

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462095

研究課題名(和文) 傷害肝再生の肝幹細胞分化・誘導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) Molecular mechanism of autophagy during differentiation and induction of hepatic stem cells in liver injury and regeneration

研究代表者

副島 雄二 (Soejima, Yuji)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30325526

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)：マウス肝傷害モデルを作成し、EpCAM陽性/Cd133低発現の細胞集団を分離、肝様細胞への分化誘導を確認した。Atg5のノックダウンによるオートファジーの阻害により肝様細胞への分化が促進され、p62が増加、肝様細胞への分化にmTOR経路の関与が示唆された。分岐鎖アミノ酸、ロイシンロイシン+グルタミンを除去した培地において、アルブミンの低下とCK19の増加を認めたことから、これらアミノ酸が肝様細胞への分化に重要であることが判明した。Atg5 ノックダウンによりロイシンによるmTOR活性化が強く誘導されることを確認した。p62ノックダウンでは、ロイシンによるmTOR活性化が減弱した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanism of autophagy, with special reference to p62 and associated signaling in hepatic differentiation. Silencing of ATG5 decreased active LC3 and increased p62, which indicated inhibition of autophagy. Conversely, SQSTM1/p62 silencing impaired or delayed hepatic differentiation. Amino acid activation of mTOR signaling was enhanced by ATG5 silencing and suppressed by SQSTM1/p62 silencing. In conclusion, promoting mTOR pathway activation by amino acids is dependent on intracellular accumulation of p62, which is induced by the inhibition of autophagy and plays an important role in the hepatic differentiation of stem/progenitor cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、発生過程において造血器官から代謝器官へと、その機能をドラスティックに変化させる臓器であり、成熟した肝臓は血清蛋白質の再編成、毒物・アルコールの解毒、アミノ酸や脂質の代謝などのさまざまな機能を持ち、潜在的に幹細胞が存在すると考えられる。また、肝臓は固形臓器として珍しい高い再生能力を持つ。再生能力を持つ臓器では、組織中に存在する幹細胞が自己複製しつつ、その一部が臓器を形成する機能細胞へと分化することで再生している(図1)。肝再生時には、門脈周囲領域から継続して細胞供給が行われると報告されている。しかし、傷害肝再生時における肝幹細胞の動態は未だ不明な点が多い。

オートファジーは細胞内の蛋白質の分解するための仕組みの一つであり、障害された蛋白質やオルガネラを分解し、細胞内蛋白質の再編成に重要な役割をになっていることが明らかになってきた(Mizushima, et al. Nature 1998)。さらにエネルギーの産生・維持においても重要な働きを持つことが明らかになってきた。肝再生という蛋白発現のドラスティックな変化を伴う幹細胞の分化過程においても莫大なエネルギーが必要と推測され、オートファジーは活性化されているものと推察される。

また、最近、骨髄幹細胞においてオートファジー関連蛋白として知られている Atg7 が幹細胞の維持に必須であることが報告された。我々はこれまでに肝再生に際しても肝組織中のオートファジーの高発現が重要であることを報告してきたが、前述の肝幹細胞におけるオートファジーの活性化の意義について解析した研究はこれまでない。

2. 研究の目的

本研究では、傷害肝モデルを用いて、肝幹/前駆細胞の分化・誘導を確認し、その分子機序としてのオートファジーの役割を明らかにすることを目的とする。以下の6点につき研究を計画した。(1) 肝前駆細胞誘導の肝障害モデルとして、DDCモデルマウスの作製。

(2) MACS(EpCAM⁺Lin⁻)による肝幹/前駆細胞の抽出。(3) 抽出細胞培養におけるオートファジー発現の経時的変化の確認。(4) *in vitro* でのオートファジー抑制下における、抽出細胞培養の動態評価。(5) *in vivo* でのオートファジー抑制下での肝幹/前駆細胞の動態。(6) Atg5 ノックアウトマウスにおける肝幹/前駆細胞・抽出細胞培養の動態の評価。

3. 研究の方法

(1) 肝前駆細胞誘導の肝障害モデルとして、DDCモデルマウスの作製。

通常の肝部分切除モデルでは成熟肝細胞

主体の肝再生が起こり、肝幹/前駆細胞による肝再生は起こらない。肝幹/前駆細胞誘導のモデルとして、マウスを対象とする場合、四塩化炭素投与モデル、0.1%DDC 給餌モデルなどが存在している。

