

学位論文題名

The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation

(生存シグナルである PI3-K/PDK1/Akt 経路は、肝細胞増殖よりもむしろ肝細胞サイズを制御して肝再生を促進する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

肝切除、生体肝移植などの外科的な処置によって、肝の容積は減少するが、その際残存した肝および移植片のすみやかな再生がきわめて重要である。つまり、これらの外科的治療は、効率よい物理的・機能的肝再生を期待して行なわれており、非常に重要な意味を持つ。

肝は他の臓器とは異なり、潜在的に非常に旺盛な細胞増殖能を有し、肝切除や様々な傷害が契機となり、肝細胞増殖によって肝を元の状態に回復させる。肝再生は、多くの因子により精密な制御を受けていると考えられ、これまで膨大な研究がなされてきている。ところが、正常状態および病的状態における肝再生の機序に関しては、その開始、維持および終止機構あるいは肝細胞障害との関連など、詳細なメカニズムはいまだ十分に解明されていない。Interleukin-6(IL-6)およびそのターゲット分子である Signal transducer and activator of transcription-3(STAT3)は、肝再生において重要な因子と考えられているが、それぞれ肝特異的 IL-6、STAT3 ノックアウト(KO)マウスをもちいた解析がなされてきた。肝特異的 IL-6-KO マウスでは、肝切除後の肝再生が損なわれるだけではなく、広範な壊死も引き起こされていた。一方、肝特異的 STAT3-KO マウスにおいては、肝切除後早期に細胞増殖能が著しく抑制されていたものの、代償的に細胞サイズの増大がみられ、質的・機能的な肝再生を維持していた。このとき、Akt およびその下流のシグナル (p70 ribosomal S6 kinase; p70^{S6K}, mammalian target of rapamycin; mTOR など) がより強く活性化することが示された。これらの結果から、何らかの理由で細胞増殖能が欠損された肝の再生において、これらの分子が主体的に関与して、代償的に肝再生を維持していることが示唆された。

これらのことから、PI3-K/PDK1/Akt 経路による切除後早期の肝再生への関与を明らかにする目的で、肝特異的 PDK1-KO マウスおよび STAT3 との double-KO マウスをもちいて解析を行なった。

【材料と方法】

アルブミンプロモーターで制御されている Cre-ricombinase 遺伝子および loxP 配列で標的遺伝子を挟み込んだ *Pdk1-flox* あるいは *Pdk1-flox/Stat3-flox* をそれぞれ導入したマウスを作成し、それらをかけ合わせて肝特異的 PDK1-KO マウスと肝特異的 double (*Pdk1/Stat3*)-KO(DKO)マウスを作成した。これらマウスは、左葉・中葉切除の 70%、も

しくは左葉切除の 30%部分肝切除の処置を行った後、生存期間を観察し、肝/体重量比により肝再生を評価した。肝切除後経時的に組織のサンプリングを行い、組織学的検討(H&E)、肝細胞増殖、肝細胞サイズ、アポトーシス、細胞内シグナル解析(以上 Western blot 法)などを評価した。また、アデノウイルスベクターにより遺伝子(PDK1-interacting fragment(pif)-pocket mutant; L155E, myr-p110)を導入し、肝特異的 KO マウスにおける肝切除後肝再生機序の解析をおこなった。

【結果】

肝特異的 PDK1-KO マウスをもちいて 70%肝切除実験を行ったところ、24 時間以内にその 2/3 が死亡した。また 30%肝切除実験を行ったところ、PDK1-KO マウスはすべて生存したものの、肝再生は抑制されていた。興味深いことに、この時肝細胞はコントロール群と同様に増殖を示したが、コントロール群との比較で肝細胞サイズはむしろ減少し、アルブミン合成能の低下および肝細胞傷害マーカー(血清中 GOT/GPT/LDH/T.Bil 値)の増加が起こっていた。さらに肝特異的 DKO マウスにおける 30%肝切除実験を行ったところ、肝切除後、細胞増殖はほぼ抑制されていたにもかかわらず、肝再生は PDK1-KO マウスと同程度に抑制されていた。

