

# AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:62-64.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 10) 肝細胞の再生性および腫瘍性増殖におけるMKK7の機能解析

大塩 貴子

10) 肝細胞の再生性および腫瘍性増殖における  
MKK7 の機能解析

研究代表者 大塩 貴子

【目的】

肝臓は再生能力の高い臓器として知られているが、様々な肝疾患においてその能力は障害される。肝疾患を治療する上で、肝再生のメカニズムを正確に把握することは重要であるが、肝細胞の増殖制御については不明な点が多く残されている。JNK-c-Jun 経路は細胞外からのストレスや炎症性サイトカインに応答し、細胞の増殖・生存・分化などを制御する。JNK の活性化には上流キナーゼである MKK7 と MKK4 が必須であり、これらのいずれかをマウスでノックアウト (KO) すると、肝発生不全により胎生致死となる<sup>1,2)</sup>。昨年、MKK4 発現をノックダウンすると肝傷害後の肝細胞増殖が著明に促進されることが報告されたが、この効果は MKK7 の活性化を介していると推定されている<sup>3)</sup>。本研究では、肝再生や組織修復における MKK7 の役割を検証するため、肝細胞特異的な MKK7 コンディショナル KO マウスを用いた解析を行った。

【方法】

MKK7 flox マウスと Mx1-Cre マウスを交配し、control マウス (MKK7<sup>flox/+</sup>, Mx1-Cre<sup>+/-</sup> もしくは MKK7<sup>flox/flox</sup>, Mx1-Cre<sup>+/-</sup>) と MKK7 KO マウス (MKK7<sup>flox/flox</sup>, Mx1-Cre<sup>+/-</sup>) を作製した。これらのマウスに poly(I:C) (250 μg) を 3 回ずつ隔日腹腔内投与することにより肝細胞特異的に MKK7 をノックアウトし、以下の実験を行った。control および MKK7 KO マウスの肝組織から RIPA buffer で抽出した蛋白質を電気泳動し、抗 MKK7 抗体および抗 β-Actin 抗体を用いて Western blotting を行った。初代培養肝細胞の増殖や 70% 部分肝切除 (PH) による肝細胞増殖を Ki-67 染色によって検討した。また、急性肝傷害に対する反応を調べるために、control および MKK7 KO マウスに四塩化炭素 (CCl<sub>4</sub>, 1 mL/kg) を皮下投与し、経時的に血漿中の alanine aminotransferase (ALT) の測定や肝組織の抗 phospho-c-Jun (Ser73) 抗体および抗 Ki-67 抗体による免疫染色と HE 染色を行った。

【結果】

poly(I:C) 投与後の control および MKK7 KO マウス

の肝組織を Western blotting で検討し、MKK7 KO の肝臓において MKK7 が効率よく KO されているのを確認した (図 1A)。MKK7 KO は健常で、肝組織像も control と同様であった。

*In vitro* での肝細胞増殖能を調べるために肝細胞を分離し、培養 1 日目から 4 日目における Ki-67 陽性細胞の割合を測定した。培養 2 日目から肝細胞の著明な増殖が見られ、3 日目にピークを迎えたが、その程度や経時変化に関して MKK7 KO マウスと control マウスの間に明らかな差は認められなかった (図 1B, C)。

*In vivo* での増殖能を検討するために 70% 部分肝切除を行い、その後 1 日目から 3 日目の体重当たりの肝重量 (図 1D) および Ki-67 陽性肝細胞の割合 (図 1E) を測定したが、MKK7 KO による影響は見られなかった。

急性肝傷害に対する反応を調べるために四塩化炭素を投与した。経時的に血漿中の ALT 活性を測定したが、MKK7 KO と control の値は同様であった (図 2A)。四塩化炭素投与による JNK-c-Jun 経路の活性化を調べるために抗 phospho-c-Jun 抗体を用いて免疫染色を行った。control 無処置肝では陽性肝細胞は見られなかったが、四塩化炭素投与 6-24 時間後に小葉中心部において多数の肝細胞に陽性像が観察された (図 2B)。MKK7 KO でも陽性細胞が小葉中心部に出現したが、染色の程度は control に比べ弱かった (図 2B)。Ki-67 陽性肝細胞の割合は、MKK7 KO と control で有意差は見られなかった (図 2C)。しかし、四塩化炭素投与 4 日目において、MKK7 KO 肝では control 肝に較べ小葉中心部の壊死組織がより多く残存する傾向が見られた (図 2D)。また、8 日後では control 肝は完全に修復されたが、MKK7 KO 肝では小葉中心部に炎症巣が散見された。

