

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462091

研究課題名(和文) Epigeneticsに着眼した加齢肝機能不全の解明と制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of aged liver regenerative disorder focused of epigenetic changes

研究代表者

森根 裕二 (MORINE, Yuji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：60398021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢肝切除後肝再生低下機序と、その制御法についてエピジェネティック変化に焦点をあて検討した。加齢肝では肝再生増殖因子とともに細胞増殖因子の低下を認め、p16やSMP30などのアポトーシス関連因子の以上によるアポトーシス誘導、オートファジーの増強が確認された。またHDAC阻害(Epigenetic制御)は残肝における肝細胞増殖因子の発現増強とともに、幹細胞などからの分化能も増強していることが示唆され、結果として、肝傷害も軽減している可能性がある。これらのことから肝切除(加齢肝)におけるEpigenetic制御の可能性が証明された。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of the decreased regenerative capacity of aged liver after hepatectomy and its regulation focused on epigenetic changes were elucidated in this study. In aged liver, the down-regulated of cell cycle and up-regulated of apoptosis-related genes during liver regeneration after hepatectomy were demonstrated. Also the epigenetic regulation with HDAC inhibitor up-regulated cell cycle related genes and differentiation related genes, after hepatectomy resulted in increase of liver regeneration and decrease of liver injury.

研究分野：消化器外科

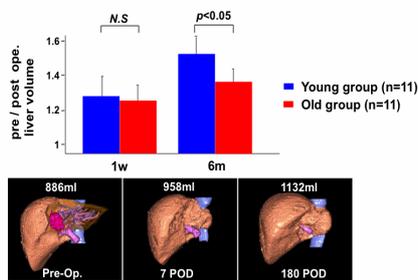
キーワード：Epigenetics HDAC 肝再生 加齢 肝切除

1. 研究開始当初の背景

肝再生には多くの制御因子が関与し、我々は activin (TGF-β supergene family) の肝細胞増殖抑制効果や、その結合蛋白で肝細胞増殖因子である follistatin の肝再生制御に対する研究、器官デザイン形成に必須なソニック・ヘッジホッグ (SHH) の肝再生作用機序について研究した (H20~21 若手研究 B)。さらに絶対的再生肝細胞不足の克服に、新たな細胞資源の脂肪由来幹細胞: adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (ADSC) を用いた細胞移植治療の研究 (H22~23 基盤研究 C) を継続している。

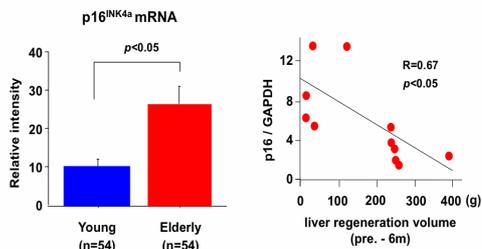
近年の高齢化社会の進展により、背景肝の加齢による機能低下が肝臓外科領域で問題となっており、加齢肝切除では、残肝機能制限による治癒切除率の低下・合併症率の増加が見込まれ、癌治療の面からも加齢肝に対する対策が必要である。我々も、加齢肝切除が若年と比較して術後肝再生が遅延することや、細胞増殖を抑制因子し、加齢マーカーである p16 が高齢者で有意に高く、肝再生とも逆相関することを報告している。

Senescence-related genes may be responsible for poor liver regeneration after hepatectomy in elderly patients.



Liver regeneration was impaired in aged patients. (Zhu C, Morine Y, Shimada M. et al. J Gastroenterol Hepatol. 2013)

Senescence-related genes may be responsible for poor liver regeneration after hepatectomy in elderly patients.



p16 expression in the elderly was higher and correlated with liver regeneration. (Zhu C, Morine Y, Shimada M. et al. J Gastroenterol Hepatol. 2013)

また加齢肝の肝予備能・再生能低下には、酸化ストレス増強による肝虚血再灌流障害の増悪が寄与し、1) 加齢指標蛋白質 30 (SMP30) の低下 Vit.C 欠乏による活性酸素種 (ROS) 増加、2) SMP30 の低下 高脂血症 (脂質代謝異常) に起因する NAFLD/NASH 形成、3) ROS 増加 小胞体ストレスを惹起し脂肪肝を誘発、4) NAFLD/NASH による酸化ストレスの増加 テロメア短縮による細胞老化、5) p66<sup>STC</sup> 増加による酸化ストレス・血管

