

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861194

研究課題名(和文) 加齢と肝虚血再灌流傷害・再生制御における肝星細胞と小胞体ストレス応答に関する研究

研究課題名(英文) The role of unfolded protein response on hepatic stellate cell in old liver ischemia reperfusion injury and liver regeneration

研究代表者

荒川 悠佑 (ARAKAWA, Yusuke)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：00448325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において加齢肝星細胞をマウスより単離・培養する系を樹立し、この肝星細胞における肝再生関連因子(HGF, TGF $\beta$ )の発現に加えて、conditioned mediumを用いて肝細胞との共培養により肝細胞増殖に与える影響を検討した。結果では肝星細胞は肝細胞増殖を促進するが、加齢肝星細胞では若年肝星細胞と比較してその増殖促進効果が減弱していた。さらに加齢及び若年肝星細胞の機能的差異を検討するために、小胞体ストレス応答の違いに着目し検討を行った。この結果では小胞体ストレス誘導下のBip発現では両肝星細胞に差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The method of hepatic stellate cell (HSC) isolation from young and old mouse liver with low-speed centrifugation was established. Gene expression of liver regeneration related genes including HGF and TGF $\beta$ . The expression of HGF mRNA in old HSC was significantly lower than that in young HSC. Conditioned medium from old HSC promoted less liver regeneration compared with that from young HSC. For analysis of the difference in unfolded protein response (UPR) of them, HSC was stimulated with stress inducer. The expression of Bip (GRP78) which is sensor of UPR in old HSC was similar with young HSC.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝星細胞 加齢肝 肝再生 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

大量肝切除あるいは生体肝移植における術後肝不全は現在においても深刻な問題である。特に加齢肝切除症例における術後肝不全、加齢肝グラフトにおける移植後のグラフト機能不全が報告されている。このような加齢肝術後肝不全において、肝星細胞が重要な変化・役割を担っていることが推測される。加齢と肝星細胞に関する報告はこれまでなく、その活性化のメカニズムも不明である。近年、加齢肝はSMP30・p66srcによる酸化ストレスや、その結果生じる活性酸素による小胞体ストレス下にあることも報告されており、過剰な小胞体ストレス応答の存在が示唆される。

2. 研究の目的

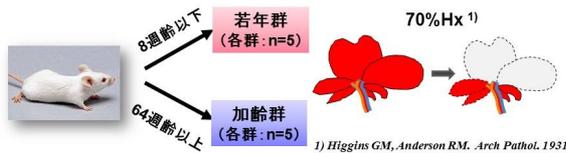
加齢肝における肝星細胞の役割と小胞体ストレスの関与について検討する。

3. 研究の方法

(1) 8週齢以下の若年マウス、64週例以上の加齢マウスを用いて70%肝切除を行い術後24,48,72時間でsacrificeし、肝再生を肝体重比、Ki67 labeling index, Cyclin D1 mRNA発現をqPCRで検討する。

① 70%肝切除 (Hx)モデルマウス

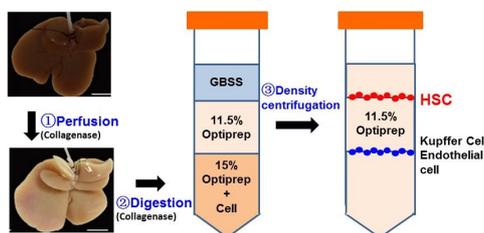
- ✓ Balb/c 雄性マウスを若年群(8週齢以下)と加齢肝(64週齢以上)
- ✓ 両群に70%肝切除を施行
- ✓ 術後24・48・72時間後に犠死



肝再生率: 残肝体重比、Ki67, Cyclin D1 mRNA

(2) 若年マウス及び加齢マウスからそれぞれ濃度遠心分離で isolation した肝星細胞を用いて、肝再生関連因子(HGF, TGF)の発現を検討する。

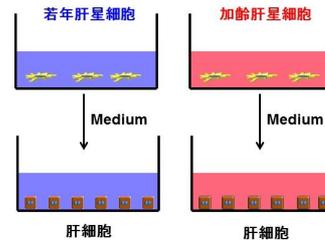
② 肝星細胞の単離



肝星細胞の肝再生関連因子: HGF, TGF mRNA (RT-PCR)

(3) 肝星細胞の培養液 (conditioned medium) を用いて、肝細胞を培養し、肝細胞増殖に与える影響を検討する。肝細胞の増殖は Ki67 labeling index を用いて評価し、conditioned medium 内の HGF 濃度を ELISA 法を用いて測定する。

③ 肝星細胞の conditioned medium を用いた肝細胞培養

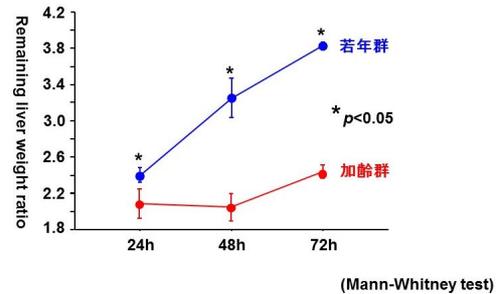


肝細胞: Ki67 index, 培養液中: HGF濃度(ELISA)

(4) 肝星細胞に小胞体ストレス誘導剤を用いて unfolded protein response を誘導し、Bip 発現を Western blotting を用いて評価する。

