

## 論文の内容の要旨

論文題目 肝星細胞における HGF 産生に対するアミノ酸の影響

指導教員 小俣政男教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 西川尚子

肝硬変患者では、その重篤度に応じて血中の分枝鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid, BCAA) の濃度が低下していることが知られている。本邦では、その血中値の是正を目的として、肝硬変患者に対し BCAA を主成分とする特殊アミノ酸製剤の投与が行われている。その効果に対しては議論があるが、近年いくつかの randomized control trial (RCT) が施行され、血中アルブミン値の上昇だけでなく特殊アミノ酸製剤の肝機能、予後、肝発癌などに対する有用性が報告されている。これらの臨床研究から、BCAA 製剤は血中の蛋白濃度の上昇という栄養素補充としての意義だけでなく肝機能改善、肝発癌抑制等をもたらす可能性が示唆されている。しかしその機序は明確ではない。

BCAA とは、アミノ酸のうち、側鎖に枝分かれが認められるバリン、ロイシン、イソロイシンの総称である。生体内で合成できないため栄養学的に必須アミノ酸とされている。BCAA は血漿中のアミノ酸の約 40% を占め、エネルギー源として、あるいは糖新生において重要な役割を担っている。更に最近の研究により、BCAA は遺伝子発現調節、細胞内代謝調節、アミノ酸輸送、タンパク質代謝調節、タンパク質合成促進作用など、いわゆる薬理作用を持つと考えられてきている。

Hepatocyte growth factor (HGF) は、肝部分切除後動物血清及び劇症肝炎患者血清から独立に精製され、最終的に同一物質であることが判明した分子量約 9 万の蛋白である。動物種差はあるが生物活性は共通し、肝細胞だけでなく、培養腎尿細管細胞

等の増殖を促進することが認められている。肝、脾、腎、肺、脳、胸腺及び白血球での mRNA の発現が報告され、ラットでは血小板にも存在する。肝においては、HGF は肝星細胞をはじめとする非実質細胞で産生され、受容体は少なくとも肝細胞に発現している。HGF は培養肝細胞の DNA 合成を濃度依存的に上昇させる。また、HGF を過剰発現させた transgenic mouse や HGF を正常ラットに大量投与した場合、肝細胞増殖の結果、肝の肥大をきたす。更に近年 HGF は、細胞の成長、分裂促進、形態形成に影響を与えるほか抗アポトーシス作用や腫瘍抑制効果など多彩な機能を持つことが報告された。更に肝においては培養肝細胞の増殖だけでなくアルブミン、フィブリノーゲン合成など蛋白合成を含めた分化機能の発現も促進する。また、動物モデルにおいては HGF の投与により肝臓、腸管、腎臓、肺、脳や心臓の傷害が軽減され、特に肝臓では肝機能の改善や線維化の抑制がみられることが示された。これらの研究により HGF は多様な疾患の治療に応用できることが示唆される。

我々は BCAA の持つ上述の薬理作用に着目し、BCAA の肝における HGF 産生に対する影響に関して検討を行った。肝星細胞に BCAA を添加し培養すると、3 種の BCAA の中でロイシンのみが肝星細胞の HGF 産生を濃度依存的に増加させた。またラットに BCAA を投与し血中及び肝の HGF 値を検討したところ、ロイシン投与のみが血中及び肝の HGF 値を上昇させ、さらに血清中のアルブミン値の上昇も認めた。これらの結果から、BCAA の中でもロイシンが HGF 産生を促進し、肝機能に好影響を与えることが示唆された。BCAA 投与の効果の一部は HGF の誘導によりもたらされている可能性がある。しかし、ロイシンによる HGF 産生促進作用の機序は不明である。又、近年 BCAA 以外のアミノ酸の薬理作用も報告されているが、それらの HGF 産生に対する効果についても明らかではない。これらを明らかにすることは更に有効なアミノ酸製剤を生み出す基盤となると思われる。

