

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	本望 聡
<p>学位論文題目</p> <p>Low activity of stress activating kinases in DRH rat hepatocytes in primary culture (初代培養 DRH ラット肝細胞における stress activating kinases の低活性化)</p> <p>共著者名 尾崎 篤子、山本 雅大、吉江 真澄、玉川 進 徳差 良彦、柳沼 裕二、小川 勝洋</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>DRH ラットは、クローズドコロニーである Donryu ラットに 3'-Me-DAB を投与し、肝癌を誘発した際に肝発癌耐性のものを選択して兄妹交配を 20 代以上繰り返す事によって得られたもので、親系の Donryu ラットに比較して約 10 倍の肝発癌耐性を示す。DRH ラットはさまざまな肝発癌物質による肝発癌に対して耐性を示すだけでなく、dimethylbenz(a)anthracene による乳癌の発生に対しても耐性を示す。肝発癌耐性は優性形質として遺伝し、第 1、4 染色体上の 2 つの遺伝子座が肝発癌耐性に深くかかわっていることが報告されているが、その詳しいメカニズムは分かっていない。</p> <p>DRH ラットに肝発癌物質を投与すると、肝組織障害の程度が Donryu ラットに比べ弱いことから、DRH ラット肝細胞は肝毒性物質によるストレスに対して耐性であると考えられる。一方、生体から分離した細胞を培養することは、細胞にとって著しいストレスになることが知られている。DRH ラット肝細胞については肝発癌物質に対する反応についての報告は多数あるが、薬物以外のストレスに対する反応についてはこれまで報告がない。</p> <p>本研究では DRH, Donryu ラットから分離した肝細胞の初代培養を行い、両者の増殖・生存能、酸化的ストレスの程度、抗酸化障害能を比較した。さらに初代培養肝細胞では培養開始直後からさまざまな増殖・ストレスキナーゼ活性が変動することから、これらについても検討した。</p>			

## 材 料・方 法

**実験材料**; 生後 9 週齢の雄性 DRH 及び Donryu ラット肝細胞をコラゲナーゼ還流法により分離し、10% FBS、insulin、EGF、dexamethasone、aprotinin 添加 Williams' E 液にて 7 日間培養した。

**細胞数及び形態**; 生細胞数は MTT 法にて測定し、apoptosis 細胞数は DAPI 染色後、蛍光顕微鏡観察により測定した。細胞サイズはデジタルカメラで細胞を撮影し、最大細胞径を計測した。

**免疫染色**; 細胞培養液に BrdU を添加し、1 時間後に PBS 洗浄・ホルマリン固定し、抗 BrdU 抗体により免疫染色を行い、顕微鏡下で BrdU 陽性細胞を観察して S 期細胞の割合を測定した。また、培養細胞を Carnoy 液で 2 時間処理後、酸化的 DNA 障害の指標である 8-hydroxyguanine (8-OHG) に対するモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。一次抗体の検出は Histofine kit を用いて ABC 法にて行った。

**全 antioxidant 活性**; 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) と luminol を混合し、さらに DRH または Donryu ラット肝 homogenates を加えて、シンチレーションカウンターにて発光抑制を指標として全 antioxidant 活性を比較した。

**8-OHG の定量**; 培養肝細胞から総 DNA を抽出して加水分解を行った後、ELISA kit を用いて 8-OHG 量を測定した。ELISA plate は発色後、マイクロプレートリーダーにて 450nm の吸光度を測定した。試料中の 8-OHG 濃度は標準曲線から計算した。DNA の酸化を防止するために DNA 抽出、加水分解中はアルゴンガス存在下で行った。

**Western blot**; 培養肝細胞から総蛋白を抽出して SDS-PAGE をおこなった後、ニトロセルロース膜に blotting し、細胞周期関連蛋白および増殖・ストレスキナーゼ蛋白に対する一次抗体を反応させ、2 次抗体として抗 mouse 又は抗 rabbit-HRP 標識抗体を用いて ECL plus kit により検出した。

**ASK1 activity**; HA 標識 ASK1 cDNA および His 標識 MKK3 cDNA を lipofectin を用いて 293 細胞に導入し強制発現した後、HA-ASK1, His- MKK3 蛋白を回収・精製した。これらの蛋白を  $^{32}\text{P}$ -ATP 存在下で incubate し、反応物を SDS-PAGE をおこなった後、オートラジオグラフィーにて  $^{32}\text{P}$  標識 MKK3 を検出した。さらにこの反応系に DRH および Donryu ラットの肝可溶性蛋白を様々の濃度で加え、反応の抑制の程度を比較した。

## 成績

**細胞形態及び細胞数の変化;**細胞形態は、DRH、Donryu 共に培養開始後より細胞質が拡大し、多核化する傾向が見られた。しかし、その程度は DRH ラット肝細胞の方が軽度で、平均細胞長径は Donryu ラット肝細胞に比べ約 80%程度であった。生細胞数については、Donryu ラット肝細胞は培養開始直後に急激な減少を示した後、若干の増加傾向を示したのに対して、DRH ラット肝細胞は緩徐に減少し、増加傾向は認めなかった。さらに S 期細胞数は DRH、Donryu ともに培養開始 3 日目にピークを示したが、ピークの高さは DRH では Donryu のおよそ半分であった。一方、apoptosis 細胞数は培養開始 1-3 日目にピークを示したが、こちらもピークの高さは DRH では Donryu のおよそ半分であった。

