

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590984

研究課題名(和文)肝再生促進メカニズムに関与する細胞周期関連分子の基礎的検討およびその臨床応用

研究課題名(英文)Basic study of the cell cycle related molecules affiliated with liver regeneration and clinical application

研究代表者

永濱 裕康(Nagahama, Hiroyasu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：60381000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期関連分子であるp27Kip1は肝に強い発現を認め、そのノックアウト(KO)マウスでは、肝を含めた各臓器の肥大化を起こす。この結果を肝再生医療に用いるため、肝癌細胞株、ならびにp27Kip1のKOマウス肝臓に対しコラゲナーゼ処理を行い得られた初代培養肝細胞を用い、細胞増殖に影響を与えた促進分子ならびに抑制分子を検討した。その結果、エストロゲン関連因子などが抽出されたが期間内に責任分子の特定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：p27kip1 is a key molecule of the cell cycle regulation in hepatocyte. The depression of p27kip1 cause liver hypertrophy. Therefore, we consider the elucidation of the regulatory mechanism of Kip1 lead to regenerative medicine for the severe liver disease. We examine how the molecule effects on the cell proliferation by using primary hepatocyte delivered from p27Kip1 KO mouse and hepatic cell line. As a results, the responsible molecule was not isolated with in the specified period, though we extract the some candidates, such as the related molecule of estrogen.

研究分野：肝再生、細胞周期、消化器病学

キーワード：肝再生 トランスクリプトム 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

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> は肝に強い発現を認め、そのノックアウト(KO)マウスでは、発生過程で肝を含めた各臓器の肥大化を起こすことを報告してきた( Cell 1996、Anat. Embryo 2001、Dev. Cell 2004、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009)。このメカニズムとして 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 期に停止させること、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、G1 期への再進入が可能となることを報告した (Nat. Cell Biol. 2004、Mol. Cell. Biol. 2007)。さらに p27<sup>Kip1</sup> を分解する Skp2 は Akt によってリン酸化され、細胞質へ局在するようになることを報告した (Nat. Cell Biol. 2009)。

上記の研究成果を背景に、これら細胞周期関連分子の機能制御に着目し肝再生治療への可能性を検討した(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)。その中で、DNA マイクロアレイを用いて、肝組織内での肝障害刺激の前後の遺伝子発現変化を野生型と p27<sup>Kip1</sup> KO マウスとで比較し、早期より発現の上昇が認められた p27<sup>Kip1</sup> 分解系シグナルを含む細胞周期関連分子を制御することにより 肝細胞増殖が促進する可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

強い再生能力を持つ肝臓ではあるが、高度に進行した慢性肝不全ならびに急性肝不全では、もはや再生能力が低下し致命的となる。中でも劇症肝炎は、急激かつ広汎におこる肝細胞壊死に基づく高度の肝機能不全を起こす極めて予後不良な疾患である。そ

の治療としての生体肝移植ならびに脳死肝移植は、その条件や侵襲の面から制約を受け、全例には施行できていないのが現状である。そのため、侵襲の少ない肝再生治療を開発する事が今後の課題となり、本研究は 肝細胞増殖を如何に効率よく、安全に行なえる様になるかを 解明するために、細胞周期制御機構に着目する。具体的には遺伝子の発現調節を行なう事により細胞周期を制御することで、肝細胞増殖促進につながるようなメカニズムを解明し、合わせてその臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

・肝癌細胞株、ならびに p27<sup>Kip1</sup> の KO マウス肝臓に対しコラゲナーゼ処理を行い得られた初代培養肝細胞を用い、E2 の投与下において、その増殖速度の変化と発現分子の変化を野生型と比較検討することにより、最も細胞増殖に影響を与えた促進分子ならびに抑制分子を特定し、それらの分子の発現を効率的に調整する方法を樹立することを目標として研究を行った。

・G0 期で停止させた培養細胞において、miR221,222 の siRNA で p21<sup>Kip1</sup> の発現を上昇させる、あるいは E2 投与や p21<sup>Kip1</sup> に対する siRNA を用いて p27<sup>Kip1</sup> を低下させることにより、その発現制御による肝再生促進を目指した臨床応用への可能性を探る。

・マウス胎生期肝において最も p27<sup>Kip1</sup> が発現している胎生 13.5 日の胎児肝細胞、および CC14 を用いた肝障害前後のモデルマウスの肝組織より mRNA を抽出し、cDNA array にてトランスクリプトーム解析を行い、細胞周期関連分子発現の違いの有無を比較検討することより肝再生につながる責任分子の同定を試みた。

### 4. 研究成果

・E2 投与群とコントロール群での初代培

養肝細胞の増殖速度の比較では、有意差は得られなかった。また、p27Kip1 の KO マウスより調整した初代培養肝細胞は、細胞の状態が不安定で比較検討するまで至らなかった。

・上記の代替として肝癌細胞株に siRNA を用いて p27Kip1 を低下させ、E2 刺激の有無での比較検討を行い得られた結果を初代培養細胞の系に還元することを試みたが、これも同様に細胞が不安定であり明確な結果は得られなかった。

・マウス胎生期肝における胎生 13.5 日の胎児肝細胞より抽出した mRNA を用いたトランスクリプトーム解析では、多数の遺伝子発現パターンが異なっており、実際に複数個の候補遺伝子を選出し解析を行い肝再生への道筋をつける一歩となると考えられたが、期間内に責任遺伝子に到達することができなかった。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 6 件)

Chiyoda T, Sugiyama N, Shimizu T, Naoe H, Kobayashi Y, Ishizawa J, Arima Y, Tsuda H, Ito M, Kaibuchi K, Aoki D, Ishihara Y, Saya H, Kuninaka S. LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. *J Cell Biol* 28; 197, 625-641, 2012

Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y, and Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human Tumor necrosis factor / Lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 32: 1529-1541, 2012

Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, Watanabe T, Saitoh N, Nakamoto M, Chandra T, Narita M, Shinohara M and Nakao M. Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. *Aging Cell* 11: 553-556, 2012

Naoe H, Chiyoda T, Ishizawa J, Masuda K,

Saya H, Kuninaka S.

The APC/C activator Cdh1 regulates the G2/M transition during differentiation of placental trophoblast stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430:757-762, 2013

Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 1: 126, 5391-5399, 2013

Nagumo K, Tanaka M, Chuang V, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, Otagiri M, Maruyama T.

Cys34-cysteinylation of human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLOS ONE* 9: e85216, 2014

[図書](計 1 件)

1. 渡邊丈久, 佐々木裕. NF- B シグナル研究のこれまでの変遷. 特集 / 肝胆膵領域における NF- B 研究の最前線. 肝胆膵 68, 495-503, 2014.

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 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・非常勤診療医師  
研究者番号: 60381000

(2)研究分担者

佐々木 裕 (SASAKI, Yutaka)  
熊本大学・生命科学研究部・教授  
研究者番号：70235282

田中 基彦 (TANAKA, Motohiko)  
熊本大学・生命科学研究部・准教授  
研究者番号：20346985

直江 秀昭 (NAOE, Hideaki)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30599246

渡邊 丈久 (WATANABE, Takehisa)  
熊本大学・生命科学研究部・助教  
研究者番号：20634843

(3)連携研究者

( )

研究者番号：