【考察】

Wuestefeld らは、MKK4 をノックダウンすると肝細胞の増殖が亢進することを見出し、そのメカニズムとして MKK4 の発現低下による MKK7 の活性化が重要であると報告している<sup>3)</sup>。しかし、我々の研究により、成体マウスにおいて MKK7 KO は肝細胞の増殖に影響しないことが明らかとなった。MKK4 ノックダウンによる肝細胞増殖亢進の原因は不明だが、我々の結果は MKK4 ノックダウンが JNK 以外の他の経路 (たと

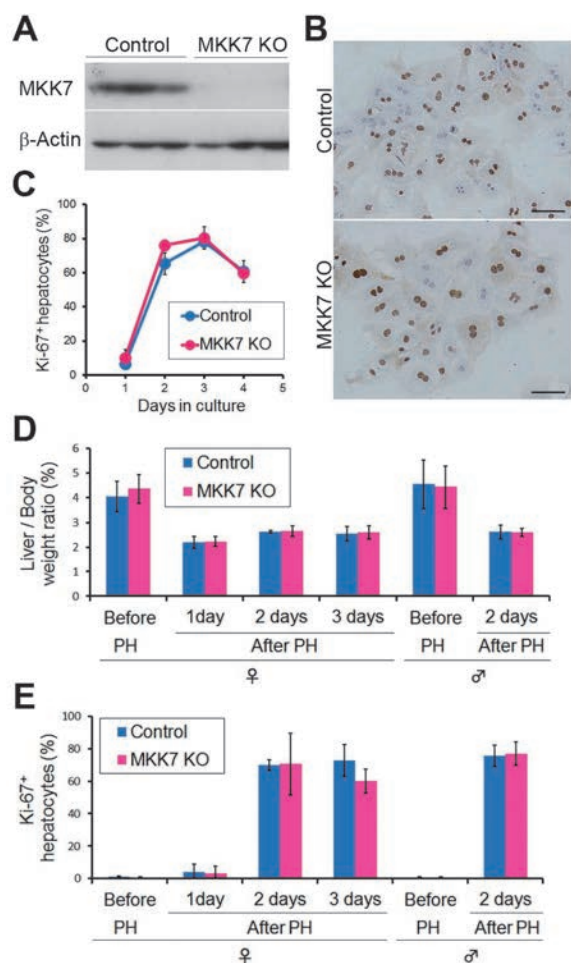


図1 肝細胞の増殖に MKK7 KO は影響しない。  
 (A) 肝から抽出した蛋白質液 (20  $\mu$ g) の Western blotting。 (B) 初代培養肝細胞の Ki-67 染色 (培養 2 日目)。 Scale bar: 50  $\mu$ m。 (C) 初代培養肝細胞の Ki-67 陽性細胞の割合。 (D) 70% 部分肝切除後の体重あたりの肝重量。 (E) 70% 部分肝切除後の Ki-67 陽性肝細胞の割合。

例えば p38 経路) を介して肝細胞増殖を促進した可能性を示唆している。また、MKK7 KO マウスは胎児肝細胞の増殖が顕著に抑えられることによって肝臓形成が阻害され、発生過程の肝細胞増殖には MKK7 が必須であることが報告されている<sup>2)</sup>。したがって、同じ肝細胞増殖でも、胎児期と成体期では、MKK7 に対する依存度が大きく異なることが明らかとなった。

これまでの embryonic stem cells や mouse embryonic fibroblasts を用いた解析において、MKK4 もしくは MKK7 のどちらかを KO すると JNK-c-Jun 経路が著しく阻害されると報告されていたが<sup>4)</sup>、四塩化炭素投与時の肝細胞 MKK7 KO による JNK-c-Jun 経路抑制効果

