

論文の内容の要旨

論文題目：初代培養肝細胞におけるノルエピネフリンによる Smad7発現
を介するアクチビンシグナリング抑制の細胞内機序

指導教官：藤田 敏郎

東京大学大学院医学系研究科
平成 10 年 4 月入学
医学博士課程
内科学専攻
金丸 千穂

肝再生時には様々なサイトカインや増殖因子が発現しその形態の維持がなされている。肝再生開始にあたる G0~G1 への移行期には NF- κ B (nuclear factor κ B)と STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3)が必須の因子で、それ以降、G1 期の肝細胞は再生促進因子である EGF (epidermal growth factor), HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor), TGF α (transforming growth factor α), HGF (hepatocyte growth factor) に反応して S 期に移行して DNA 合成が行われるようになる。また再生抑制に働くものとして、TGF- β スーパーファミリーに属する TGF- β (transforming growth factor β)とアクチビンがある。

これら TGF- β スーパーファミリーの細胞内情報伝達の一因として近年 Smad という新しい分子群の存在が明かとなってきた。TGF- β やアクチビンはまず II 型受容と結合し、II 型受容体は I 型受容体と会合しこれをリン酸化してそのキナーゼを活性化する。活性化した I 型受容体は細胞質に存在する Smad2,3 などのリガンド特異的な Smad をリン酸化する。リン酸化部位をもたない Smad6,7 は抑制型 Smad として negative feedback 因子として働いていると考えられている。リン酸化された Smad2,3 は共有 Smad の Smad4 と会合して核内へ移行し、さらに STAT などの蛋白と複合体を形成して DNA

と結合して、転写因子複合体として作用すると考えられている。

肝再生時に働く物質にはこれらとは別に、自身では DNA 合成促進作用は持たず、増殖因子の存在下でその作用を強めたり、増殖抑制因子の作用を弱める Co-mitogen と呼ばれるものがある。ノルエピネフリンは、こうした Co-mitogen としての作用は知られていたが、その細胞内のシグナル伝達機序は明らかにされていなかった。本研究ではノルエピネフリンの作用には Smad7 の発現が関与していることを明らかにし、その発現誘導の機序を検討した。

まず、肝再生時のノルエピネフリンの作用を確認した。EGF/インスリンにより誘導される初代培養肝細胞の DNA 合成促進はアクチビンによって強力に抑制されるが、培養開始日にノルエピネフリンを添加すると、アクチビンの作用は既報のように抑制された。

次に TGF- β ファミリーの細胞内シグナリング因子である Smad 系へのノルエピネフリンの関与を検討した。Smad2/3 の核への移行を抗 Smad2/3 抗体を用いて蛍光顕微鏡下に観察することにより Smad 蛋白の活性化を検討した。培養 2 日目の無添加の細胞は細胞質が顆粒状に染色され、核は核小体のみが染色された。10nM のアクチビン添加により 90%の細胞で核移行が観察されたが、無血清培養開始時より 10 μ M のノルエピネフリンを添加した群では 28%まで抑制された。また、より定量的に検討するため、核抽出液を用いて、抗 Smad4 抗体によるウエスタンブロッティング法を行った。アクチビン添加 24 時間前にノルエピネフリンを加えると Smad4 の核移行は強力に抑制された。これらのことから、ノルエピネフリンは Smad 蛋白の活性化を抑制すると考えられた。

I 型受容体による特異型 Smad の活性化は、抑制型 Smad により阻害される。そこでノルエピネフリンによる抑制型 Smad の発現を検討した。ノルエピネフリンによる抑制型 Smad の mRNA の発現を RNase protection assay で検討すると、添加後 30 分から 3 時間まで Smad7 の発現が認められたが、Smad6 の発現は認められなかった。さらにアデノウイルスにより Smad7 遺伝子を初代培養肝細胞に導入し、アクチビンの DNA 合成抑制作用が Smad7 の発現増強によりどのように影響されるか検討した。感染コントロールとして LacZ 遺伝子を用いた。Smad7 遺伝子導入により、アクチビンの DNA 合成抑制作用は、LacZ 群と比較して強力に抑制された。以上よりノルエピネフリンにより抑制型 Smad である Smad7 の発現が起こり、アクチビンシグナリングが阻止されると考えられた。

次にノルエピネフリンによる Smad7 発現誘導機序を検討した。Smad7 プロモーター領域には κ B サイトが複数存在する。また最近、ある種の細胞系では、TNF- α や CD40 刺激により Smad7 発現が NF- κ B 活性化を介して誘導され、TGF- β シグナリングがブロックされることが報告されている。そこでノルエピネフリンにより NF- κ B 活性化が起こるかを、EMSA 法により検討した。ノルエピネフリン刺激後 30 分から 60 分にかけて NF- κ B 活性化を示すバンドが認められた。これは 100 倍の cold probe 添加により、ほぼ完全に消失する特異的バンドで、また抗 p65 抗体添加により supershift が認められた。次に NF- κ B 活性化と Smad7 発現誘導の関連を RNase protection assay で検討した。NF- κ B 阻害剤である N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) と pre-incubation した肝細胞にノルエピネフリンを添加すると NF- κ B 活性化、Smad7 発現誘導共に抑制された。さらに NF- κ B 活性化をより特異的に阻害するため dominant negative I κ B アデノウイルスを肝細胞に感染させて、ノルエピネフリン投与下の NF- κ B 活性化や Smad7 の発現を検討したところ、dominant negative I κ B 感染細胞では NF- κ B の活性化、Smad7 の発現も共に認められなかった。

これらのことより、初代培養肝細胞において、ノルエピネフリンは NF- κ B の活性化を介して Smad7 を発現誘導し、アクチビンシグナリングを抑制している可能性があることが示唆された。