DDC とはヘム合成系の最終段階である、プロトポルフィリン+鉄→ヘムの反応の中で作用する酵素(フェロケラターゼ)の阻害薬であり、元来小児科領域でポルフィリン血症モデルとして使用されていた。プロトポルフィリンの沈着、鉄の沈着より肝細胞傷害が生じ、傷害に対し、肝幹/前駆細胞による肝再生が行われる。

DDC 給餌後1週以降で明らかな組織学的変化(門脈周囲の細胆管反応など)が得られる。細胆管反応によって増製された細胞集団のなかに肝幹/前駆細胞が含まれていると考えられている。再現性の高い安定的なモデルマウスを得るために手技の標準化を行う

(2) MACS(EpCAM⁺Lin⁻)による肝幹/前駆細胞の抽出

今回細胞分離のための肝幹/前駆細胞マーカーを EpCAM⁺Lin⁻とした。また、肝幹/前駆細胞を得る手法として、濃度勾配法、FACS、MACS(磁力による細胞の分離)が考えられるが、今回は MACS による細胞の分離を行う(担当: 副島、吉住)。MACS による細胞分離の手法は、i) 吸入麻酔(イソフルレン)下のマウスを開腹し、門脈よりカニューレクションを行う。ii) 門脈より前灌流液として EGTA 含有 HBSS、その後コラゲナーゼ灌流を行うことで、細胞間接着を喪失させ、細胞をバラバラにする。iii) 得られた細胞集団を MACS 抗体(EpCAM および Lineage cocktail; 磁気で標識されたビーズ)で標識、まず Lin⁻の細胞集団を negative selection で分離し、その後 EpCAM⁺細胞集団を得る(図8)。分離の精度は FACS にて確認を行う。

(3) 抽出細胞培養におけるオートファジー発現の経時的変化 (IHC, 電顕所見, RT-PCR) および多分化能(肝細胞様、胆管上皮様遺伝子発現)・自己複製(colony 形成)の確認。

オートファジー発現の観察手法としては、免疫染色や Western blotting による蛋白発現の検討、RT-PCR による mRNA の検討、電子顕微鏡によるオートファゴソーム数の観察を経時的に行う。また、長期培養による抽出細胞の自己複製能、分化の有無を検討する。自己複製能の評価は colony forming assay(培養8日目)にて評価を行う。分化の評価は分化マーカーとして、アルブミン(肝細胞マーカー)、CK19(胆管上皮マーカー)の免疫組織学的染色及び RT-PCR による mRNA 発現を検討する。

4) *in vitro* でのオートファジー抑制下(レンチウイルスによる Atg4B^{C74A})における、抽出細胞培養の動態を評価(形態学的、細胞寿命、IHC, RT-PCR, 培地中のアルブミン、糖等の産生)。

オートファジー抑制はオートファジーに必要とされる、Atg4B 遺伝子の変異遺伝子である Atg4B^{C47A} のレンチウイルスによる導入により行う。抑制下における、上記(3)との相違の評価を行う。

(5) in vivo でのオートファジー抑制下 (3-methyladenine, chloroquine 投与マウス) での肝幹/前駆細胞の動態。

in vivo の抑制は 3-メチルアデニン(PI3K 阻害薬)投与によって行う。抑制下における肝幹/前駆細胞の動態の変化を免疫組織学的染色および Western blotting で蛋白発現の評価、RT-PCR にて mRNA の評価を行う。

(6) Atg5 ノックアウトマウスにおける肝幹/前駆細胞の動態、および抽出細胞培養の動態の評価。

Atg5 knock out マウスにおける肝幹/前駆細胞の動態の変化を WT マウスと比較検討する。in vivo の検討として、免疫組織学的染色および Western blotting、RT-PCR にて評価する。また、(2)と同様の手法で抽出した、Atg5KO マウス由来 EpCAM+Lin⁻細胞の培養により、(3)との比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) DDC 肝障害モデルマウス肝臓からの EpCAM/Cd133 共陽性細胞の分離と培養。