内皮細胞障害の増強、などがある。

また一方で、加齢に伴う後天的なゲノムワイド・領域特異的なエピジェネティック変化 (メチル化・アセチル化) が各種臓器において注目されており、肝臓では加齢によるヒストン修飾が示され、アセチル化に関してはラット中齢期から高齢期にかけての H3K9Ac 修飾の減少や、老齢マウス肝臓における HDAC1 (ヒストン脱アセチル化酵素) タンパクレベルの発現増加が報告されている。また H3K9 や H4K16 の脱アセチル化を行う SIRT1 発現も老齢マウスの肝臓では低下する。メチル化に関しては、H4K20me3 修飾がラットの肝臓では加齢に伴い増加することが報告されている。つまり加齢によるエピジェネティック変化は加齢肝再生能低下を惹起し、1) HDAC1 と肝細胞増殖に必要な c/EBPα とクロマチン再構築因子 brahma (Brm) の複合体形成がヒストン H3K9 アセチル化により低下することや、2) SIRT1 発現低下が HDAC1-EBPα-Brm 複合体形成を誘発するとなどがその誘因としてあげられている。加えて加齢肝の HDAC1 発現上昇が若年脂肪肝を誘発することも、再生能低下とともに前述の加齢脂肪肝成立の重要な一機序である可能性がある。

しかしながら加齢肝の肝切除後再生能低下に関するエピジェネティック変化の解明や、それらをターゲットとした治療法は依然未開発の領域である。

2. 研究の目的

加齢肝切除後肝再生低下と、その制御法についてエピジェネティック変化に焦点をあて検討する。

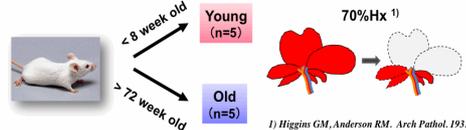
3. 研究の方法

(1) 加齢肝再生能低下機序

Balb/c マウス 4 週令を若年群、40 週令を加齢群とし、肝切除前後における遺伝子発現の変化を確認し、加齢肝再生低下機序について解析した。

Aged liver regeneration - 70% hepatectomy model -

Balb/c male mice  
Young (4 weeks, n=5), Old (>40 months, n=5)  
Collect liver by 24h, 48h and 72h.



Liver regeneration: remnant liver body weight ratio  
PCNA, Cyclin A2/D1 mRNA (RT-PCR)

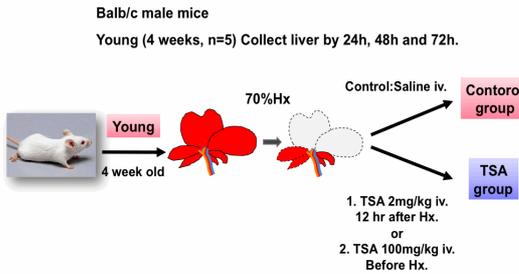
検討項目

肝傷害検査: AST, ALT, Total-bilirubin  
肝再生: 残肝体重量比、PCNA labeling index  
real time RT-PCR: HGF, Cyclin A2/D1, SMP30, p16, LC3, Caspase3

(2)肝切除におけるエピジェネティック制御の可能性

Balb/C 若年群に 70%肝切除を施行し、HDAC 阻害剤 (Trichostatin A: TSA) を肝切除術直前 2mg/kg、もしくは 100ng/kg 投与し、肝再生制御効果について解析した。

**Role of epigenetic regulation**  
- 70% hepatectomy model -



検討項目

Epigenetic 評価: HDAC 活性  
 肝再生: 残肝体重比、PCNA labeling index  
 肝傷害検査: AST, ALT, Total-bilirubin  
 real time RT-PCR: HDAC1, Cyclin A2/B1/D1/E1, AFP, Glutamine synthetase, HNF3b

