

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591989

研究課題名(和文) 病的肝の再生過程におけるオートファジーの分子機序解明

研究課題名(英文) Impact of autophagy in liver regeneration

研究代表者

吉住 朋晴 (Yoshizumi, Tomoharu)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80363373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生におけるオートファジーの役割を解明するため、肝臓特異的にオートファジー関連遺伝子(Atg5)をノックアウト(KO)したマウス肝切除モデルを用いて実験を行った。70%肝切除後細胞分裂の減少により、肝再生は障害されたが、肝細胞の代償性肥大を認めた。肝切除により細胞内ATPと酸化の減少、細胞内ミトコンドリア障害、p62とユビキチン化蛋白の肝内への蓄積を認めた。再生肝における、細胞内蛋白質の再編成障害が示唆された。以上の結果から、オートファジーは肝切除後の肝再生において、エネルギー産生、蛋白質再編成、細胞老化への防御機構として重要な過程であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the activity of autophagy-associated pathways in liver regeneration after partial hepatectomy (PHx) in liver-specific autophagy-related gene 5 (Atg5) knockout (KO) mice. Liver regeneration was severely impaired by 70% PHx, with a reduction in postoperative mitosis, but a compensating increase in hepatocyte size. PHx induced intracellular adenosine triphosphate and beta-oxidation reduction as well as injured cellular mitochondria. Furthermore, PHx in Atg5 KO mice enhanced hepatic accumulation of p62 and ubiquitinated proteins. These results indicated that reorganization of intracellular proteins and organelles during autophagy was impaired in the regenerating liver of these mice. Up-regulation of p21 was associated with hepatocyte senescence, senescence-associated b-galactosidase expression, irreversible growth arrest, and secretion of senescence-associated molecules, including interleukin (IL)-6 and IL-8.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・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

肝再生は古くから組織再生モデルとして様々な面から研究されてきた。我々は、これまでに肝再生及び肝移植、または肝虚血・再灌流傷害に関する一連の研究を行い、肝再生促進により肝障害を認めるさまざまな疾患の治療成績の向上を目指してきた。

一方、オートファジーは、細胞内のタンパク質を分解するための仕組みの一つであり、細胞内蛋白質の分解と合成(再編成)に重要な働きを担っていることが明らかになってきた。オートファジーは、細胞内での異常なタンパク質の蓄積予防、栄養環境が悪化したときのタンパク質リサイクル、細胞質内に侵入した病原微生物の排除などにより、生体の恒常性維持に参与している。蛋白質分解・再編成、

エネルギー産生、に極めて重要な役割を果たすオートファジーは、肝再生という高度に組織化された生命現象をコントロールする可能性は極めて高いと考えられるが、肝再生における役割はいまだ不明である。

2. 研究の目的

細胞内蛋白質の分解と再編成に重要な働きを担っているオートファジーに着目し、肝再生におけるオートファジーの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1). Cre-loxP系を用いた、肝特異的オートファジー関連遺伝子(Atg5)ノックアウト(KO)マウスを作成した。

(2). マウス70%あるいは90%肝切除モデルを用いて、コントロール群とAtg5KO群で以下の検討を行った。

a) オートファジーの発現 b) BrdU取り込み率 c) p62蛋白の発現 d) 細胞周期

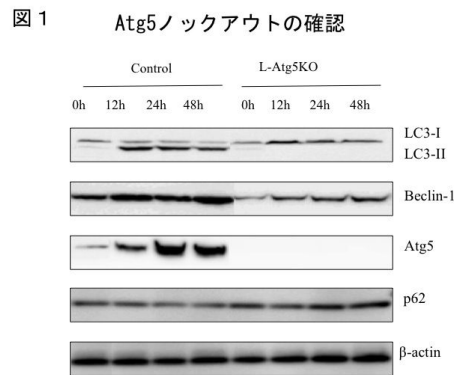
(3). 肝細胞肥大の評価

(4). 細胞老化状態の評価

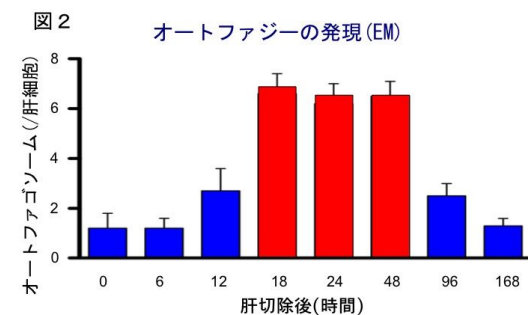
(5) 肝内エネルギーの評価: ATP, ミトコンドリア膜電位, 酸化

4. 研究成果

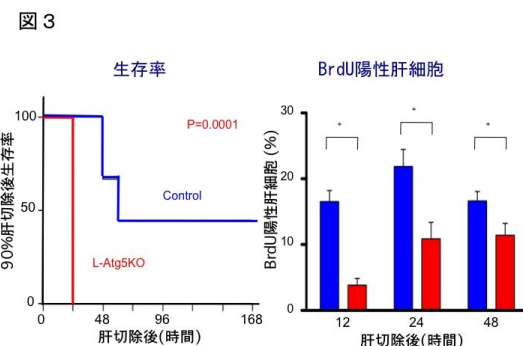
(1)Atg5 の肝特異的 KO を確認した(図1)。



(2)マウス肝切除後の再生肝で、オートファジーの高発現を確認した。その形態は飢餓状態の肝臓で発現するものと同様であった。特に術後18時間~2日目に著明なオートファジーの活性化を認めた(図2)。