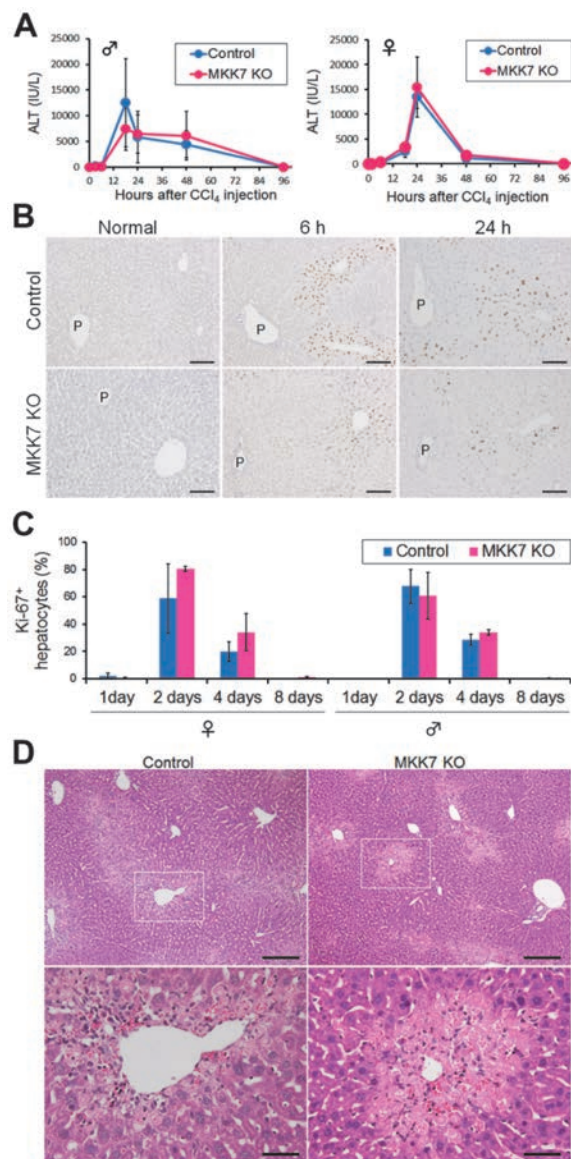


図2 MKK7 KO では四塩化炭素投与後の肝修復が遅延する。

(A) 四塩化炭素投与後における血漿中の ALT 活性。 (B) 四塩化炭素投与後の phospho-c-Jun 染色。 P: 門脈、Scale bar: 100  $\mu$ m。 (C) 四塩化炭素投与後の Ki-67 陽性肝細胞の割合。 (D) 四塩化炭素投与 4 日目の肝組織像 (HE 染色)。 下段は、上段の白樺部を拡大したもの。 Scale bar (上段): 200  $\mu$ m, (下段): 50  $\mu$ m。

は弱かった。これは細胞の種類によって JNK-c-Jun 経路活性化に対する MKK7 の影響度が異なることを示唆しており、肝細胞において強力なストレス刺激が入ると、MKK7 以外のキナーゼが代償的に JNK をリン酸化し、MKK7 が無くても JNK-c-Jun 経路が活性化されると推察された。

今回の研究により、MKK7は肝傷害に対する肝組織修復に関与していることを見出した。肝傷害後の肝再生には、肝細胞の再生性の増殖だけではなく、炎症、死細胞の除去、細胞外マトリックスの再構築、肝細胞の移動など多くのステップが関与していると推察される。興味深いことに、神経特異的にMKK7もしくはMKK4をKOすると、大脳皮質ニューロンの移動能が低下するとの報告がある<sup>5,6)</sup>。また、我々はMKK7 KO肝細胞凝集塊をコラーゲンゲル内に包埋し、胆管上皮様に分化させると、樹枝状の細胞突起形成がcontrolに比べて抑制されることも明らかにしている。MKK7 KOにおける肝修復の遅延は、生き残った肝細胞の傷害部への移動が抑制されるためである可能性を考慮し、*in vitro*での創傷治癒アッセイやマトリゲル浸潤アッセイを行い、MKK7が肝細胞の運動能に寄与しているのかを検討したい。さらに、四塩化炭素やチオアセトアミドの連続投与によって肝線維化や肝硬変と共に肝腫瘍を誘導し、MKK7 KOが腫瘍形成や肝腫瘍増殖に影響するかも明らかにしていきたい。

## 【文 献】

- 1) Ganiatsas S et al.: SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 6881-6886 (1998)
- 2) Wada T et al.: MKK7 couples stress signaling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 3, 215-226 (2004)
- 3) Wuestefeld T et al.: A direct *in vivo* RNAi screen identifies MKK4 as a key regulator of liver regeneration. *Cell.* 153, 389-401 (2013)
- 4) Asaoka Y et al.: Diverse physiological functions of MKK4 and MKK7 during early embryogenesis. *J Biochem.* 148, 393-401 (2010)
- 5) Yamasaki T et al.: Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J Neurosci.* 31, 16872-16883 (2011)
- 6) Wang W et al.: Targeted deletion of the mitogen-activated protein kinase kinase 4 gene in the nervous system causes severe brain developmental defects and premature death. *Mol Cell Biol.* 27, 7935-7946 (2007)