

## 論文の内容の要旨

論文題名      タンパク合成阻害剤 cycloheximide による肝傷害誘発機序

氏 名      熊 谷 和 善

*Streptomyces griseus* が産生する cycloheximide (CHX) は、真核生物で翻訳過程のリボソーム転位を妨げることで、タンパク質の新規合成を阻害する。CHX は高用量を曝露した *in vitro* 試験やげっ歯類を用いた *in vivo* 試験で、肝細胞アポトーシスを誘発するとされるが、その詳細な機序は未だ明らかではない。さらに、*in vivo* 試験では、CHX による肝細胞ネクローシスは認められないとされている。しかし、CHX を含めた肝傷害物質を投与した場合、アポトーシスとネクローシスが共通の機序を介して同時に誘導されることも多い。

本研究では、CHX による肝細胞アポトーシスの機序を解明するため、病理学および分子生物学的に検索を行った。さらに、その過程で CHX による肝細胞ネクローシスの誘発を認めたが、本病態における Kupffer 細胞およびサイトカインの関係が明らかでないことから、両者の関与についても検索した。本論文は、1) CHX による肝細胞アポトーシス誘発機序の検討、2) CHX 誘発肝傷害と Kupffer 細胞との関係、3) CHX 誘発肝傷害と抗炎症性サイトカインとの関係、の3項目から構成される。

### 1) CHX による肝細胞アポトーシス誘発機序

CHX 投与ラット肝臓の病理組織学的変化および遺伝子発現変化を解析するため、雄 F344 ラットに CHX 6 mg/kg を尾静脈内投与し、投与後 1、2、6 時間に肝臓を採取した。CHX 群では投与後 1 時間から対照群に比べ TUNEL 陽性肝細胞数が増加し、投与後 2 時間にピークに達した。マイクロアレイ解析の結果、転写因子 *CHOP*、*ATF3*、*C/EBP β* の mRNA レベル

が投与後 1 時間から有意に増加し、投与後 2 時間にピークに達した。さらに、定量的 RT-PCR の結果から、*ATF4* mRNA 量の増加も確認された。CHOP はアポトーシスの誘発に関与すること、*ATF3*、*ATF4* および *C/EBP β* は CHOP 介在性アポトーシス経路に含まれることから、CHX による肝細胞アポトーシスには CHOP 経路が関係すると推察された。CHOP は小胞体ストレス、酸化ストレスによる DNA 傷害、アミノ酸欠乏などにより誘導される。とくに、小胞体ストレスでは UPR 経路が活性化され、通常、小胞体シャペロン *GRP78/Bip* が発現上昇する。しかし、今回の遺伝子発現解析では、*GRP78/Bip* 発現は対照群と比べて、いずれの時間でも有意な差を認めなかった。次いで、肝細胞アポトーシス誘発機序をより詳細に検討するため、CHX 投与ラット肝臓におけるタンパク質の発現変化を検索した。上述の実験と同一の投与を行い、肝臓を採取した。酸化ストレスの影響を検索するため、GSH および GSSG 量を測定した結果、いずれの時間でも対照群と比べ有意な差を認めず、CHX 投与による CHOP 誘導は酸化ストレスに起因しないことが示された。二次元ディファレンス電気泳動と MALDI-TOF-MS 解析では、*GRP78/Bip* は異なる等電点を示す 2 つのスポットとして観察された。CHX 投与群では投与後 1 時間から 6 時間まで、酸性フォームの *GRP78/Bip* が対照群と比べ有意に増加したことから、*GRP78/Bip* が CHX 投与により不活性化されることが示された。すなわち、CHX 投与ラットの肝臓では UPR 経路は活性化されないと推察され、この CHOP 発現時のタンパク質発現パターンはアミノ酸欠乏時のパターンに類似すると考えられた。アミノ酸欠乏時の CHOP によるアポトーシス誘発は知られていない。今回、定量的 RT-PCR で CHX 投与後、継続した *Akt/PKB* mRNA の有意な減少と、ELISA 法で投与後 1 時間にリン酸化 *Akt/PKB* の有意な減少を認めた。*Akt/PKB* は CHOP によるアポトーシスを抑制することから、CHX による *Akt/PKB* 阻害が肝細胞アポトーシスに関係すると推察した。