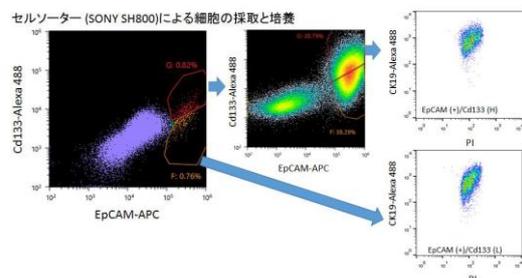
0.1% DDC 含有食餌餌により、門脈周囲に細胆管反応が誘導され 肝組織幹細胞・前駆細胞を含む細胞集団の増加が観察された。

EpCAM 陽性/Cd133 高発現及び、EpCAM 陽性/Cd133 低発現の細胞集団から、CK19 陽性の細胞集団を得て細胞を二次元で培養を行った。

(2) MACS (EpCAM⁺Lin⁻) による肝幹/前駆細胞の抽出

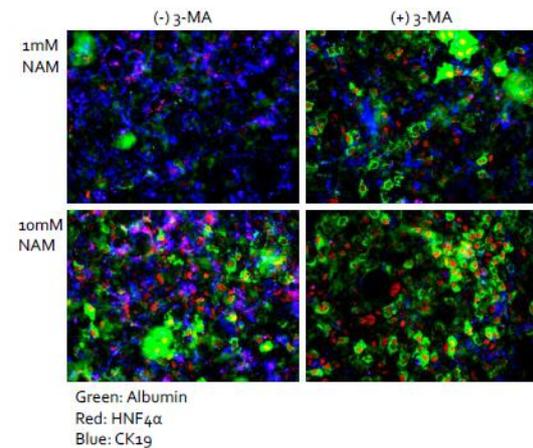
EpCAM 陽性/Cd133 高発現及び、EpCAM 陽性/Cd133 低発現の細胞集団から、CK19 陽性の細胞集団を得て細胞を二次元で培養を行った。その細胞を肝様細胞への分化誘導条件で処理したところ、HNF4 α 陽性細胞の増加を認めたことから肝様細胞への分化が誘導されることが示唆された。

EpCAM 陽性/Cd133 低発現の細胞集団由来において、肝様細胞への分化誘導が観察された。EpCAM 陽性/Cd133 高発現の細胞集団由来においては、分化誘導が観察されなかった。



(3) ニコチンアミド (NAM)、3-methyladenine (3-MA) による肝様細胞への分化促進効果とオートファジー

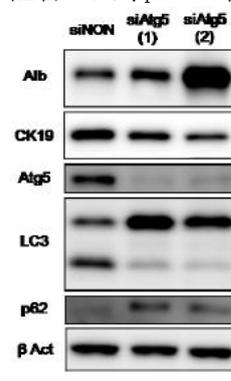
Starvation (Starv) により Autophagosome, Autophagolysosome の形成が誘導され、オートファジー阻害剤(3-MA) によりその形成が抑制されることが観察された。またオートファジー阻害剤は、濃度依存的に細胞増殖を抑制した。3mM 3-MA は、S 期の細胞集団を減少させ、G0 期の細胞集団を増加させた。細胞増殖が静止期に入った細胞への 3-MA 添加は、予想に反して細胞死へ導くこと無く、肝様細胞への分化誘導を促進した。



(4) 肝組織幹細胞肝様細胞分化におけるオートファジー阻害の効果の検討

Atg5 を siRNA による knock down し、オートファジーを阻害した際の肝様細胞分化に対する効果を検討した。

Atg5 の knock down により、オートファジーが阻害されることを確認した(活性化 LC3 の減少)。オートファジーの阻害によりアルブミンの増加と CK19 の減少が確認され、肝様細胞への分化が促進されることが示唆された。オートファジーの阻害により、p62 の増加が観察された。

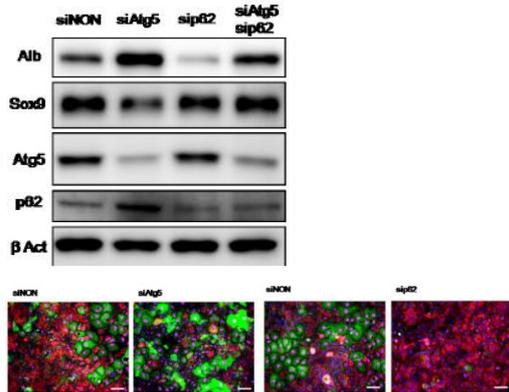


(5) 肝組織幹細胞肝様細胞分化におけるオートファジー関連因子 p62 の関与の検討

p62 を増加させる (siRNA による Atg5 の knock down) 及び、p62 を減少させる (siRNA による p62 の knock down) 条件下における肝様細胞分化