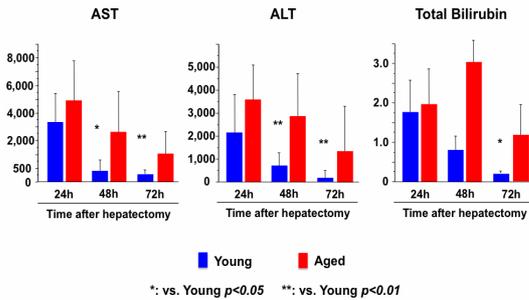
4. 研究成果

(1)加齢肝再生能低下機序

両群に 70%肝切除を施行したところ、若年群は全例生存したが、加齢群では術後 4 日目までに半数が死亡した。

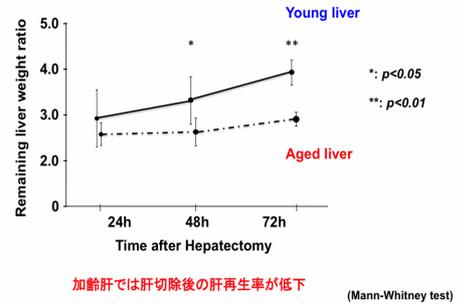
術後肝障害も AST・ALT・LDH・T-Bil が術後 48 時間以降、加齢群で有意に上昇していた。

**Aged liver regeneration**  
- 70% hepatectomy model -

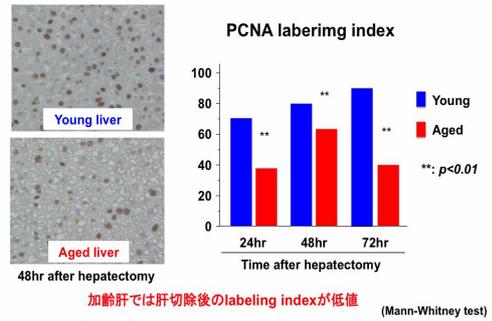


また肝切除術後 48 時間以降の残肝体重比が若年群で有意に高値で、肝切除術後 24 時間以降の PCNA labeling index も若年群で有意に高値であった。

**Aged liver regeneration**  
- 70% hepatectomy model -

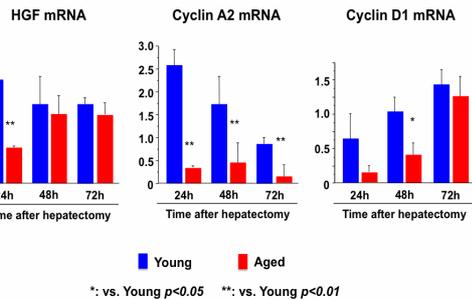


**Aged liver regeneration**  
- 70% hepatectomy model -



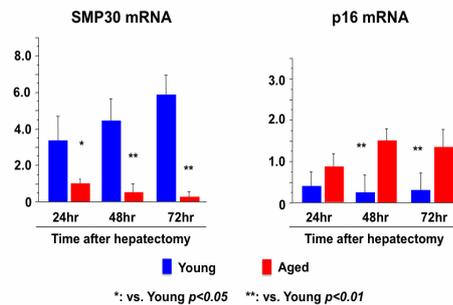
肝再生因子 (mRNA 発現) では術後 24 時間で HGF、術後 24 時間以降では CyclinA2、術後 48 時間で CyclinD1 が加齢群で有意に減少していた。

**Aged liver regeneration**  
- 70% hepatectomy model -



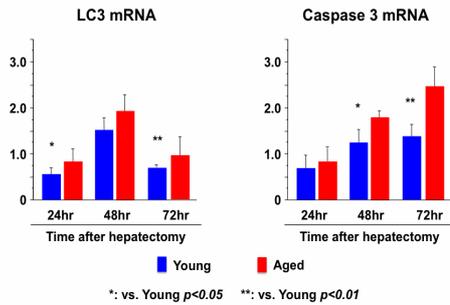
さらに肝切除術後 SMP30 mRNA の有意な低下、p16INK4a mRNA の有意な上昇は継続していた。

