



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 肝再生機構におけるDiacylglycerol kinaseの機能解析 [論文内容及び審査の要旨]                                                       |
| Author(s)           | 中本, 裕紀                                                                                                  |
| Description         | 配架番号 : 2940                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第16549号                                                                                                |
| Issue Date          | 2025-06-30                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/95845">https://hdl.handle.net/2115/95845</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | NAKAMOTO_Hiroki_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                   |



## 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称      博士（医 学）                      氏 名      中本 裕紀

### 学 位 論 文 題 名

肝再生機構における Diacylglycerol kinase の機能解析  
(Studies of diacylglycerol kinase in liver regeneration mechanism)

#### 【背景と目的】

肝腫瘍に対して肝切除術を行う際、腫瘍の局在・体積によっては切除限界を超える切除量を必要とする場合があるが、このような症例に対しては致死性の肝不全回避のため門脈塞栓術や肝離断を加えた二期的肝切除(ALPPS)など肝再生を前提とした治療法が行われている。しかし、これらの治療を用いても十分に残肝体積の増大が得られない例もあり、新しい肝再生治療戦略が求められる。当教室では悪性腫瘍の増殖・進展における DGK  $\alpha$  の関与について研究を行ってきたが、その細胞内機能から DGK  $\alpha$  は肝再生にも関与することが予想される。本研究は肝再生機構における DGK  $\alpha$  の関連性を検討し、そのメカニズムを解明するとともに新しい肝再生治療開発に資する科学的エビデンスを構築することを目的として計画した。

#### 【方法】

C57BL/6 雄性野生型マウスおよび雄性 DGK  $\alpha$  KO マウス8～12 週齢を使用し、古典的な肝部分切除 (PH)モデルである Higgins&Anderson モデルに習い、マウス肝臓の中葉・左葉を切除する 70%PH を施行した。野生型マウスでの DGK  $\alpha$  分子の動態、また両者のマウスでの生存率、肝再生率、血液検査データ、組織学的所見の比較・解析を行った。肝 total lysate 組織での定量 PCR・ウェスタンブロットを行い、各種 mRNA・蛋白発現状況の解析を行った。またクロマトグラフィで肝ホモジナイズ組織の ATP・AMP・ADP を測定し Energy Charge を算出した。肝組織を phalloidin 蛍光免疫染色による細胞骨格染色を行い 70%PH 後の細胞肥大について検討を行った。死亡原因の検索として血清エンドトキシン濃度を測定し比較・検討を行い、肺組織についても観察を行った。DGK  $\alpha$  KO マウスに抗酸化物質ビタミン C 投与下で 70%PH を施行し、死亡率や肝再生率が改善されるか検討を行った。さらには in vitro の検討として、マウス耳組織から Fibroblast を初代培養し、増殖刺激下での肝再生関連 mRNA 群の変化・動態について解析を行った。

#### 【結果】

70%PH モデルは learning curve が十分に安定し、野生型マウスにおいて既報の 70%PH 後肝再生率曲線の再現性を確認した後に各種解析に進んだ。野生型マウスでは、70% PH 後に DGK  $\alpha$  mRNA 発現量は一時的に低下し、肝再生が完了する day7 に向けて回復した。DGK  $\alpha$  KO マウスを用いた検討では、70%PH 後 day7 までに約 40%の高い死亡率を示し、肝再生率は野生型マウスに比べ低く、高肝胆道系酵素、低アルブミン血症と関連していた。また DGK  $\alpha$  KO マウスは 70%PH 後 PAS 染色でグリコーゲン貯留およびインスリン抵抗性の増大を認めた。HE 染色像で小滴性脂肪滴沈着像を認め、小滴性脂肪滴を強く認める個体は高肝胆道系酵素、低アルブミン血症と関連していた。定量 PCR では脂質消費遺伝子群の mRNA 低下を認め脂質利用障害が示唆された。クロマトグラフィによる解析では DGK  $\alpha$  KO マウスで有意に Energy Charge 低下を認め死亡原因の一つと推察された。また DGK  $\alpha$  KO マウスは 70%PH 後に酸化ストレスマーカー貯留像を認め肝再生過程において非代償状態となっている可能性が示唆された。Phalloidin 蛍光免疫染色による細胞骨格染色では DGK  $\alpha$  KO マウスは PH 後に肝細胞肥大障害を認め、

