

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592000

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達とNon-coding RNAによる肝再生制御機構の解明

研究課題名(英文)Evaluation of the mechanism of liver regeneration focused on intracellular signal transduction and Non-coding RNA expression

研究代表者

丸橋 繁 (Marubashi, Shigeru)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20362725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生制御機構を明らかにするため、IL-6シグナル伝達系の遮断にはマウスIL-6受容体抗体(MR16-1)を投与する方法を採用した。MR16-1を腹腔内投与群、非投与群(対照群)に分け70%肝切除を行い、術後に肝/血液サンプルを採取した。

肝再生は肝切除後24時間において有意にMR16-1投与群で抑制されていた(P=0.035)。PCNA/Ki Indexは、MR16-1投与群で抑制されている傾向にあった。血中および肝組織中のIL-6、TNF、HGF濃度は両群において差を認めなかった。今後はこれらの研究で得られた結果を発展させ、肝再生機構の細胞内メカニズムを解明できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism of liver regeneration, we used anti-mouse IL-6 antibody (MR16-1) in order to block the signal transduction of IL-6. We performed traditional 70% hepatectomy model with or without MR16-1, and obtained regenerated liver and blood samples after certain postoperative period.

Remnant livers were more regenerated in terms of liver weight in MR16-1 group than control at 24 hours after hepatectomy (P=0.035). PCNA/Ki Index was suppressed in MR16-1 group than control group. IL-6, TNF $\alpha$ , HGF, and apoptosis index were similar between the two groups.

The results of this study can be developed further in the next stage of research of analyzing intracellular signal transduction for liver regeneration.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝再生 抗IL-6受容体抗体 c-Met

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肝切除後に肝再生が起こることは古くから知られているが、そのメカニズムは依然として不明な点が多い。現在肝再生は複数のシグナル経路からの情報が、オーケストラの様につながり合い形成されていると考えられている。なかでも肝再生のトリガーとして、IL6 によるシグナル伝達が重要であることが近年着目されているが、一方で HGF/c-MET 系によるシグナルも必須のものと考えられている。しかしながら肝再生のメカニズムを解明するために必要なこの 2 系統がどのように相互作用しているか、に関する研究はこれまでにない。

HGF の肝再生作用に関しては、当教室での研究で報告した(文献1)通り、肝切除後の門脈血流および門脈圧の増加により活性化された Urokinase receptor が肝細胞マトリックスに存在する HGF 重合体を splicing することにより活性化され、さらに肝細胞において c-met シグナル伝達が活性化され肝再生のトリガーとなる。同じ動物モデルを用いて、c-met のコンディショナルノックアウトを行った場合にどうなるか、非常に興味深い。また同時に IL6 系の動きを調べることで、すなわち、HGF/c-met 系と IL6 系を 2 次元的にとらえることにより、両者の相互作用を明らかにすることが可能となる。

(2) さらに本研究のもう一つの着目点である Non-coding RNA は、肝再生機構の調節因子としてごく最近非常に注目されている。近年の cDNA プロジェクトの成果により、哺乳類のゲノム中に膨大な数の Non-coding RNA が存在することが明らかになってきたが、タンパク質をコードしている mRNA は RNA 全体のわずかに数パーセントにしかすぎず、大部分はタンパク質をコードしない Non-coding RNA であり、細胞内で独自の機能を担っていると考えられている。この Non-coding のうち、その機能がわかりつつある約 22 塩基ほどからなるマイクロ RNA (Hepatology 2011;54:609-619) やさらに塩基数の多い large intergenic RNA (LINC-RNA)、small nucleolar RNA(snoRNA)の遺伝子制御が肝再生に及ぼす影響が非常に重要と考えられる。また、細胞中の Non-coding RNA を含む細胞内物質は、細胞外に exosome としてあるいは ago2 蛋白とともに排出され、安定して循環血液を經由し他の細胞へ取り込まれることが分かってきた(文献2、3)。

(3) 本研究は、肝再生の肝細胞内でのシグナル伝達と Non-coding RNA の作用機序を解明することが第一の目的であるが、末梢血中に移動してくる Non-coding RNA を解析することにより、非侵襲的な病態診断が可能となると予想される。さらに、RNA を細胞内に導入することにより肝再生の

modulation を行うことが可能かどうかを調べるといった肝再生の制御を目的とした臨床応用を念頭に本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