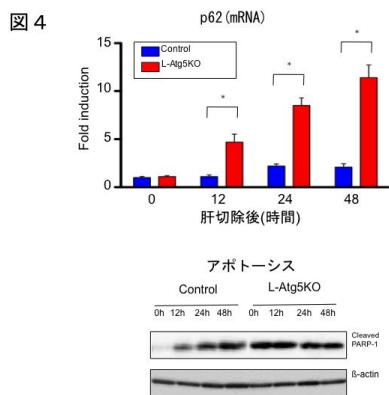


(3)オートファジーの抑制により、コントロール群に比べ、90%マウス肝切除モデルにおける生存率の低下、BrdU取り込み率の低下を認めた(図3)。

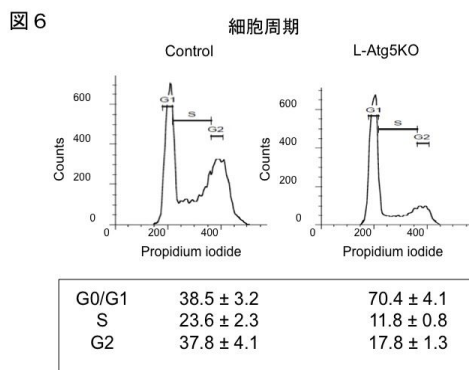
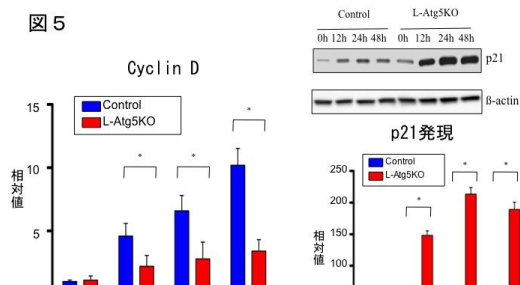


(4)コントロール群に比べ、障害蛋白質である p62 の肝組織中への蓄積、肝細胞アポトーシスの増加 (Cleaved PARP-1 の増加) を認め

た(図4)。



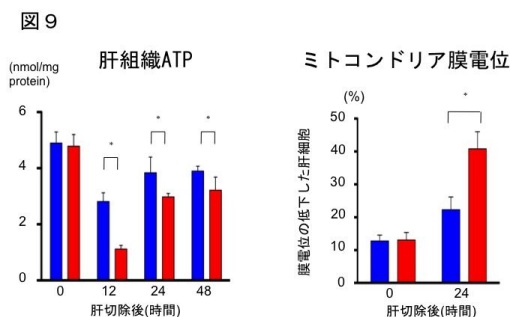
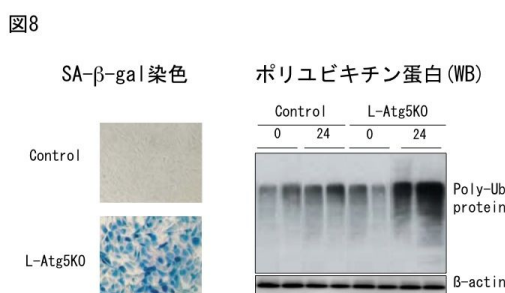
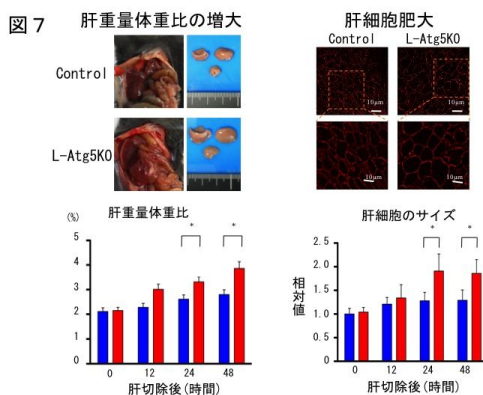
(5) Cyclin D 濃度の低下、p21 蛋白の活性化 (図5)を伴う細胞周期 G2/S 期にある細胞の減少を認めた(図6)。



(6) オートファジーの抑制にて肝細胞肥大を伴う肝重量の増加(図7)、ポリユビキチン蛋白の蓄積を伴う SA-β-gal 染色陽性の肝細胞を認めた(図8)。これらは、Atg5 の KO により肝細胞が細胞老化の状態にあることを示唆していると考えられた。

(7) エネルギー維持の系に関しては、オートファジーの抑制により、肝組織内 ATP 濃度の低下、ミトコンドリア障害による酸化の低下を認めた(図9)。

以上の結果から、オートファジーは肝切除後の肝再生において、エネルギー産生、蛋白質



再編成、細胞老化への防御機構として重要な過程であ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9件)

① Yoshizumi T, Ikegami T, Bekki Y, Ninomiya M, Uchiyama H, Iguchi T, Yamashita Y, Kawanaka H, Shirabe K, Maehara Y. Re-evaluation of predictive score for 6-month graft survival in living donor liver transplantation in modern era. Liver Transpl. 2013 Nov 29. [Epub ahead of print]

doi: 10.1002/lt.23804.