**細胞周期調節蛋白発現;**cdk4 は DRH、Donryu ともに培養開始時から持続的に発現しており 3-5 日目でやや発現亢進が見られた。cdk2 は両者で培養開始時から発現していたが、2-3 日以後、減少した。cyclin D は培養開始時にはともに陰性で、Donryu では 2-3 日目で著明な発現亢進が見られたが、DRH ではごくわずかの発現しか見られなかった。Cyclin E についてははじめはともに陰性で 2-5 日目に同程度の発現が見られた。p27<sup>Kip1</sup>については両者ともに培養開始時から持続的に高く発現していた。

**全 Antioxidant 活性;** Donryu ラット肝 homogenates に比べ、DRH ラット肝 homogenates では antioxidant 活性がやや高い傾向を認めたが、有意な差は認めなかった。

**8-OHG;** 8-OHG 免疫染色では培養開始 2 時間目から DRH、Donryu ともにほぼすべての核に陽性反応が見られ、その後次第に減弱し 2 日目以後では陽性像は僅かであった。ELISA 法による定量では、ともに培養開始 1 2 時間でピークを示し、1 日後には正常レベルに低下した。

**増殖・ストレスキナーゼの活性化;**EGF レセプターの発現は両者で変わりなく、リン酸化 EGF-R はともに培養開始直後から 1 日目までに徐々に低下した。p38, JNK の上流の MAPKKK である ASK1 は total、リン酸化のいずれについても違いは見られなかったが、MAPKK である SEK および MKK3 については total では違いがないものの、リン酸化の程度は Donryu ラット肝細胞に比して DRH ラット肝細胞では明らかに低下していた。全 Erk1/2、p38、JNK 蛋白の発現については両者に差は認めなかった。しかし、リン酸化蛋白については Donryu ラット肝細胞では培養開始直後から Erk1/2、p38、JNK の全てがリン酸化され、一度減衰した後、3-5 日目に再び Erk1/2 と p38 が強くリン酸化された。一方、DRH ラット肝細胞では Erk1/2 が弱くリン酸化されているものの、p38 と JNK はほとんどリン酸化されていなかった。

**ASK1 活性;** ASK1 およびその特異的基質である MKK3 を <sup>32</sup>P-ATP 存在下で incubate したところ、MKK3 のリン酸化が見られた。この反応系に DRH の肝可溶性蛋白を加えたところ濃度依存的に MKK3 のリン酸化が抑制されたが、Donryu の肝可溶性蛋白ではそのような抑制はまったく見られなかった。

## 考 案

本研究では肝発癌耐性 DRH ラットと、その親系である Donryu ラットから分離した肝細胞を EGF、insulin の存在下で初代培養を行い、両者を比較した。Donryu ラット肝細胞は培養開始後一時的に生細胞数が減少しその後徐々に増加したが、これはアポトーシスによる細胞死が起こる一方、細胞が増殖する為に両者の積算した結果を反映したものと考えられた。一方、DRH ラット肝細胞では細胞増殖、細胞死の程度が低く、また、細胞伸展の程度も弱く、Donryu ラット肝細胞とは明らかな違いを示した。

細胞周期調節蛋白については、Donryu ラット肝細胞では培養開始後 2-3 日目に cyclin D の強い発現を認めたのに対し、DRH ラットではわずかな発現しか見られなかった。一方、cdk2、cdk4 の発現は両者に違いはなく、cdk インヒビターである p27<sup>Kip1</sup> の発現量にも差は認めなかったことから、DRH ラット肝細胞の増殖反応が低かった理由は cyclin D の低発現によるものと考えられた。したがって、DRH ラット肝細胞では増殖刺激による cyclin D の誘導に関わるシグナル伝達経路に関して、Donryu ラット肝細胞と違いがあると考えられた。

一方、細胞は培養下では酸化ストレスを受け、DNA 中のグアニンの 8 位が酸化され、8-OHG を生じることが知られている。しかし、両者で培養開始直後に一時的な 8-OHG の上昇を認めるものの、1-2 日以内には共に正常化した。また、全 antioxidant 活性においても両者に有意な差は認めなかった。したがって、両者は同程度の酸化ストレスを受け、さらには同程度の DNA 修復能を持つと考えられ、DRH 及び Donryu ラット肝細胞の増殖能、及びアポトーシスの頻度の違いは DNA 障害の程度の違いによるものではないことが示唆された。