グリコーゲン・脂質消費障害の一因と考えられた。細胞肥大障害の原因を検索したところ、サイクリン D の mRNA・蛋白発現が低下しており、細胞肥大障害の原因と考えられた。サイクリン D の上流カスケードである mTORC1 や ERK シグナル分子は免疫染色やウエスタンブロットによる解析において活性が亢進していた。血清エンドトキシン濃度を測定すると DGK  $\alpha$  KO マウスにおいて陽性率が高く、死亡原因の一つとして高エンドトキシン血症が挙げられた。肺組織は DGK  $\alpha$  KO マウスにおいて肉眼的に出血を疑う赤色斑を認め、組織染色では細気管支内に出血を示唆する赤血球凝集像を認めた。ビタミン C 併用下での DGK  $\alpha$  KO マウスへの 70%PH では、非投与群に比して死亡率のさらなる上昇を認め、低肝再生率や低アルブミン血症を認めた。抗酸化ストレスマーカーは非投与群に比してさらなる増大を認めた。Fibroblast への FBS 刺激実験では、野生型マウス・DGK  $\alpha$  KO マウス由来の細胞群間において cyclinD1、p21、PCNA などの細胞周期関連マーカーの mRNA 量に有意差は認めなかった。

#### 【考察】

Lutkewitte らはマウスへのアセトアミノフェン投与による肝障害モデルにおいて、PA の増加と DGK  $\alpha$  mRNA 発現低下を認めたと報告しており、野生型マウスにおける 70%PH 後の DGK  $\alpha$  mRNA 低下は蛋白質レベルでの活性化亢進によるネガティブフィードバックの可能性が想起された。また Nakatani らはウサギに対して 70%PH を施行し、エネルギーチャージ低下のピーク時に最も個体死亡が顕著になることを報告している。本研究においても DGK  $\alpha$  KO マウスで 70%PH 後に Energy charge が有意に低下しており、個体死亡の一因で推察された。野生型マウスでは PH 後 16h 程まではグリコーゲンをエネルギー源として消費し、その後は必要であれば脂質消費にスイッチし肝再生に必須なエネルギーを供給している。本研究では DGK  $\alpha$  KO マウスにおいてグリコーゲン・脂質消費障害を示す所見を認め、Energy Charge 低下の原因となっていると思われる。肝細胞肥大は肝再生過程において最も初期に起きる急性応答動態であるが、DGK  $\alpha$  KO マウスでは 70%PH 後に有意に平均細胞面積が低下しており細胞肥大障害が示唆され、この細胞肥大障害がエネルギー産生障害と関連している可能性が考えられた。さらに、細胞肥大障害の原因としてサイクリン D の発現低下が関連しているものと推察された。サイクリン D の上流に位置し、DGK による産生物である PA の結合部位を持ち、正に細胞周期を制御する mTORC は免疫染色において DGK  $\alpha$  KO マウスで活性化を示唆する所見を認め、サイクリン D 発現低下によるネガティブフィードバックが示唆された。今後 DGK  $\alpha$  とサイクリン D 発現についての関連性を in vivo、in vitro 両面において詳細に解析・研究していくことが望ましいと考える。

#### 【結論】

DGK  $\alpha$  KO マウスにおいて 70%PH 後に各肝再生過程の遅延・障害を示す所見を認め、また高死亡率を示したことから、DGK  $\alpha$  は肝再生過程において個体存続に必要なレベルで重要な分子であることが示唆された。DGK  $\alpha$  KO マウスでは 70%PH 後に肝細胞肥大障害を生じ、Energy Charge 低下の原因と成り得るグリコーゲン・脂質利用障害の所見を認めた。細胞肥大障害の主要な原因としてはサイクリン D 発現低下が考えられ、その詳細な関連性については今後の詳細な解析・研究が必要である。