

論文の内容の要旨

肝再生過程における G₁ 後期細胞内応答の解析

小沢 政成

【背景・目的】

肝臓は再生能を有する臓器であり、肝がんの切除や生体部分肝移植といった外科的治療は肝再生を期待して行われる。しかしながら、不十分な肝再生によって肝不全・予後不良がもたらされる例が報告されており、肝再生を積極的に制御する方法論の確立が望まれている。肝再生を抑制する一因として、これまでに動物モデルを用いた検討により肝臓内グルタチオン (GSH) 濃度の減少が示唆されており、臨床では生体部分肝移植に伴う移植片の冷虚血・再灌流によって肝臓内 GSH 濃度が 30%程度に減少することが報告されている。従って、臨床における肝臓内 GSH 濃度の減少は肝再生を抑制し、肝移植患者の予後に悪影響を与えることが想定される。そこで、GSH 濃度の減少が肝再生を抑制する分子メカニズムの解明を目的として本研究を行うこととした。本研究を通じて得られる GSH 濃度の減少を原因とした肝再生抑制メカニズムに関する知見は、肝移植の施術に伴って生じる酸化ストレスへの効果的な対応策を構築し、重症肝疾患患者における治療予後の向上を図る上での基盤情報になると期待される。

ラット肝部分切除モデルでは、restriction point を通過する際に重要な cyclin D の誘導が観察される肝切除後 12 時間から 24 時間 (G₁ 中後期) にかけて、肝臓内 GSH 濃度が増加していることが報告されている。そこで本研究では、比較的還元下にあるはずの G₁ 中後期にお

いて、GSH 濃度の減少が cyclin D の発現量上昇に対して抑制的に作用する結果、肝再生が抑制されると想定した。cyclin D は hepatocyte growth factor (HGF)、epidermal growth factor (EGF) 等の増殖因子の刺激によって誘導されることが知られているが、HGF および EGF 受容体の強い活性化は肝切除後一時間以内に観察され、更に cyclin D のプロモーター領域に結合能を有する AP-1、NF- κ B、STAT3 などの転写因子の活性化は、肝切除後 6 時間以内には観察されている。従って、G₁ 中期以降において観察され始める cyclin D の誘導には、肝切除直後に発生する強い増殖刺激とは異なった二次的な増殖シグナルが関与している可能性が想定される。

本研究では、肝再生過程で主要な機能を果たす HGF 受容体の c-MET に着目し、まず G₁ 中後期における cyclin D の誘導制御メカニズムの解明を試み、次いで GSH 濃度の減少がその cyclin D の誘導メカニズムに対して及ぼす影響を解析した (Fig. 1)。

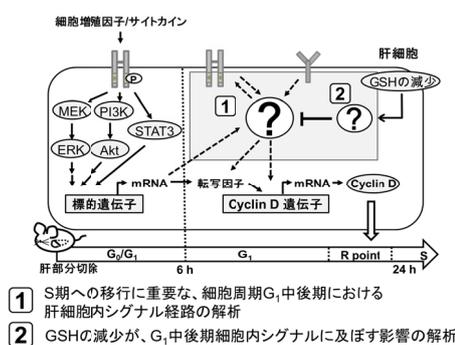


Fig.1 本研究のスキーム

【方法・結果】

cyclin D1 の誘導に重要な、G₁ 中後期におけるシグナル経路の解析

1-1. 持続的な PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化が cyclin D1 の発現誘導に必要である。

まず、c-MET 下流シグナルの PI3K/Akt/mTORC1 経路および MEK/ERK 経路に着目し、cyclin D1 の誘導に増殖シグナル受容後の二次的なシグナル応答が関与している可能性を検討した。ラット初代培養肝細胞を用いて、HGF 刺激後における mTORC1 の基質である S6K1 および MEK の基質である ERK1/2 の経時的なリン酸化プロファイルを取得した結果、いずれのシグナル分子も G₁ 中後期に至るまでリン酸化されていることが確認された。続いて、両経路の持続的な活性が cyclin D1 mRNA の誘導および肝細胞の S 期への移行に必要であるか否か検討した。cyclin D1 の誘導が観察され始める HGF 刺激後 12 時間時点において PI3K/Akt/mTORC1 および MEK の各阻害剤を添加した結果、PI3K/Akt/mTORC1 の各阻害剤は cyclin D1 mRNA の誘導を抑制し、BrdU 取り込みを指標とした S 期肝細胞数を有意に減少させることが明らかとなった (Fig.2)。一方、MEK 阻害剤に関しては有意な抑制効果は観察されなかった (Fig.2)。これらの結果から、PI3K/Akt/mTORC1 経路の持続的な活性化が肝細胞の S 期への移行に必要であることが示唆された。