**Aged liver regeneration**  
- 70% hepatectomy model -



さらにオートファジーを反映する LC3 やアポトーシス関連因子 Caspase3 も加齢群で肝切除術後高値を持続していた。

### Aged liver regeneration - 70% hepatectomy model -

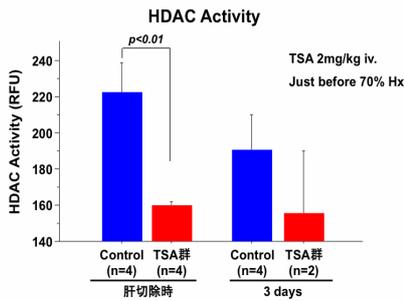


これらの検討から、加齢肝では肝再生増殖因子とともに細胞増殖因子の低下を認め、p16 や SMP30 などのアポトーシス関連因子の以上によるアポトーシス誘導、オートファジーの増強が確認された。

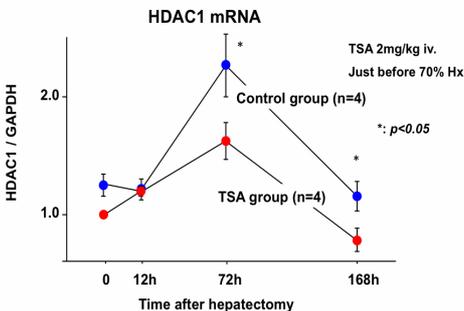
(2)肝切除におけるエピジェネティック制御の可能性

肝切除術直後から 72 時間における HDAC 活性は低下しており、HDAC 遺伝子発現も術後 72 時間以降著明に低下していた。

### Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -

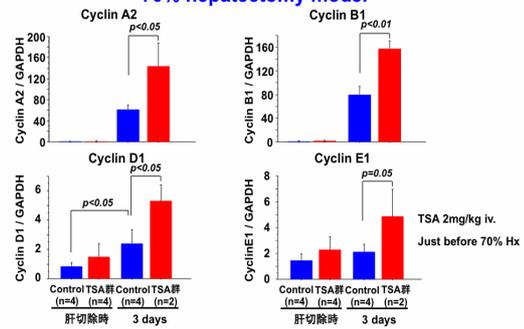


### Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -



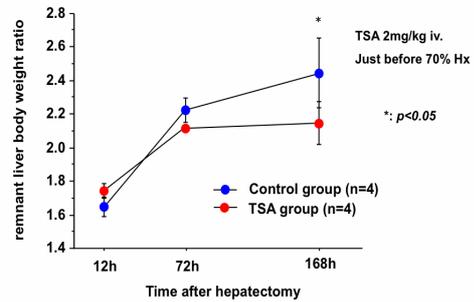
また Cyclin A2/B1/D1/E1 mRNA の上昇を認め、肝再生における増殖サイクルの上昇が確認された。

### Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -



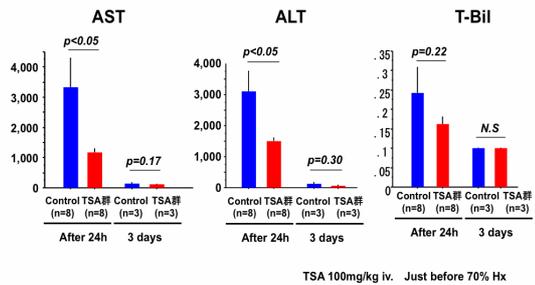
結果として、肝切除術後の肝再生率の上昇を認めた。

### Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -



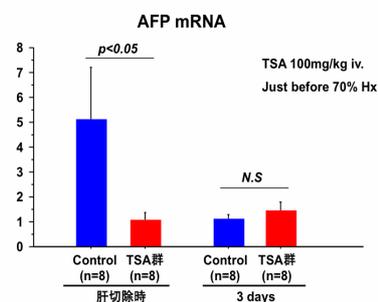
また肝切除術直前 TSA 100mg/kg を投与したところ、術後 24 時間の AST・ALT の有意な低下、T-bil の低下傾向を認め、術後肝傷害の軽減効果を示した。

### Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -

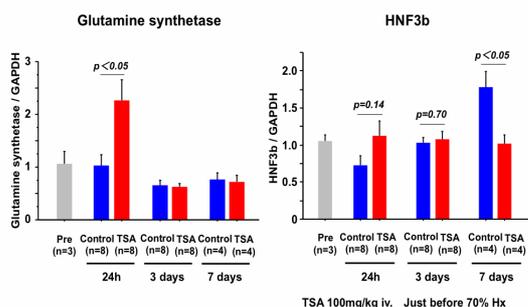


さらに HDAC 阻害による Epigenetic 制御により、初期幹細胞マーカーである AFP mRNA の術直後有意な低下とともに、分化誘導因子の HNF3B mRNA、Glutamine synthetase mRNA の上昇を認めた。

## Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -



## Role of epigenetic regulation - 70% hepatectomy model -



これらのことから、HDAC 阻害 (Epigenetic 制御) により残肝における肝細胞増殖増強とともに、幹細胞などからの分化能の増強が示唆され、結果として、肝傷害も軽減している可能性が示唆された。つまり肝切除における Epigenetic 制御の有用性が証明された。

以上、これらの研究結果により、加齢肝においては肝再生能が減弱する背景が認められるとともに、Epigenetic 制御により克服できる可能性が示唆された。しかしながら、本研究においては加齢肝における Epigenetic 制御の効果を確認できず、今後さらに解析を加えていく方針である。

### 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. Yamada S, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, Iwahashi S, Saito Y, Yoshikawa M, Teraoku H, Shimada M. Liver regeneration after splenectomy in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 2015 Aug 19. [Epub ahead of print] doi: 10.1111/hepr.12573. 査読有
2. Enkhbold C, Morine Y, Utsunomiya T, Imura S, Ikemoto T, Arakawa Y, Saito Y, Yamada S, Ishikawa D, Shimada M. Dysfunction of liver regeneration in aged liver after partial hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol.*

2015 Jul;30(7):1217-1224.

doi: 10.1111/jgh.12930. 査読有

3. Asanoma M, Mori H, Ikemoto T, Utsunomiya T, Imura S, Morine Y, Hanaoka J, Kanamoto M, Saito Y, Yamada S, Shimada M. Clinical role of Foxp3+ regulatory T cell in Living donor related liver transplantation for prediction of life-threatening complications. *J Med Invest.* 2015;62(1-2):37-40. doi: 10.2152/jmi.62.37. 査読有
  4. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Takasu C. Homing effect of adipose-derived stem cells to the injured liver: the shift of stromal cell-derived factor 1 expressions. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014 Dec;21(12):873-880. doi: 10.1002/jhbp.147. 査読有
  5. Zhu C, Ikemoto T, Utsunomiya T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Arakawa Y, Takasu C, Ishikawa D, Shimada M. Senescence-related genes may be responsible for poor liver regeneration after hepatectomy in elderly patients. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 May;29(5):1102-1108. doi: 10.1111/jgh.12468. 査読有
  6. Saito Y, Mori H, Takasu C, Komatsu M, Hanaoka J, Yamada S, Asanoma M, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Utsunomiya T, Shimada M. Beneficial effects of green tea catechin on massive hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol.* 2014 Apr;49(4):692-701. doi: 10.1007/s00535-013-0799-9. 査読有
  7. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H, Sugimoto K, Saito Y, Yamada S, Asanoma M. Beneficial effects of enteral nutrition containing with hydrolyzed whey peptide on warm ischemia/reperfusion injury in the rat liver. *Hepatol Res.* 2014 Jan;44(1):114-121. doi: 10.1111/hepr.12097. 査読有
  8. Hanaoka J, Shimada M, Utsunomiya T, Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Mori H. Significance of sonic hedgehog signaling after massive hepatectomy in a rat. *Surg Today.* 2013 Mar;43(3):300-307. doi: 10.1007/s00595-012-0248-z. 査読有
  9. Saito Y, Shimada M, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Mori H, Sugimoto K, Iwahashi S, Asanoma M. The protective effect of adipose-derived stem cells against liver injury by trophic molecules. *J Surg Res.* 2013;180(1):162-168. doi: 10.1016/j.jss.2012.10.009. 査読有
- [学会発表](計11件)
1. 荒川悠佑, 島田光生, 吉川雅登, 寺奥