肝再生における細胞成長の重要性とそのメカニズムを詳細に検討するため、細胞内シグナル解析を行った。正常肝で起こっていた“生存シグナル”経路の主要分子である Akt, p70^{S6K}, S6 の活性は、PDK1-KO マウスにおいて予想通り抑制されていた。次に PDK1 から下流へのシグナルの重要性(主要経路)を検討するために、PDK1 の“pif-pocket”ドメインの mutant(L155E)を PDK1-KO マウスに導入した。これにより、肝再生時に PDK1-Akt にはシグナルを流すが、他の分子(p70^{S6K}, SGK)へのシグナルを遮断した。その結果、PDK1-KO+L155E マウスでは PDK1-KO マウスと比較して、Akt のリン酸化(Thr)は復活したが、細胞増殖には影響しなかった。しかし、肝細胞のサイズは有意に増大し、これによって肝再生も改善した。さらに、PDK1 の上流に位置する PI3-K の恒常活性型変異体である myr-p110 を PDK1-KO マウスに導入したところ、STAT3 が活性化され細胞増殖も増強されたが、細胞サイズの増大が起らず、肝再生の改善も認められなかった。

【考察】

これまでに、我々は肝特異的 STAT3-KO マウスにおける肝再生の解析を行い、STAT3 が肝再生にはエッセンシャルでないこと、すなわち肝再生には細胞増殖だけでは必要十分でないことを報告した。今回肝再生における、細胞増殖ではなく、細胞成長(細胞サイズ)の重要性を検討する目的で、肝特異的 PDK1-KO マウスおよび肝特異的 DKO マウスを作成し、解析した。

PDK1 のノックアウトにより、肝切除後の生存(70%肝切除)および肝再生(30%肝切除)に多大な影響がみられた。この結果により、PDK1 以下の経路が、肝再生を維持する上で必要不可欠な因子であることが示唆された。また、これらのシグナルは肝再生において肝細胞サイズに関与することが明らかとなり、細胞成長によって物理的・機能的な肝再生を維持していると考えられた。細胞増殖は肝再生において中心的な役割を果たしていると考えられていたが、この機能が何らかの原因で障害された場合、少なくとも PDK1/Akt のシグナルの活性化により、代償的に肝再生が維持されていると考えられた。PDK1 の下流経路は Akt と p70^{S6K} に代表されるが、この Akt のみへのシグナルを通した PDK1-KO+L155E マウスにおける肝再生は、肝細胞増殖能には影響を与えなかったものの、細胞成長を促すことによってコントロール群と同程度にまで肝再生を回復させた。このことから、肝再生に必須な PDK1 以下のシグナルのなかで、特に Akt は細胞成長を制御し、肝再生を維持する最も中心的な役割を果たしていることが示唆された。

【結論】

本研究では、肝切除後の急性期の肝再生において PDK1/Akt 経路と PI3-K/STAT3 経路は、それぞれ細胞成長と細胞増殖に主体的に関わっていることが明らかとなった。特に細

胞増殖能が障害されている肝の再生には、PDK1/Akt 経路による細胞サイズの制御（肝細胞機能維持）が極めて重要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 近江谷 克 裕
副 査 教 授 藤 堂 省
副 査 教 授 尾 崎 倫 孝

学位論文題名

The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation

(生存シグナルである PI3-K/PDK1/Akt 経路は、
肝細胞増殖よりもむしろ肝細胞サイズを制御して肝再生を促進する)

肝再生は、多くの因子により精密な制御を受けていると考えられ、これまで膨大な研究がなされてきている。ところが肝再生の機序に関して、その詳細なメカニズムはいまだ十分に解明されていない。これまでの研究で、細胞増殖性に働く STAT3 は、不可欠な分子でないことが示された。そこで本研究では、「生存シグナル」として知られる PI3-K/PDK1/Akt 経路の肝再生における役割について検討をおこなった。

