

審査の結果の要旨

氏名 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。その中で、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。本研究ではその機序を検討し、以下の結果を得ている。

1. 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、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と同様に抑制された。
2. アクチビン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。特異型 Smad の 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。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、共有型 Smad の Smad4 へのノルエピネフリンの関与については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。
3. 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、Smad7 の発現が認められたが、Smad6 の発現は認められなかった。
4. 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。Smad7 遺伝子導入により、アクチビンの DNA 合成抑制作用は、感染コントロールの Lac-Z 群と比較して強力に抑制された。

5. 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。ノルエピネフリンにより NF- κ B 活性化が起こるかを EMSA 法により検討したところ 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。
6. 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。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。

以上、本論文は初代培養肝細胞において、ノルエピネフリンは NF- κ B 依存性に Smad7 の発現を誘導し、内因性のアクチビンの作用を抑制して co-mitogen 作用を発揮していることを明らかにした。つまり TGF- β スーパーファミリーの主要な細胞内シグナル伝達蛋白である Smad 系と、三量体 G 蛋白のシグナリングとの新しい経路のつながりを示したこととなり、今後の細胞内シグナル伝達機構の解明の一助となると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。