

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791434

研究課題名(和文) TGF- β 活性化機構に着目した肝再生の分子機序解明と肝再生促進の新規治療法開発研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for liver regeneration focusing on local TGF- β activation mechanism

研究代表者

林 洋光 (HYASHI, Hiromitsu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80625773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：TSP1によるTGF- β 活性化を阻害するペプチド投与による肝再生促進療法の可能性についてin vivoで検討。阻害ペプチド投与により術後6HでTGF- β -Smadシグナルの抑制が得られ、再生肝への効果として術後24Hにおける肝細胞へのBrdU取込が増加、術後48Hで肝/体重比増加が、術後7日目での体重回復が促進された。副作用について血液生化学検査及びH.E.を用いた組織学的検索を行ったが明確なものはなく、肝切除後再生肝では術後早期にTSP1が発現し強力な肝再生抑制因子であるTGF- β シグナルの活性化を介し、術後肝再生を負に制御しており、阻害ペプチド投与による肝再生促進効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We performed 70% hepatectomy in mice receiving normal saline, LSKL peptide, and sham operation. LSKL peptide was administered intraperitoneally at abdominal closure and 6 h after hepatectomy. Perioperative plasma TSP-1 levels were measured by ELISA system in patients with hepatectomy. LSKL peptide administration attenuated Smad2 phosphorylation at 6h. S-phase entry of hepatocytes was accelerated at 24 and 48h by LSKL peptide administration, and which resulted in faster recovery of the residual liver and body weight. H&E staining and blood biochemical examinations revealed no significant adverse effects occurred following the two LSKL peptide administrations. LSKL peptide during the early period after hepatectomy can promote liver regeneration. The transient inhibition of TSP-1/TGF- β signal activation using LSKL peptide in the early period after hepatectomy may thus be a promising strategy to promote liver regeneration following hepatectomy.

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：TGF- β トロンボスポンディン 肝再生

1. 研究開始当初の背景

肝切除術は肝がんに対する最も有効な治療療法である。その一方で致死の合併症となり得る肝再生不良(肝不全)を引き起こす可能性も併せ持つ。現在、有効な肝再生促進法は確立しておらず、さらなる肝再生機構の解明ひいては新規治療戦略の構築が必要である。Transforming growth factor (TGF)-

は上皮細胞や血管内皮細胞に対する増殖抑制作用や免疫抑制作用を有し、発癌抑制や血管新生、免疫系のコントロールなどに関与する多機能性増殖因子であるが、肝再生の分子機序解明を目的とする本研究に関して

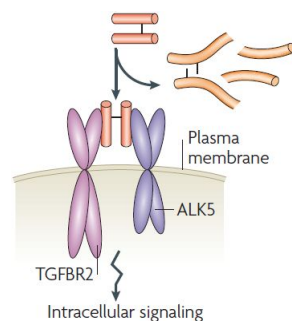
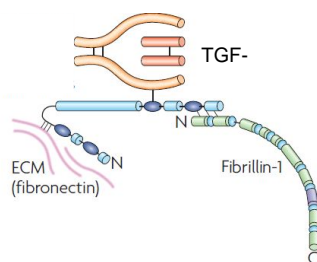
(1) in vitro で強力な肝細胞増殖抑制効果を示す

(2) TGF- は生体内で不活化型として合成され細胞外マトリックスに貯蔵される(図1)

(3) 局所の TGF- シグナルは不活化型を活性化型へ変換する活性化機構によりコントロールされる(活性化型 TGF- は TGF- 受容体と結合しシグナルを伝達する)(図1)

といった特徴が挙げられる。しかし、in vivo である再生肝において TGF- シグナルがどのように機能するかは未だ不明な点が多く、再生肝における TGF- 活性化機構に関しては全くの不明である。

図1 (Nature reviews molecular cell biology, 2007 より)



TGF- は細胞内で不活化型として合成され

た後、細胞外マトリックス (ECM) に蓄積し activation mechanism により TGF- 受容体への binding が可能となり、細胞内へシグナルを伝達する。

2. 研究の目的

本研究提案の最終目的は、ターゲット遺伝子として TGF- 活性化能を有する thrombospondin (TSP)-1 に注目して、in vivo 肝切除モデルおよびヒト臨床検体を用いて肝再生のメカニズムを分子生物学的に紐解くことにより、新しい肝再生治療法の基礎を築くことである。

3. 研究の方法

(1) 肝再生研究の標準モデルである 70%肝切除モデルを用いて、TSP-1 を介した TGF- 活性化阻害 peptide の腹腔内投与による肝再生促進効果に関して野生型マウスと比較検討し、peptide の有用性を検討した。

(2) ヒト肝切除術後における TSP-1 の動態把握および再生不良のバイオマーカーとしての有用性の検索：ヒト肝切除後における TSP-1 の動態に関してはこれまで不明であり、術後早期の TSP-1 発現を示したマウスでの実験結果およびヒト臨床サンプルおよびデータと照らし合わせながら、臨床応用の可能性を探るべく TSP-1 の動態を明らかにする。併せて、血漿中 TSP-1 の動態と術後肝機能の推移と統計学的手法を用いて検討した。