- 大貴, 山田眞一郎, 齋藤裕, 岩橋衆一, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁. 小胞体ストレス応答に着目した加齢肝再生不全における肝星細胞の役割についての検討. 第 70 回日本消化器外科学会総会 2015.7.15~17 アクトシティ浜松(静岡県浜松市)
2. 山田眞一郎, 吉川雅登, 寺奥大貴, 齋藤裕, 高須千絵, 岩橋衆一, 荒川悠佑, 東島潤, 池本哲也, 居村暁, 森根裕二, 島田光生. 脾機能亢進症を合併した肝癌に対する脾摘+肝切除の有用性. 第 27 回日本肝胆膵外科学会 2015.6.11~13 ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区)
  3. 齋藤裕, 安井苑子, 吉川雅登, 寺奥大貴, 山田眞一郎, 岩橋衆一, 荒川悠佑, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 濱田康弘, 島田光生. 肝胆膵外科手術における周術期栄養評価の有用性に関する研究 体成分分析装置と主観的包括的アセスメント-. 第 27 回日本肝胆膵外科学会 2015.6.11~13 ホテルグランパシフィック LE DAIBA (東京都港区)
  4. 高須千絵, 森根裕二, 居村暁, 荒川悠佑, 岩橋衆一, 齋藤裕, 山田眞一郎, 石川大地, 島田光生. 肝虚血再灌流傷害の発生・進展機序の解明と統合的治療法開発の取り組み. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015.4.16~18 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
  5. 荒川悠佑, 島田光生, 寺奥大貴, 吉川雅登, 石川大地, 山田眞一郎, 齋藤裕, 高須千絵, 岩橋衆一, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 東島潤. 加齢肝再生不全における肝星細胞の役割についての検討. 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015.4.16~18 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
  6. 荒川悠佑, 島田光生, 石川大地, 齋藤裕, 高須千絵, 岩橋衆一, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 三宅秀則. 80 歳以上超高齢者における肝切除の妥当性に関する検討 肝星細胞に着目した加齢肝再生不全機序の解明. 第 69 回日本消化器外科学会総会 2014.7.16~18 郡山市民文化センター (福島県郡山市)
  7. 齋藤裕, 島田光生, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 池本哲也, 荒川悠佑, 金本真美, 岩橋衆一, 山田眞一郎, 石川大地. 80 歳以上超高齢者における肝切除の妥当性に関する検討 -術前栄養評価から見た高齢者の特徴-. 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 2014.6.11~13 和歌山県民文化会館、ホテルアパローム紀の国 (和歌山県和歌山市)
  8. 荒川悠佑, 島田光生, 石川大地, 山田眞一郎, 齋藤裕, 三上千恵, 岩橋衆一, 金本真美, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 宇都宮徹, 三宅秀則. 肝星細胞からみた加齢肝再生不全の検討. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014.4.3~5 国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都 (京都府京都市)
  9. 齋藤裕, 島田光生, 宇都宮徹, 石川大地, 山田眞一郎, 高須千絵, 岩橋衆一, 金本真美, 荒川悠佑, 森大樹, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 三宅秀則. 脂肪由来幹細胞の細胞保護効果には臓器特異性がある. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014.4.3~5 国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都 (京都府京都市)
  10. 池本哲也, 島田光生, 宇都宮徹, 居村暁, 森根裕二, 森大樹, 荒川悠佑, 金本真美, 齋藤裕, 山田眞一郎, 浅野間理仁, 三宅秀則. 脂肪由来幹細胞を用いた肝胆膵領域の再生医療に関する impact と課題. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013.4.11~13 福岡国際会議場, 福岡サンパレス, マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
  11. 荒川悠佑, 島田光生, 石川大地, 山田眞一郎, 浅野間理仁, 齋藤裕, 岩橋衆一, 金本真美, 森大樹, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁, 宇都宮徹, 三宅秀則. 高齢者の肝再生不全の機序解明と治療への応用. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013.4.11~13 福岡国際会議場, 福岡サンパレス, マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
森根 裕二 (MORINE, Yuji)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師  
研究者番号: 60398021
  - (2)研究分担者  
島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 10216070  
  
居村 暁 (IMURA, Satoru)  
徳島大学・病院・特任教授  
研究者番号: 90380021  
  
池本 哲也 (IKEMOTO, Tetsuya)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教  
研究者番号: 20398019  
  
宇都宮 徹 (UTSUNOMIYA, Toru)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授  
研究者番号: 30304801