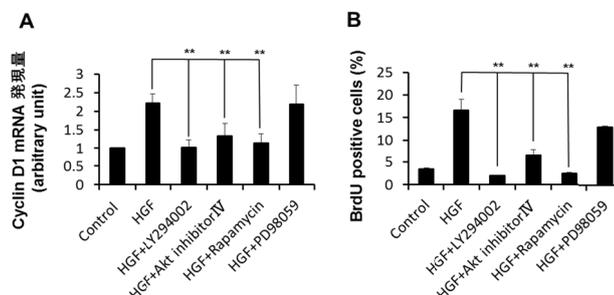


Fig.2 PI3K/Akt/mTORC1 経路および MEK/ERK 経路の阻害による肝細胞増殖抑制効果
(A) HGF 添加後 24 時間時点における cyclin D1 mRNA の発現量
(B) HGF 添加後 27-30 時間における BrdU 取り込み細胞数の割合
PI3K inhibitor, LY294002; Akt inhibitor, Akt inhibitor IV; mTORC1 inhibitor, Rapamycin; MEK inhibitor, PD98059

1-2. リガンド非依存的な c-MET の活性化が、持続的な mTORC1 のリン酸化をもたらす。

PI3K/Akt/mTORC1 経路の持続的な活性化をもたらすシグナル入力の起点を同定するため、まず c-MET の関与を検討した。ラット初代培養肝細胞において、HGF 添加後の経時的な c-MET リン酸化プロファイルを取得した結果、c-MET は HGF 添加直後と比較して強度は低下するものの、12 時間以降も持続的にリン酸化されていることが明らかとなった。この 12 時間時点以降における c-MET の活性が、PI3K/Akt/mTORC1 経路の持続的な活性化に関与しているか否かを検討するため、c-MET キナーゼ阻害剤を HGF 刺激後 12 時間時点で添加した。その結果、S6K1 のリン酸化、cyclin D1 mRNA 発現量、および S 期肝細胞数が減少することが明らかとなった。続いて、PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化に寄与する 12 時間時点以降における c-MET の活性化が、HGF の曝露に起因したものであるか否かを検討するため、HGF 添加後 5 時間時点でメディウム交換を行って HGF をウォッシュアウトし、c-MET の経時的なリン酸化プロファイルを取得した。その結果、HGF ウォッシュアウト群において c-MET は 12、18 時間時点でリン酸化されており、S6K1 のリン酸化プロファイルに差異は観察されなかった (Fig.3)。また、HGF 添加群と HGF ウォッシュアウト群では、肝細胞の S 期への移行割合に差異は観察されなかったため、細胞周期の進行に必要な G₁ 中後期における c-MET の持続的な活性化は、HGF 非依存的なメカニズムを介して生じている可能性が示唆された。

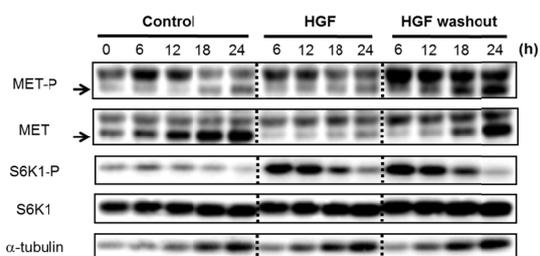


Fig.3 HGF 添加後 5 時間時点における HGF のウォッシュアウトが、その後の肝細胞内 c-MET および S6K1 のリン酸化に及ぼす影響

1-3. 持続的な c-MET/PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化が *in vivo* 肝再生に必要である。

これまでの検討より明らかとなった、G₁ 中後期における c-MET/PI3K/Akt/mTORC1 経路の持続的な活性化が、*in vivo* 肝再生過程においても重要な役割を果たしていることを確認するため、ラット部分肝切除モデルを用いて検討を行った。部分肝切除後 12 時間時点で c-MET キナーゼ阻害剤および mTORC1 阻害剤をそれぞれ投与した結果、24 時間時点における cyclin D の発現量および S 期肝細胞数は有意に減少し、G₁ 中後期における c-MET/mTORC1 の活性が *in vivo* 肝再生においても必要であることが示唆された。

GSH 濃度の減少による肝再生抑制メカニズムの解析

2-1. GSH 濃度の減少は cyclin D1 の誘導を抑制する。

GSH 濃度の減少が肝部分切除後の *in vivo* 肝再生を抑制するメカニズムを検討するため、まず GSH 合成酵素阻害剤である BSO がラット初代培養肝細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。なお、BSO は、添加後 12 時間時点で GSH 濃度を control の 20% に、24 時間時点で 3% にまで減少させた。HGF と同時に BSO を添加した結果、BSO の処理は S 期肝細胞数を有意に減少させ、その抑制効果は GSH ethyl ester (GSHE) による GSH の補給によってレスキュー

一された (Fig. 4A)。続いて、GSH 濃度の減少が、HGF 添加後の cyclin D1 mRNA 量に影響を与えるか否か検討を加えた結果、BSO の処理は 12、18 時間時点における cyclin D1 mRNA の発現量上昇を抑制することが明らかとなった (Fig. 4B)。

