

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

( 萩原 慶 ) 印

(学位論文のタイトル)

A New Liver-Regeneration Molecular Mechanism Involving Hepatic Stellate Cells, Kupffer Cells, and Glucose-Regulated Protein 78 as a New Hepatotrophic Factor

(肝星細胞、クッパー細胞および新たな肝再生因子であるGRP78を介した新たな肝再生の分子機序の解明)

Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences 2022(in press)

Kei Hagiwara, Norifumi Harimoto, Takahiro Yamanaka, Norihiro Ishii, Takehiko Yokobori, Mariko Tsukagoshi, Akira Watanabe, Kenichiro Araki, Tomoharu Yoshizumi, and Ken Shirabe

(学位論文の要旨)

【背景】肝臓は高い再生能力を持つ臓器であるが、肝切除後の肝再生の不良による肝不全は依然として臨床的に大きな問題である。私たちは肝切除術後の肝不全を克服するために、肝再生において重要な役割を持つことが知られている肝星細胞 (hepatic stellate cells; HSC) とクッパー細胞 (Kupffer cells; KC) の活性化メカニズムに注目した。興味深いことに、肝臓の線維化により活性化されたHSCは新規肝線維化マーカーであるMac-2-binding protein glycan isomer (M2BPGi)を分泌し、M2BPGiはKCを活性化することが報告されている。すなわち、M2BPGiは単なる肝線維化マーカーではなく、HSC活性化マーカーであると考えられている。本研究の目的はHSC由来M2BPGiにより活性化されたKCが肝臓再生を促進する分子機序を解明することである。

【方法】生体肝移植ドナーの術後3日目の血清M2BPGiを測定し術後7日目の肝再生との関連を解析した。M2BPGi処理およびKC培養上清がヒト肝細胞の増殖能 (BrdU取り込み)に与える影響を評価した。並行してKC培養上清中の変動タンパク質を質量分析計で解析し、M2BPGiにより誘導される分泌因子としてGlucose-Regulated Protein 78 (GRP78)を同定した。本研究ではGRP78が肝再生に与える意義を細胞実験ならびにマウス肝切除モデルを用いて検討した。

【結果】術後3日目の血清M2BPGiは術後7日目の肝再生率および切除肝重量と正の相関関係を示した。肝細胞培養液へのM2BPGi添加は肝細胞のBrdU取り込みに影響を与えなかったが、KC培養上清添加は肝細胞のBrdU取り込みを促進した。さらにM2BPGi処理後のKC培養上清添加は肝細胞のBrdU取り込みを更に促進した。そこでM2BPGi処理後のKC培養上清を質量分析計にて解析したところ、M2BPGi添加によりKCから上清中への分泌が促進されるタンパクとしてGRP78が同定された。培養上清にGRP78を添加した結果、肝細胞のBrdU取り込みは亢進し、肝再生促進因子であるNitric Oxide Synthase 2 (NOS2)の発現が亢進していた。

次に、GRP78と肝再生の関係を明らかにするために70%肝切除マウスモデルを用いて解析を行った。マウスに対して70%肝切除を施行すると術後12時間をピークとする血清GRP78の上昇を認め、切除肝の免疫染色では $\alpha$ -SMA (HSCマーカー)、F4/80 (KCマーカー)、M2BP、GRP78いずれも術後12時間をピークとする発現亢進を認めた。また、70%肝切除後にマウス腹腔内にGRP78を投与する

ことで、肝細胞のBrdU取り込みならびに肝再生率の亢進が観察された。GRP78が介在する肝再生でのKCの重要性を検証するために、クロドロン酸リポソームを用いて肝臓に存在するKCを枯渇させると、70%肝切除術後の血清GRP78が低下し肝再生も抑制された。しかし、このKC枯渇により引き起こされた肝再生抑制効果はGRP78投与により解除された。

最後に、GRP78と肝切除後肝不全/予後の関係を明らかにするために90%肝切除マウスモデルを用いて解析を行った。術後12時間での切除肝臓において90%肝切除群では70%肝切除群と比較し、F4/80（KCマーカー）、M2BP、GRP78のいずれも発現が亢進していた。また、90%肝切除術後にGRP78を投与することで、術後の生存率が有意に改善した。さらにGRP78投与群では術後12時間の肝再生率の改善を認め、切除肝臓での細胞増殖マーカーCyclinD1の発現増加、アポトーシスマーカーCaspase-3の発現低下を認めた。

#### 【考察】

これまでに活性化HSC/KC/GRP78を介した肝再生機序の報告はなく、我々は新たな肝再生因子としてGRP78を同定した。本研究により、1) 肝切除術後には活性化されたHSCよりM2BPGiが分泌、2) M2BPGiにより活性化したKCがGRP78を分泌、3) GRP78により肝細胞の増殖能が促進、という新たな肝再生分子機序を明らかにすることができた。

本研究ではGRP78投与により、90%肝切除術後の生存率が改善し、術後12時間後の残肝組織におけるアポトーシスマーカーCaspase-3の発現低下、細胞増殖マーカーCyclinD1の発現亢進を認めた。GRP78はHSP70ファミリーに属する分子シャペロンとして機能し抗アポトーシス効果（細胞死抑制効果）を持つことが知られている。これらの結果から、GRP78投与により、90%肝切除術後の肝臓では肝細胞死が抑制され、肝細胞増殖が術後早期に誘導されることで肝再生が促進し、その結果として肝切除後の生存率が改善したと考えられた。

GRP78にはHGFやIL-6といった多くの分泌型の肝再生因子と同様に肝細胞癌を含む腫瘍細胞への増殖促進効果が報告されている。そのため悪性腫瘍に対する肝切除術後の患者よりも、生体肝移植のドナーや非悪性腫瘍患者の肝切除術後の肝不全、劇症肝炎等に対する肝再生促進薬として使用が期待される。

#### 【結語】

本研究により、M2BPGiで活性化されたKCがGRP78を産生することで肝細胞の増殖ならびに肝再生を促進するという新規の肝再生分子機序を明らかにすることができた。また、GRP78投与という介入により90%肝切除後の致死的なマウスモデルにおいて生存率が改善したことから、GRP78が新規のhepatotrophic factorであり致死性肝不全の画期的な治療ツールとなることが期待される。