肝特異的 PDK1-KO マウスでは肝切除後、細胞成長の抑制が原因で肝再生が起こっていない。さらに肝特異的 DKO (Stat3/Pdk1-KO) マウスにおける肝再生では、細胞成長・細胞増殖ともに抑制されていたが、肝再生不全は PDK1-KO マウスと同程度であった。また、PDK1 の上流に位置する PI3-K を強制的に活性化させると、細胞増殖は改善されたが、肝再生は回復しなかった。一方、PDK1 の下流について、PDK1-Akt の経路のみ回復させたところ、肝切除後の細胞成長が回復し、肝再生もコントロールレベルにまで回復した。

公開発表では学位論文内容発表の後、副査 畠山鎮次教授より、肝細胞が核分裂だけを起こし cell cycle arrest を起こしていた可能性、臓器の再生の際、細胞成長は一般的にみられるものなのか、また、それに細胞骨格が影響するのかについての質問があった。申請者はそれに対して、cell cycle arrest は、定量はしていないが、肝切片の観察から多核化細胞は少なくその可能性が少ないことを述べ、肝再生における細胞成長については、まず細胞増殖が必要で、細胞成長はバックアップとしての機能であるが必要不可欠であることを述べ、細胞骨格については、それよりも PDK1 経路の重要な機能の一つである「糖代謝」の影響により、グリコーゲン等の蓄積が原因した可能性を述べた。

次いで、副査 近江谷克裕教授より、PDK1-KO マウスの生理的な違いについて、アルブミン産生と細胞成長との関与の可能性について、そして、50%肝切除ではどのようになるかについての質問があった。また、細胞成長により肝機能が維持されていることを十分に示すためには、プロテオーム、メタボローム解析が必要であるという意見があった。申請者はこれに対し、生理的な違いについては、今回使用したマウスでは生理的な差が無かったが、摂食などの影響により糖代謝能での差が出る可能性があることを過去の報告をもとに回答し、アルブミンの関与については、グリコーゲン等の蓄積が原因した可能性を述べ、50%肝切除の影響に関しては、生存に関しては微妙なところだが、肝細胞サイズの影響が出る可能性が十分にあることを述べた。

次いで、副査 尾崎倫孝教授から、これまで肝再生において重要と考えられていた STAT3 と細胞増殖よりも PDK1-Akt シグナルと細胞成長が不可欠であるという新たな知見を得ることができ、非常に興味深い論文であるとの評価があった。また、この経路が代謝に深く関与している点で、糖尿病内科的な面からの研究の可能性についても示唆された。

次いで、主査 浅香正博教授から、肝再生時の肝機能として AFP 解析の有無について、また、この研究の臨床応用への可能性についての質問があった。これに対して申請者は、AFP の解析は今回行わなかったこと、また、PDK1/Akt が病変肝の移植や切除が必要となった場合の治療のターゲットとしての可能性を述べた。ただし、Akt は癌にも深く関与する分子であるため、このタンパクのインヒビターは多数報告されているが、inducer 等の報告は無く、現時点での薬剤としての可能性は難しいが、今後の創薬の際のターゲットにはなる可能性を示した。さらに申請者は、Akt 分子の活性を生体内で非侵襲的に観察できる光プローブの開発に着手しており、これは将来的に診断に応用できる可能性を述べた。

最後に、副査 藤堂省教授から、実際に肝再生には hepatrophic factor 等の影響が大きく、PDK1 が肝再生に重大な影響を与えていない可能性が示されたが、糖尿病などのターゲットとしての可能性はあり、臨床的な立場からの意見があった。

この論文は、非常に複雑な因子で制御されている肝再生のメカニズムを詳細に解析し、「生存シグナル」として広く知られていた PDK1/Akt 分子が肝再生において細胞成長という機能によって肝再生を維持し、さらに必要不可欠なシグナルであることをはじめて明らかにした点で高く評価される。また、この論文の研究は、将来的に肝臓外科分野の診断治療における応用が大いに期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。