への影響を検討した。

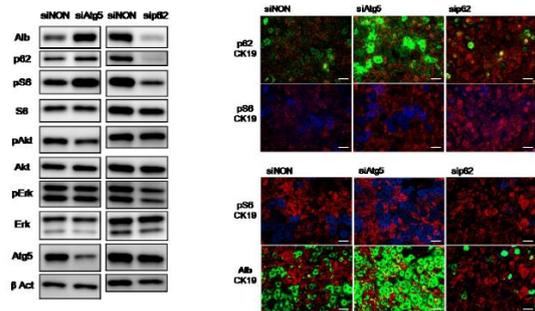
Atg5 の knock down により、p62 の増加を確認した。P62 は、HNF α 陽性細胞 (肝様細胞に分化した細胞) に多く、CK19 陽性細胞 (未分化の細胞) では少ない傾向を示した。p62 の knock down において、アルブミンの減少と HNF α 陽性細胞の減少が観察された。Atg5 と p62 の double knock down においては、Atg5 単独で認められたアルブミンの増加と Sox9 の減少をキャンセルする効果を示した。



(6) p62 による肝様細胞分化促進における mTOR 活性化の関与に関する検討

Atg5 の knock down と p62 の knock down における種々シグナル伝達への影響を検討した。

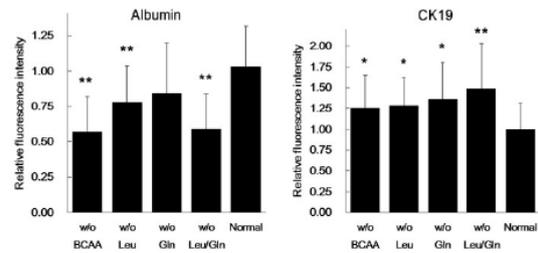
Atg5 knock down により p62 の増加、アルブミンの増加、pS6 (mTOR 経路) の増加を認め、p62 の knock down により p62 の減少、アルブミンの減少を認めた (Western blotting)。また免疫染色にて p62 と pS6 陽性細胞の一致と、pS6 とアルブミン陽性細胞の一致を認めた。以上の結果から p62 による肝様細胞への分化に mTOR 経路の関与が示唆された。



(7) 肝様細胞分化におけるアミノ酸の関与の検討

アミノ酸による mTOR 経路活性化の関与を検討する目的で、肝様細胞分化におけるアミノ酸除去の効果を検討した。

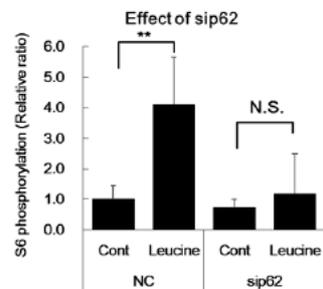
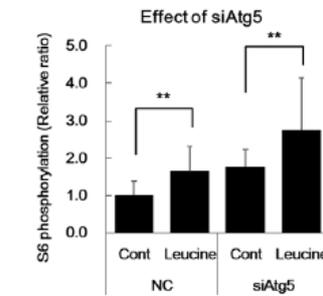
分岐鎖アミノ酸、Leucine、Leucine+Glutamine を除去した培地において、アルブミンの低下と CK19 の増加が観察されたことから、これらアミノ酸が肝様細胞への分化に重要との知見を得た。



(8) アミノ酸による mTOR の活性化における p62 の関与の検討

Starvation 後、leucine による mTOR 活性化を S6 タンパクのリン酸化を指標に評価し、Atg5 と p62 の knock down の効果を検討した。

P62 を増加させる条件 (Atg5 knock down) において、leucine による mTOR 活性化が強く誘導されることを確認した。一方、p62 knock down では、leucine による mTOR 活性化が減弱した。



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 10 件)

1. Soejima Y, Muto J, Matono R, Ninomiya M, Ikeda T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Shirabe K, Maehara Y. Strategic breakthrough in adult ABO-incompatible living donor liver transplantation: preliminary results of consecutive seven cases. Clin Transplant 2013; 27:227-31.
2. Ikegami T, Shirabe K, Fukuhara T, Furusyo N, Kotoh K, Kato M, Shimoda S, Aishima S, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y. Early extensive viremia, but not rs8099917 genotype, is the only predictor for cholestatic hepatitis C after living-donor liver transplantation. Hepatol Res. 2013;43: 621-9.