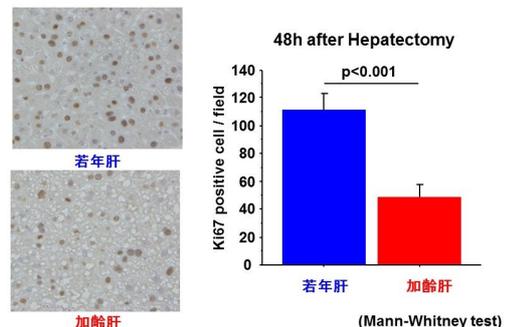
4. 研究成果

肝切除後残肝体重比



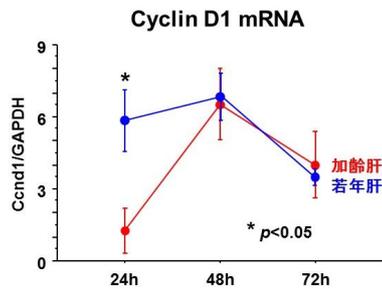
加齢肝では肝切除後 24・48・72 時間の肝再生が低下

Ki67 labeling index



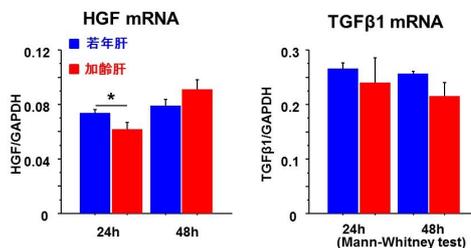
肝切除後 48 時間で Ki67 labeling index が低値

## Cyclin D1



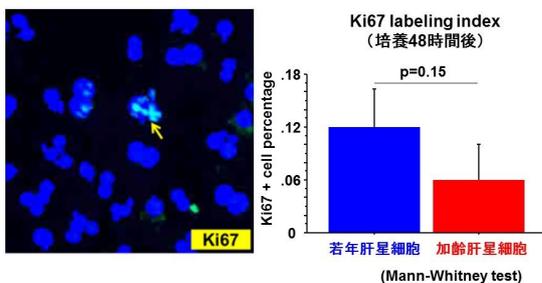
肝内 Cyclin D1 mRNA は肝切除後 24 時間で加齢肝で低発現

## 肝星細胞における HGF, TGFβ1 発現

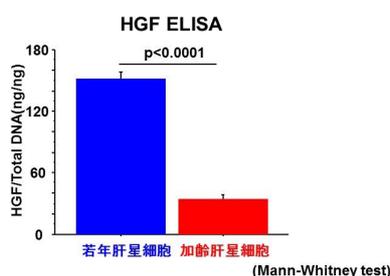


加齢肝星細胞では単離後 24 時間で HGF mRNA が低発現

## Conditioned medium による共培養

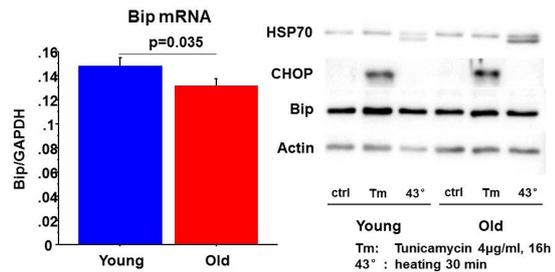


## Conditioned medium 内の HGF 濃度



加齢肝星細胞由来の Conditioned medium では肝細胞増殖が低下しており HGF 濃度が低値

## Unfolding protein response



若年及び加齢肝星細胞の unfolding protein response を tunicamycin を用いて誘導したが Bip protein の発現に差を認めず。

## 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 5 件)

荒川悠佑, 島田光生, 石川大地, 山田眞一郎, 齋藤裕, 高須千絵, 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.

高齢者における肝再生不全の肝星細胞からのアプローチ

第 12 回消化器外科学会大会 2014 年 11 月 2 日 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

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.

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 年 7 月 16 日 ホテルハマツ(福島県郡山市)

荒川悠佑, 島田光生, 石川大地, 齋藤裕, 岩橋衆一, 池本哲也, 森根裕二, 居村暁.

肝星細胞からみた加齢肝再生不全の検討

第 32 回日本肝移植研究会 2014 年 7 月 3 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

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, 森大樹, 池本哲也, 森根裕二, 宇都宮徹, 三宅秀則.

肝星細胞からみた加齢肝再生不全機序

の解明

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(東京都千代  
田区)

荒川悠佑, 島田光生, 石川大地, 山田真  
一郎, 斎藤裕, 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 回日本外科学会総会 2014 年 4 月  
3 日 国立京都国際会館(京都府京都市)

〔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 :  
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

荒川 悠佑 (ARAKAWA, Yusuke)

徳島大学・病院・助教

研究者番号 : 0 0 4 4 8 3 2 5

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

島田 光生 (SHIMADA, Mitsuo)

徳島大学・大学院ヘルパルサイエンス研究部・  
教授

研究者番号 : 1 0 2 1 6 0 7 0

居村 暁 (IMURA, Satoru)

徳島大学・病院・特任教授

研究者番号 : 9 0 3 8 0 0 2 1

森根 裕二 (MORINE, Yuji)

徳島大学・大学院ヘルパルサイエンス研究部・  
講師

研究者番号 : 6 0 3 9 8 0 2 1

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)

徳島大学・疾患予防医学研究センター・教  
授

研究者番号 : 9 0 5 0 2 5 3 4