DRH ラット肝細胞では Erk1/2 のリン酸化は Donryu ラット肝細胞に比べてやや低い程度であったが、ストレスキナーゼである p38、JNK のリン酸化は Donryu ラット肝細胞に比べて著しく低かった。p38、JNK の上流の MAPKKK である ASK1 は両者で同程度リン酸化されているにもかかわらず、その下流の MAPKK である SEK1 及び MKK3 以降のリン酸化では両者で差が認められたことから、p38 と JNK の低活性化は MAPKKK レベルでの活性抑制によることが明らかになった。MKK3 を基質とした ASK1 活性を測定する反応系に DRH もしくは Donryu ラットの肝可溶性蛋白を加えたところ、DRH ラットでは濃度依存的に MKK3 のリン酸化が抑制されたが、Donryu ラットではその様な抑制は認められなかった。したがって、DRH ラット肝細胞内には ASK1 活性に対する inhibitor が存在することが明らかになった。

ヒト肝癌は慢性肝炎や肝硬変を背景として発生することや、化学発癌物質による動物肝発癌モデルにおいても慢性肝障害を伴うことから、肝発癌では持続的な肝障害による増殖刺激が発癌プロモーターとして働くと考えられる。今回の結果から、DRH ラット肝細胞は Donryu ラット肝細胞と同程度のストレスを受けても、ストレスキナーゼ経路の活性化が Donryu ラット肝細胞ほど起こらず、その為に細胞死及び増殖が阻止されていることが示唆された。このことは、DRH ラットでは *in vivo* において持続的な肝発癌物質投与を行っても肝細胞の壊死が起こらず、その結果として肝全体の持続的な障害—再生反応が起こらないことと関係していると考えられ、そのことが肝発癌耐性に関わっていると考えられる。





## 結 論

DRH ラット肝細胞では初代培養下で正常ラット肝細胞で見られる p38、 JNK ストレスキナーゼの活性化が起こらない。この理由はストレス下で p38、 JNK 経路の上流の MAPKKK である ASK1 のリン酸化は起こるが、その活性を強く抑制する因子が存在するためと考えられる。

## 引用文献

1. Ichijo H, Nishida K, Irie K, Dijke P, Saitoh T, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, and Gotoh Y. *Science* 275: 90-94, 1997.
2. Zeng Z-Z, Higashi S, Kitayama W, Denda A, Yan Y, Matsuo K, Konishi Y, Hiai H, and Higashi K. *Cancer Res* 60: 2876-2881, 2000.

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	本 望 聡
<p>審査委員長 <u>葛西真一</u> </p> <p>審査委員 <u>小川 隆洋</u> </p> <p>審査委員 <u>奥村 利勝</u> </p> <p>審査委員 <u>谷口 隆信</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Low activity of stress activating kinases in DRH rat hepatocytes in primary culture</b>            (初代培養 DRH ラット肝細胞における stress activating kinases の低活性化)</p>			
<p>DRH ラットは、Donryu ラットに 3'-Me-DAB を投与して肝癌を誘発した際に、肝発癌耐性のものを選択して交配を繰り返す事によって得られたもので、著しい肝発癌耐性を示す。しかし、DRH ラットの肝発癌耐性の詳しいメカニズムは未だ分かっていない。一方、細胞培養は細胞にとって強いストレスになり、初代培養肝細胞では ERK などの細胞増殖に関わるシグナル伝達経路の他に、p38、JNK などのストレスキナーゼが活性化することが知られている。本研究でははじめに肝発癌耐性 DRH ラットと、その親系である Donryu ラットから分離した肝細胞を EGF、insulin の存在下で初代培養を行い、増殖能、形態変化及びアポトーシスについて比較した。その結果、DRH 肝細胞は Donryu 肝細胞よりも増殖能及びアポトーシスの程度が低く、また細胞伸展の程度が低いことが判明した。しかし、DNA 中の 8-OHG には両者で違いが無く、同程度の酸化ストレスを受けていると考えられた。次に両者の増殖・ストレスキナーゼ活性について検討したところ、ERK1/2 のリン酸化については両者で大きな違いは見られなかったのに対して、p38、JNK のリン酸化は DRH 肝細胞では著しく低かった。また p38、JNK の上流の MAPKKK である ASK1 は両者で同程度にリン酸化されているにもかかわらず、その</p>			

下流の MAPKK である SEK1 及び MKK3 以降のリン酸化で差が見られたことから、p38 と JNK の低リン酸化は MAPKKK レベルでの抑制によると考えられた。さらに MKK3 を基質とした ASK1 の活性測定系に DRH もしくは Donryu の肝 lysate を加えたところ、DRH では濃度依存的に ASK1 活性が抑制されたのに対し、Donryu ではその様な抑制は認められなかった。以上の結果から、DRH 肝細胞には ASK1 活性に対する inhibitor が存在することが明らかになった。

本論文は DRH 肝細胞は培養化でストレス耐性を示し、その原因がストレスキナーゼ抑制因子をもつことによることを示したものである。これらはまったく新しい発見であり、DRH ラットの肝発癌耐性のメカニズムを解明する上で重要な知見をもたらした。また、論文提出者に対する諮問審査においても適切な回答がなされ、本論文提出者は関連分野に関する十分な知識を有していると認められた。よって本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値するものと判断した。