3. Ikegami T, Shirabe K, Yoshizumi T, Furusyo N, Kotoh K, Kato M, Shimoda S, Soejima Y, Motomura T, Fukuhara T, Maehara Y. Impact of Conversion From Pegylated Interferon- α 2b to Interferon- α 2a for Treating Recurrent Hepatitis C After Liver Transplantation. Transplantation 2013; 95(6):e38-e42.
4. Ikegami T, Shirabe K, Nakagawara H, Yoshizumi T, Toshima T, Soejima Y, Uchiyama H, Yamashita Y, Harimoto N, Maehara Y. Obstructing Spontaneous Major Shunt Vessels is Mandatory to Keep Adequate Portal Inflow in Living-Donor Liver Transplantation. Transplantation. 2013; 95:1270-7.
5. Yoshizumi T, Shirabe K, Nakagawara H, Ikegami T, Harimoto N, Toshima T, Yamashita YI, Ikeda T, Soejima Y, Maehara Y. Skeletal muscle area correlates with body surface area in healthy adults. Hepatol Res. 2013; Mar 29. doi: 10.1111/hepr.12119.
6. 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. 2013; May 24. [Epub ahead of print]
7. 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. doi: 10.1002/hep.27140.
8. Yoshizumi T, Itoh S, Imai D, Ikegami T, Ninomiya M, Iguchi T, Harimoto N, Takeishi K, Kimura Y, Uchiyama H, Soejima Y, Ikeda T, Kawanaka H, Shirabe K, Maehara Y. Impact of platelets and serotonin on liver regeneration after living donor hepatectomy. Transplant Proc. 2015; 47: 683-5.
9. Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Harimoto N, Itoh S, Takeishi K, Uchiyama H, Kawanaka H, Yamashita YI, Tsujita E, Harada N, Oki E, Saeki H, Kimura Y, Shirabe K, Maehara Y. Triple therapy using direct-acting agents for recurrent hepatitis C after liver transplantation: a single-center experience. Transplant Proc. 2015; 47: 730-2.
10. Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Uchiyama H, Shirabe K, Maehara Y. Feasible usage of ABO incompatible grafts in living donor liver transplantation. Hepatobiliary Surg Nutr. 2016

Apr;5(2):91-7.

[学会発表] (計 3 件)

1. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013 年 4 月 11-13 日、福岡) パネルディスカッション「生体肝移植後外科的合併症の変遷とその対策」副島雄二、調 憲、吉住朋晴
2. 第 6 回膵臓内視鏡外科研究会 (2014 年 10 月 1 日、盛岡) ワークショップ「腹腔鏡下膵体尾部切除の標準化と問題点」副島雄二、前原伸一郎、本村貴志、藤中良彦、中西良太、梶原勇一郎、本坊拓也、高橋郁雄、西崎 隆
3. 第 27 回日本内視鏡外科学会 (2014 年 10 月 2 日-4 日、盛岡) ワークショップ「完全腹腔鏡下右葉切除におけるグリソン処理の問題点と対策」副島雄二、前原伸一郎、本村貴志、藤中良彦、中西良太、梶原勇一郎、本坊拓也、高橋郁雄、西崎 隆

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

調 憲 (SHIRABE Ken)

群馬大学・医学(系)研究科 (研究院)・

教授

研究者番号：70264025

(3) 研究分担者

吉住朋晴 (YOSHIZUMI Tomoharu)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：80363373

(4) 研究分担者

池上 徹 (IKEGAMI Toru)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：80432938

(5) 研究分担者

池田哲夫 (IKEDA Tetsuo)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：60585701

(6) 研究分担者

前原喜彦 (MAEHARA Yoshihiko)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：80165662

(3) 連携研究者

()

研究者番号：