、名古屋)
- ③ Toshima T, Shirabe K, Taketomi A, Takeishi K, Yoshimatsu M, Motomura T, Mano Y, Muto J, Ijichi H, Harada N, Uchiyama H, Yoshizumi, T; Maehara, Y. Title : The biological significance of autophagy in hepatocellular Carcinoma. The 6th International Society

of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC) (2011 年 1 月 6 日～8 日、Kamakura)

- ④ 戸島剛男、調 憲、武富紹信、武石一樹、吉松正憲、本村貴志、間野洋平、武藤 純、的野る美、伊地知秀樹、原田 昇、内山秀昭、吉住朋晴、前原喜彦 ワークショップ 演題名：肝再生におけるオートファジーの意義 第 111 回日本外科学会定期学術集会 (2011 年 5 月 26 日～28 日、東京)
- ⑤ 戸島剛男、調 憲、武富紹信、本村貴志、間野洋平、武藤 純、的野る美、吉屋匠平、森田和豊、萱島寛人、池上 徹、吉住朋晴、前原喜彦 ワークショップ 演題名：肝再生におけるオートファジーの意義 第 66 回日本消化器外科学会定期学術集会 (2011 年 7 月 13 日～15 日、名古屋)
- ⑥ 戸島剛男、調 憲、武富紹信、福原崇介、吉屋匠平、本村貴志、間野洋平、武藤 純、的野る美、森田和豊、吉住朋晴、池上 徹、前原喜彦 一般口演 演題名：肝細胞癌におけるオートファジーの意義 第 47 回日本肝癌研究会 (2011 年 7 月 28 日～29 日、静岡)
- ⑦ Toshima T, Shirabe K, Yoshiya S., Muto J., Matono R., Mano Y., Morita K., Kayashima H., Ikegami T., Yoshizumi T., Maehara Y パネルディスカッション演題名：Significance of autophagy in liver regeneration 肝再生におけるオートファジーの意義 第 112 回日本外科学会定期学術集会 (2012 年 4 月 12 日～14 日、東京)
- ⑧ 戸島剛男、調 憲、吉屋匠平、武藤 純、的野る美、間野洋平、森田和豊、萱島寛人、池上 徹、吉住朋晴、前原喜彦 パネルディスカッション 演題名：肝再生におけるオートファジーの生物学的意義 第 48 回日本肝臓学会総会 (2012 年 6 月 7 日～8 日、石川)
- ⑨ 戸島剛男、調 憲、吉屋匠平、播本憲史、山下洋市、池上 徹、内山秀昭、吉住朋晴、副島雄二、前原喜彦 パネルディスカッション 演題名：肝再生におけるオートファジーの意義 第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013 年 4 月 11 日～13 日、福岡)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

調 憲 (Shirabe Ken)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：70264025

(2) 研究分担者

前原 喜彦 (Maehara Yoshihiko)

九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80165662

戸島 剛男 (Toshima Takeo)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：40608965