(1) 肝再生における、肝細胞内シグナル伝達系の解析肝切除後の肝再生のメカニズムを、in vitro と in vivo、また肝切除モデルと門脈肝静脈シャント( PHS )モデルを用いて、IL-6 系および HGF/c-met 系の両方の相互作用に着目して解析する。このために、Cre-alb/loxP システムを応用することにより、肝でのみ発現を抑えるコンディショナルノックアウトマウスを用い、肝再生にもっとも重要と考えられる、IL-6 系および HGF/c-met 系に対し、シングルノックアウト(SKO)およびダブルノックアウト(DKO)を作成する。IL-6 系の下流にある STAT3、Pdk1 や Akt、HGF/c-met 系では c-Met の下流シグナルである GAB1 のリン酸化、さらにはこれらの下流にある、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)、PLC- などの活性化をしらべる。また、網羅的遺伝子発現解析法を用い mRNA とマイクロ RNA の発現解析さらにネットワーク解析を行うことで、遺伝子発現レベルでのメカニズムの解明をめざす。

(2) 肝再生による Non-coding RNA の作用機序の解析作成したコンディショナルノックアウトマウス(SKO、DKO)に対し、肝切除モデルを施し、その後の肝再生におけるマイクロ RNA (miRNA)、LINC-RNA、snoRNA の発現プロファイルを検討する。また、肝再生に関連する mi-RNA および LINC-RNA と、肝再生のシグナル伝達系路の活性化との関連を検討する。さらに、肝再生促進あるいは抑制する miRNA、LINC-RNA および snoRNA を同定し、細胞内発現量を knock-in、knock-down をすることにより、肝再生の制御を試みる。

(3) Exosome を用いた、末梢血中 Non-coding RNA の解析と肝再生との関連の検討末梢血から効率的に exosome を抽出し、この中に含まれる RNA を抽出し、前項で同定した肝再生と関連して発現上昇する Non-coding RNA のリストと比較する。末梢血中でも肝組織と同様に発現上昇する Non-coding RNA が同定できれば、非侵襲的な肝再生のマーカーとなる。

## 3. 研究の方法

(1)コンディショナルノックアウトマウス(DKO)の作成:Cre-loxP システムを用いて、ともに Exon16 に存在する c-met、gp130 遺伝子のコンディショナルノックアウトを作成する予定であったが、gp130 に関しては、遺伝子レベルのブロックではなく、HGF においては c-met を選択的に阻害する分子標的薬

である Crizotinib、IL-6 系に関しては IL-6 受容体抗体である MR16-1 (文献 4) を使用することとした。

(2) マウス 70% 肝切除モデルの確立: 70% 肝切除モデル (コントロール) とこれに portohepatic シヤントを加えた PHS モデルを作成する。

(3) 肝切除モデルを用いた肝再生機序の解明: 正常マウス、KO マウスに肝切除を行い、肝再生の評価を含めた網羅的遺伝子発現解析を行い、シグナル伝達経路の活性化の loss-of-function study を行う。また、同時に採取した肝組織中の Non-coding RNA の発現プロファイルを網羅的解析法を用いて検討する。

(4) 末梢血中 Non-coding RNA 解析: 末梢血中 Exosome 抽出法の確立と Exosome 中の Non-coding RNA の網羅的解析を行う。

#### 4. 研究成果

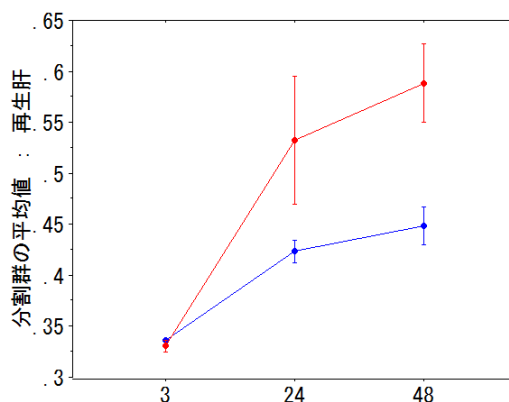
肝再生は現在複数のシグナル伝達経路が関与することが知られており、中でも Interleukin-6 (IL6) および Hepatocyte Growth Factor (HGF)/c-MET 系を中心に制御されていることが報告されている。しかし、その相互作用や詳しいシグナル経路についてはあまり研究が進んでいない。本研究ではこれらのシグナル経路伝達を遮断することで、どのような影響が表れるかを解明し、肝再生制御機構を明らかにしようと考えた。