4. 研究成果

阻害ペプチド投与により術後 6 時間での TGF- -Smad signal の抑制が得られた。再生肝に対する効果としては、術後 24 時間における肝細胞への BrdU 取り込みが増加し、術後 48 時間での肝/体重比増加が促進された。

さらには術後 7 日目での体重回復が促進された。ペプチド投与による副作用について、血液性化学検査および H.E. を用いた組織学的検索を行ったが明らかなものはなかった。肝切除後再生肝では術後早期に TSP1 が発現し、強力な肝再生抑制因子である TGF- シグナルの活性化を介して術後肝再生を負に

制御しており、阻害 peptide の投与によって肝再生促進効果が得られる可能性があり、臨床応用を目指す。

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5件)

Okabe H, Beppu T, Nakagawa S, Yoshida M, Hayashi H, Masuda T, Imai K, Mima K, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Yamashita Y, Baba H. Percentage of future liver remnant volume before portal vein embolization influences the degree of liver regeneration after hepatectomy. *J Gastrointest Surg.* 2013 Aug;17(8):1447-51. 査読有
DOI: 10.1007/s11605-013-2237-y.

Hayashi H, Sakai K, Baba H, Sakai T. Thrombospondin-1 is a novel negative regulator of liver regeneration after partial hepatectomy through transforming growth factor-beta1 activation in mice. *Hepatology.* 2012 May;55(5):1562-73. 査読有
DOI: 10.1002/hep.24800.

Mima K, Okabe H, Ishimoto T, Hayashi H, Nakagawa S, Kuroki H, Watanabe M, Beppu T, Tamada M, Nagano O, Saya H, Baba H. CD44s regulates the TGF- β -mediated mesenchymal phenotype and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2012 Jul 1;72(13):3414-23. 査読有
DOI: 10.1158/0008-5472.

Hayashi H, Sakai T. Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases. *Front Physiol.* 2012 Feb 6;3:12. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2012.00012.

Otao R, Beppu T, Ishiko T, Mima K, Okabe H, Hayashi H, Masuda T, Chikamoto A, Takamori H, Baba H. External biliary drainage and liver regeneration after

major hepatectomy. *British Journal of Surgery.* 2012 99(11):1569-74 査読有
DOI: 10.1002/bjs.8906.

[学会発表](計7件)

林 洋光、「肝再生抑制因子トロンボスポンディン1に対する阻害ペプチドを用いた肝再生促進療法」第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29日、ホテルニューオータニ(東京都)

東 孝暁、林 洋光、黒木 秀幸、中川 茂樹、坂本 慶太、横山 奈穂美、新田 英利、近本 亮、別府 透、馬場 秀夫、「Integrin beta6 は TGF- β による上皮間葉転換を促進し肝内胆管癌の進展に關与する」、第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館

黒木 秀幸、林 洋光、中川 茂樹、東 孝暁、橋本 大輔、阿部 真也、新田 英利、近本 亮、石河 隆敏、別府 透、馬場 秀夫、「TSP-1 を介した TGF- β 活性化による肝再生抑制機構をターゲットとした新規肝再生促進療法の開発」第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、国立京都国際会館

Kuroki H, Hayashi H, Nakagawa S, Sakamoto K, Higashi T, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H. 「LSKL peptide inhibits thrombospondin-1-mediated TGF- β signal activation and accelerates liver regeneration after hepatectomy in mice.」AACR Annual Meeting 2014、2014年4月7日、San Diego, California, USA.

林 洋光、黒木 秀幸、美馬 浩介、中川 茂樹、新田 英利、今井 克憲、蔵元 一崇、近本 亮、別府 透、馬場 秀夫、「TGF- β 活性化による肝再生抑制機構の解明と活性化阻害 peptide を用いた肝再生促進療法開発」第25回日本肝胆膵外科学会学術集会、2013年6月12日、ホテル東日本宇都宮(栃木県)

林 洋光、黒木 秀幸、美馬 浩介、中川 茂樹、新田 英利、今井 克憲、蔵元 一崇、近本 亮、別府 透、酒井 尚雄、馬場 秀夫、「TGF 活性化機構による肝再生抑制機構の解明

と新戦略の構築」第 113 回日本外科学会学術集会、2013 年 4 月 11 日、マリンメッセ福岡

林 洋光、「肝再生抑制機構の解明と新規標的トロンボスポンディン 1 の同定」第 112 回日本外科学会学術集会、2012 年 4 月 12 日～2012 年 4 月 14 日、幕張メッセ国際会議場（千葉県）

〔図書〕(計 0 件)

〔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：

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

林 洋光 (HAYASHI, Hiromitsu)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80625773

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：