

肝細胞増殖過程への転写因子 Nrf2 の関与

A possible role of Nrf2 in the process of hepatocyte proliferation

松本佳奈^{1,2)}

指導教員 梅村隆志^{1,2)} 研究協力者 石井雄二²⁾、高須伸二²⁾

1)ヤマザキ動物看護大学 動物看護学部 動物看護学科 動物病理学研究室

2)国立医薬品食品衛生研究所 病理部

キーワード：肝細胞増殖、Nrf2

【目的】 Nrf2 は、傷害や炎症によって引き起こされる酸化的ストレスから細胞を保護する役目を担い、抗酸化酵素群や異物代謝酵素群の発現を制御する転写因子である。以前の研究では、Nrf2 ホモ欠損マウスならびにその野生型マウスに部分肝切除を施すと、Nrf2 ホモ欠損マウスでは肝再生の遅延が生じるとの報告があり、Nrf2 の肝再生過程への関与の可能性が示唆されている。そこで本研究では、Nrf2 ホモ欠損マウスならびにその野生型マウスに 2/3 肝部分切除を施し、既報の観察期間より長期にその細胞動態ならびに細胞増殖関連蛋白の解析を実施した。

【方法】 10 週齢の雄 Nrf2 ホモ欠損マウスならびに野生型マウスを各群 5 匹に配し、2/3 部分肝切除を実施した。術後 0、6、24、48、96 および 168 時間に肝臓を摘出した。常法によりパラフィン切片を作製し、細胞増殖マーカーの PCNA の免疫染色を施した。PCNA の定量解析は顕微鏡下で行い、肝細胞 1000 個当たりの PCNA 陽性率として算出した。残りの肝臓については -80°C で保存し、その後、各肝臓サンプルを用いて STAT3、リン酸化 STAT3 (p-STAT3) の発現量を Western Blotting 法で検討した。内部標準として β -actin 用いた。さらに、IL-6 の mRNA レベルを RT-PCR により解析した。

【結果】 野生型マウスの PCNA 陽性細胞率は部分肝切除後 48 から 96 時間をピークに上昇し、168 時間後には減弱した。一方、Nrf2 ホモ欠損マウスの PCNA 陽性細胞率は、野生型マウスと同様に部分肝切除後 48 から 96 時間

をピークに上昇し、野生型では減弱が認められた 168 時間後においても PCNA 陽性細胞率は高値を維持した。(図 1) Western Blotting 法により、STAT3・p-STAT3・ β -actin のタンパク濃度を半定量解析した。その結果、STAT3 については、遺伝子型間で大きな差異は認められなかった。野生型マウスでは、p-STAT3 が部分肝切除後 48 時間で上昇し、ピークに達したのち 168 時間後には減少した。一方、Nrf2 ホモ欠損マウスでは野生型マウスと同様に部分肝切除後 48 時間で上昇がみられたが、168 時間では減少せず更なる上昇がみられた(図 2)。IL-6 の mRNA レベルは、野生型マウスでは STAT3 のリン酸化レベルの変動と一致した変化が認められた。一方、Nrf2 ホモ欠損マウスでは二峰性のピークが観察された。(図 3)

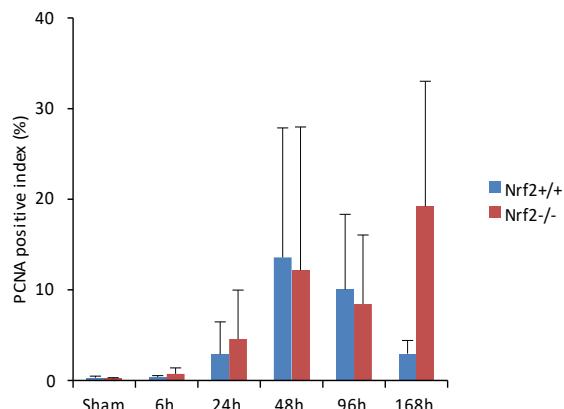


図 1 PCNA 陽性細胞率

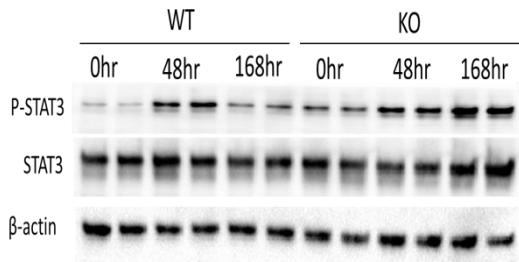


図 2 Western Blotting の結果

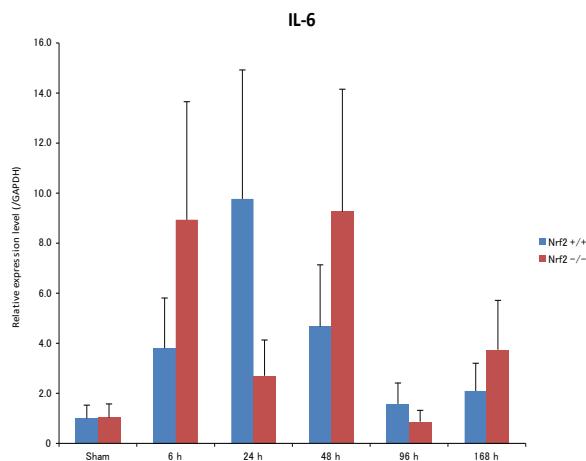


図 3 IL-6 の mRNA レベル

【考察】今回、Nrf2 ホモ欠損マウスとその野生型マウスで部分肝切除後肝臓の細胞動態を長期間比較した結果、Nrf2 ホモ欠損マウスでは肝再生が遅延しているのではなく、長期間にわたり細胞増殖活性の高い状態を持続していることが明らかとなった。肝切除後の肝再生初期に STAT3 の活性化が起こることが報告されていることから、今回、術後 48 時間と 168 時間の STAT3 のリン酸化状態を検索したところ、両遺伝子型マウスとともに 48 時間では STAT3 のリン酸化が亢進していたが、野生型ではその後、減弱が認められたのに対して、Nrf2 ホモ欠損マウスでは 168 時間後においても依然 STAT3 のリン酸化の亢進が観察された。野生型マウスにおいて細胞増殖活性と STAT3 リン酸化状態、さらにはその上流の IL-6 の mRNA レベルの変動が良く一致していたこと、Nrf2 ホモ欠損マウスではその

ような一致が観察されなかったことから、少なくとも肝再生過程における細胞増殖の ON/OFF 制御に Nrf2 が大きく寄与していることが明らかとなった。一方、Nrf2 ホモ欠損マウスで認められた IL-6 の mRNA レベルの二峰性ピークの意義は不明であるが、IL-6 が JAK-STAT 経路によって STAT3 をリン酸化させることを考慮して、今後は IL-6 の蛋白レベルの解析を加えて、発表する予定である。