2-2. GSH 濃度の減少は、AMPK の活性化を介して mTORC1 の活性を抑制する

GSH 濃度の減少が mRNA レベルで cyclin D の発現上昇を抑制したため、cyclin D の誘導に重要な G₁ 中後期における c-MET/PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化に対し、肝細胞内 GSH 濃度の低下が抑制的に作用している可能性が想定された。この点を検証するため、まず GSH 濃度の減少が mTORC1 の活性に影響を及ぼしているか否か検討した。その結果、HGF 刺激後 12 時間時点において、BSO 添加群では S6K1 のリン酸化が減弱していることが明らかとなった (Fig.5)。mTORC1 活性を制御するシグナル経路としては PI3K/Akt 経路、MEK/ERK 経路および mTOR 抑制因子である AMPK を介した経路が知られているため、GSH 濃度の減少が各々の活性に及ぼす影響を検討した。その結果、BSO の処理は Akt および MEK の活性に影響を与えなかった。一方、HGF 添加直後に一過性にリン酸化され、その後脱リン酸化される AMPK に関しては、BSO 処理群で AMPK のリン酸化が 12 時間時点で高く維持されたままであった (Fig.5)。そこで、G₁ 中後期における AMPK の活性化が細胞増殖の抑制に関与している可能性を検討するため、BSO の細胞増殖抑制効果に対する AMPK 阻害剤の影響を検討した。AMPK 阻害剤を HGF および BSO 添加後 12 時間時点で添加したところ、肝細胞における S 期への移行割合は有意にレスキューされた。また、AMPK の阻害剤を用いたレスキュー処理群においては、mTORC1 の活性が HGF 添加群とほぼ同程度まで回復している様子が観察された。従って、GSH 濃度の低下による肝細胞の S 期への移行割合の減少は、AMPK の活性化を介した mTORC1 の活性抑制に起因したものであることが示唆された。

【まとめ・考察】

本研究において私は、HGF 刺激を受容した肝細胞において、①cyclin D の発現上昇には G₁ 後期までの持続的な PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化が必要であること、また、②G₁ 中後期におけるリガンド非依存的な c-MET の活性化が、この経路の持続的な活性化に関与すること、および、③肝細胞内 GSH 濃度の減少は、AMPK を介した mTORC1 の活性抑制に

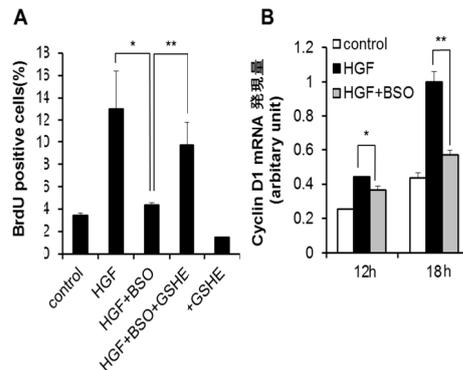


Fig.4 BSO による肝細胞増殖抑制効果
(A) HGF 添加後 27-30 時間における BrdU 取り込み細胞数の割合
(B) HGF 添加後 12、18 時間における cyclin D1 mRNA の発現量

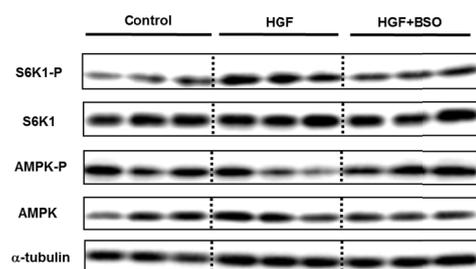


Fig.5 HGF 添加後 12 時間時点における S6K1 および AMPK のリン酸化に対する BSO の影響

よって、cyclin D の発現上昇を抑制することを見出した (Fig.6)。以上の知見より、肝臓内 GSH 濃度および mTORC1 活性を維持する方法論を確立することが、重症肝疾患患者の治療予後の向上を図る上で重要であることが示唆された。

これまでの肝再生に関する研究は、肝切除直後のシグナル解析や、シグナル分子の欠損が肝再生に与える影響についてのものが主であった。本研究によって、細胞周期の進行には G₁ 中後期における増殖因子受容体からのシグナル入力が必要であることが示唆されたことから、肝再生を抑制するリスク因子およびその分子メカニズムの解析を詳細に行う際には、増殖刺激受容直後だけではなく、G₁ 期全般に渡った肝細胞内増殖シグナル分子の活性に対する影響を検討することが重要であると考えられる。今後は、GSH 濃度の減少によって AMPK が活性化されるメカニズムを解明することにより、mTORC1 の活性抑制を効果的に防ぐ方法論の確立が期待される。

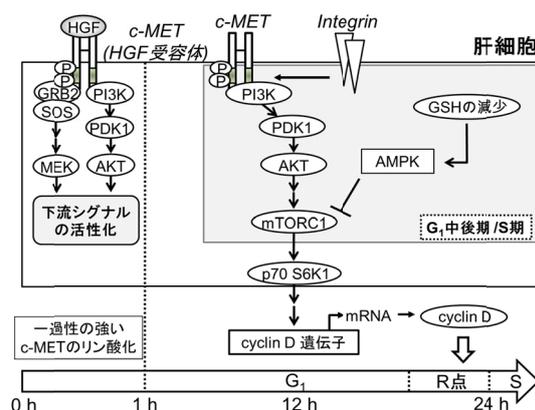


Fig.6 GSH 濃度の減少が肝細胞の S 期への移行を抑制する分子メカニズムの概要