② Yoshizumi T, Ikegami T, Toshima T, Harimoto

N. Uchiyama H, Soejima Y, Yamashita Y, Shirabe K, Maehara Y. Two-step selection criteria for living donor liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma. *Transplant Proc*, 2013; 45: 3310-3.

doi: 10.1016/j.transproceed.2013.05.001.

©Yoshizumi T, Shirabe K, Nakagawara H, Ikegami T, Harimoto N, Toshima T, Yamashita Y, Ikeda T, Soejima Y, Maehara Y. Skeletal muscle area correlates with body surface area in healthy adults. *Hepatology Res*. 2014; 44: 313-8.

doi: 10.1111/hepr.12119.

©Yoshizumi T, Ikegami T, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Muto J, Ikeda T, Soejima Y, Shirabe K, Maehara Y. Impact of tumor size, number of tumors and neutrophil-to-lymphocyte ratio in liver transplantation for recurrent hepatocellular carcinoma. *Hepatology Res*. 2013 Jul; 43(7): 709-16.

doi: 10.1111/hepr.12016.

©Yoshizumi T, Shirabe K, Ikegami T, Yamashita N, Mano Y, Yoshiya S, Matono R, Harimoto N, Uchiyama H, Toshima T, Maehara Y. Decreased immunoglobulin G levels after living donor liver transplantation is a risk factor for bacterial infection and sepsis. *Transpl Infect Dis*. 2014 Apr;16(2):225-31.

doi: 10.1111/tid.12188.

©Yoshizumi T, Shirabe K, Ikegami T, Kayashima H, Yamashita N, Morita K, Masuda T, Hashimoto N, Taketomi A, Soejima Y, Maehara Y. Impact of human T-cell leukemia virus type 1 in living donor liver transplantation *Am J Transplant*. 2012 Jun;12(6):1479-85.

doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04037.x.

©Yoshizumi T, Shirabe K, Taketomi A, Uchiyama H, Harada N, Ijichi H, Yoshimatsu M, Ikegami T, Soejima Y, Maehara Y. Risk factors that increase Mortality after living donor liver transplantation. *Transplantation*, 93: 93-8, 2012. doi: 10.1097/TP.0b013e318238dacd.

©Toshima T, Shirabe K, Matsumoto Y, Yoshiya S, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Maehara Y. Autophagy enhances hepatocellular carcinoma progression by activation of mitochondrial β -oxidation. *J Gastroenterol*. 2014 May;49(5):907-16.

doi: 10.1007/s00535-013-0835-9.

©Toshima T, Shirabe K, Fukuhara T, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Okano S, Maehara Y. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. *Hepatology*. 2014 Mar 25. [Epub ahead of print]

doi: 10.1002/hep.27140.

〔学会発表〕(計5件)

肝再生におけるオートファジーの生物学的意義 戸島 剛男, 調 憲, 吉屋 匠平, 武藤 純, 的野 る美, 間野 洋平, 池上 徹, 吉住 朋晴, 前原 喜彦 日本消化器外科学会総会 67 回

肝再生の機序解明と臨床への応用 肝再生におけるオートファジーの生物学的意義 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 日本外科学会総会 114 回

肝分化/再生/幹細胞 肝再生におけるオートファジーの生物学的意義 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 肝臓学会総会 49 回

侵襲に対する生体反応とその制御 肝再生におけるオートファジーの意義 戸島 剛男, 調 憲, 武富 紹信, 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 日本外科学会総会 113 回

肝細胞癌進展におけるオートファジーの意義 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 日本癌治療学会総
会 51 回

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉住朋晴 (YOSHIZUMI, Tomoharu)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号 : 80363373

(2) 研究分担者

調 憲 (SHIRABE, Ken)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号 : 70264025

池上 徹 (IKEGAMI, Toru)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号 : 80432938

山下洋市 (YAMASHITA, Yo-ichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号 : 00404070

播本憲史 (HARIMOTO, Norifumi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号 : 00419582

内山秀昭 (UCHIYAMA, Hideaki)

九州大学・医学研究院・その他

研究者番号 : 70380425

副島雄二 (SOEJIMA, Yuji)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号 : 30325526

二宮瑞樹 (NINOMIYA, Mizuki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号 : 30546461

武富紹信 (TAKETOMI, Akinobu)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号 : 70363364

前原喜彦 (MAEHARA, Yoshihiko)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号 : 80165662