近年アミノ酸による mammalian target of rapamycin (mTOR) 系を介した蛋白合成促進作用が注目されている。mTOR は真核細胞の蛋白合成を制御する情報伝達系を担う最も重要な蛋白質の一つである。mTOR はリン酸化酵素であり、その基質分子として、70 kDa ribosomal protein S6 (p70 S6 kinase) と eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) の二つが主体とされている。p70 S6 kinase は、mTOR によりリン酸化されるとリボソームの 40S サブユニットを構成する S6 蛋白質をリン酸化する。S6 は 40S リボソームを構成する蛋白質の中で唯一リン酸化を受ける分子として知られており、リン酸化されることによって蛋白質合成が促進される。一方、4E-BP1 は低リン酸化状態では eukaryotic initiation factor (eIF) -4E と複合体を形成することにより、eIF-4E の他の翻訳開始因子との結合を阻害している。アミノ酸等により、mTOR が活性化され 4E-BP1 がリン酸化されると、eIF-4E は 4E-BP1 から解離し、他の翻訳開始因子と複合体を形成することが可能となり、eIF-4E は 5'cap 構造を有する mRNA の翻訳を誘導する。アミノ酸など栄養素の刺激を受けると、mTOR は活性化し、p70 S6 kinase 系および

4E-BP1 系を介して蛋白質合成を制御することが推定される。

本研究において我々は、肝星細胞における HGF 産生促進に対する各種アミノ酸の影響を検討した。さらに作用機序について、情報伝達系の一つと考えられている mTOR 系の関与について評価した。

肝星細胞の培地中およびラット血漿中、肝組織中 HGF 値の測定は EIA にて行った。p70 S6 kinase の活性化の測定オートラジオグラフィにて、また p70 S6 kinase 及び 4E-BP1 のリン酸化の検出はウェスタンブロットにて行った。統計解析においては独立 2 群の差は Student's t-test で、用量依存的効果は、一元配置分散分析を用いて検定した。すべて、 $p < 0.05$  を有意とした。

その結果、ロイシン以外にグルタミンおよびプロリンが有意に濃度依存的に培地中の HGF 濃度を上昇させた。この実験系では細胞の増殖はみられず、ゆえにグルタミンおよびプロリンは HGF 産生を刺激していると考えられた。これらアミノ酸による HGF 産生促進の機序としては、まず HGF 産生のためのエネルギーあるいは素材を提供した可能性があげられる。しかし、他のアミノ酸が HGF 産生促進作用を持たなかったことより、その可能性は低い。また、正常ラットにおいてグルタミンおよびプロリンを投与した場合にも、ロイシンと同様肝および血中 HGF 値は有意に上昇した。以上より、ロイシン、グルタミンおよびプロリンはいわゆる薬理作用を介して、肝における HGF の産生を促進している可能性が示唆される。

次に我々はロイシン、グルタミンおよびプロリンが HGF 産生に促進的に働くメカニズムとして、mTOR 系の下流に位置する p70 S6 および 4E-BP1 を介した経路への関与について検討した。

ロイシンを培地中に加えると、肝星細胞において p70 S6 kinase の活性化と 4E-BP1 のリン酸化が急速に促進されることが示された。さらに、mTOR の特異的インヒビターであるラパマイシンを添加すると、ロイシンによる p70 S6 kinase の活性の上昇と 4E-BP1 のリン酸化は抑制された。また、ラパマイシンはロイシンによる HGF 産生促進効果を濃度依存的に抑制した。これらの実験結果より、ロイシンは mTOR 系すなわち p70 S6 kinase および 4E-BP1 のリン酸化を介して肝星細胞の HGF 産生を促進することが示された。

一方、グルタミンおよびプロリン添加によって、ロイシンのように明らかな p70 S6 kinase の活性の上昇と 4E-BP1 のリン酸化の促進はみられなかった。グルタミンおよびプロリンは mTOR 系の蛋白合成調節経路を介さずに HGF 産生を促進することが示唆された。

以上、まとめると

1. グルタミンとプロリンは、ロイシンと同程度に肝星細胞における HGF 産生を促進する。
2. ロイシンが、mTOR 系を活性化して、肝星細胞の HGF 産生を促進するのに対して、

グルタミンとプロリンは、この系をほとんど活性化しない。この 2 つのアミノ酸は、**mTOR** 系以外の作用で、**HGF** 産生を促進すると考えられた。

臨床的には、**HGF** 合成を促進することが多くの疾患の治療に結びつく可能性がある。特に、急性および慢性肝不全においては、**HGF** を増加させることが病態を改善すると、期待されている。しかし、グルタミンとプロリンに関しては、血中アンモニアの増加や肝におけるコラーゲン合成の促進などの可能性も病態によっては考えなくてはならない。臨床の場合においてはどのアミノ酸配合が最もその病態の改善のために適しているか、いわゆる‘テイラーメイド医療’の考えに基づき、さらに効果的な治療法が開発されていくべきであろう。