当初 IL-6 受容体である gp130、HGF の受容体である c-MET のコンディショナルノックアウトマウスを作成し研究を行う予定であったが、IL-6 シグナルの遮断には、マウス IL-6 受容体に対する特異的抗体である MR16-1 (文献 4) を投与する方法を採用した。一方、c-Met/HGF 伝達経路に関しては、c-Met flox/flox マウスを入手し、c-Met コンディショナルノックアウトマウスを作成する準備を行った。

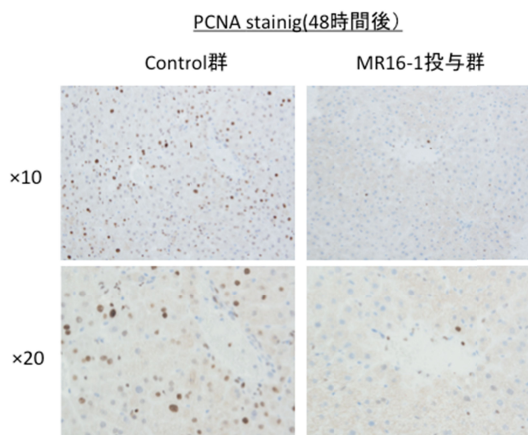
マウス (B6C3F1、6 週齢) を用いて、70% 肝切除を行い、MR16-1 を腹腔内に投与し、術後 12、24、48、72 時間後に、肝および血液サンプルを採取した。同様に MR16-1 非投与群についても 70% 肝切除後の残肝、血液を採取した。残肝重量は、肝切除後 24 時間において、MR16-1 非投与群で  $0.532 \pm 0.088\text{g}$ 、投与群で  $0.449 \pm 0.037\text{g}$  と MR16-1 投与群で有意に肝再生が抑制されていた ( $P=0.035$ )。また、肝切除後 48 時間でも MR16-1 投与群で肝再生が抑制される傾向が明らかであった ( $P=0.059$ ) (図 1、赤: コントロール群、青: MR16-1 投与群)。

また TUNEL 染色では両群で差はなかったものの、PCNA/Ki index では、MR16-1 投与群で抑制されている傾向がみられた (図 2)。

(図 1)



(図 2)



血中および肝組織中の IL-6、TNF、HGF 濃度は両群において差は認められなかった。

MR16-1 の投与により肝再生を抑制することが可能であった。この結果は IL-6 のシグナルを抑制することにより可能となったと考えられる。HGF の組織内濃度が両群で差がなかったことから HGF シグナル経路の極端な活性化との関連性はないものと考えられた。本研究では、IL-6 伝達系および HGF と肝再生に関する成果が得られた。更に、c-Met コンディショナルノックアウトマウスによる HGF シグナルの抑制による肝再生の評価とこれらの相互作用を行う予定であったが、研究期間内に definitive な結論に到達し得なかった。今後は本研究で得られた結果を発展させ、さらに複数のシグナル伝達系の中の相互作用を明らかにし、肝再生機構の細胞内メカニズムを解明することが期待される。

#### <引用文献>

Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. Marubashi S, Sakon M, Nagano H, Gotoh K, Hashimoto K, Kubota M, Kobayashi S,

Yamamoto S, Miyamoto A, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Monden M.  
Surgery. 2004 Nov;136(5):1028-37.

Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO.

Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9

Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors.

Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M.

Biochem Pharmacol. 2011 May

15;81(10):1171-82

Characterization of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody.

Okazaki M1, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M.

Immunol Lett. 2002 Dec 3;84(3):231-40.

## 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 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

丸橋 繁 (MARUABASHI, Shigeru)

大阪大学・大学院医学研究科 講師

研究者番号：20362725

### (2)研究分担者

和田 浩志 (WADA, Hiroshi)

大阪大学・大学院医学研究科 助教

研究者番号：00572554

永野 浩昭 (NAGANO, Hiroaki)

山口大学大学院医学系研究科 教授

研究者番号：10294050

川本 弘一 (KAWAMOTO, Koichi)

大阪大学・大学院医学研究科 特任助教

(常勤)

研究者番号：30432470

小林 省吾 (KOBAYASHI, Shogo)

地方独立行政法人大阪府立成人病センタ

—

研究者番号：30452436

江口 英利 (EGUCHI, Hidetoshi)

大阪大学・大学院医学研究科 講師

研究者番号：90542118

### (3)研究協力者

井上 正宏 (INOUE, Masahiro)

大阪府立成人病センター 研究所

貫戸 紀子 (KANTO, Noriko)

大阪府立成人病センター 研究所