以上の結果から、CHX はラット肝臓において、酸化ストレスや UPR 経路ではなく、アミノ酸欠乏時と類似する経路によって CHOP を誘導すると推察された。さらに、CHX による *Akt/PKB* 活性の阻害が CHOP による肝細胞アポトーシス誘導を増強すると考えられた。

## 2) CHX 誘発肝傷害と Kupffer 細胞との関係

第 1 章の検索過程で、CHX 投与後 2 時間から血清 ALT および AST 活性の上昇を認め、投与後 6 時間には肝細胞アポトーシスに加え、少数の好中球浸潤を伴う肝細胞ネクローシスを認めた。そこで、TUNEL 染色と Kupffer 細胞マーカーである ED1 および ED2 による免疫染色を行った。その結果、肝細胞アポトーシス誘発のピーク時に、Kupffer 細胞が多数のアポトーシス肝細胞を貪食していることが示された。また、これと一致して、*IL-1β*、*TNF-α*、ケモカイン *MIP-1α*、*MIP-1β*、*MIP-2*、接着分子 *E-selectin* の mRNA レベルの増加を認めた。このことから、Kupffer 細胞は CHX により誘発されたアポトーシス肝細胞を貪食することで活性化し、肝細胞ネクローシスを増悪している可能性が示された。

そこで、Kupffer 細胞不活性化剤である gadolinium chloride ( $GdCl_3$ ) を用いて、CHX によ

る肝臓の壊死性変化と Kupffer 細胞の関係について検討した。雄 F344 ラットに生理食塩水または CHX 6 mg/kg を尾静脈内投与した群、GdCl<sub>3</sub> 10 mg/kg 尾静脈内投与後 24 時間に生理食塩水または CHX 6 mg/kg を投与した群の 4 群を設けた（それぞれ Saline 群、CHX 群、GdCl<sub>3</sub>/saline 群、GdCl<sub>3</sub>/CHX 群）。CHX 投与後 1、2、6 時間に剖検し、各種検索を行った。その結果、GdCl<sub>3</sub>/CHX 群では CHX 群と比べ、CHX 投与後 6 時間に血清 ALT および AST 活性の有意な増加と肝細胞ネクロシスの増悪を認めた。また、GdCl<sub>3</sub>/CHX 群では CHX 群と比べ、ED1 陽性細胞は半数程度、ED2 陽性細胞は 90%程度減少した。マイクロアレイ解析では、CHX 投与後 2 時間に CHX 群で *IL-10*、*Stat3* mRNA の有意な発現増加を認めたが、GdCl<sub>3</sub>/CHX 群ではこれを認めなかった。これに対し、CHX 群では認めなかった *Ccl20*、*LOX-1*、*E-selectin* mRNA の有意な発現増加を GdCl<sub>3</sub>/CHX 群で認めた。

以上より、GdCl<sub>3</sub> による Kupffer 細胞不活性化は抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生を減少させることで、TNF シグナル経路などの炎症経路を増強し、CHX による肝細胞ネクロシスを増悪させると推察された。このことから、CHX 投与ラット肝臓では Kupffer 細胞は肝細胞ネクロシスに対して、むしろ保護的であると考えられた。

### 3) CHX 誘発肝傷害と抗炎症性サイトカインとの関係

抗 IL-10 抗体 (IL-10Ab) による IL-10 の直接阻害が、CHX 誘発肝傷害を増悪するか検討した。雄 F344 ラットに IL-10Ab またはヤギ IgG をそれぞれ 50 µg 尾静脈内投与した後、CHX を 3 または 6 mg/kg 尾静脈内投与し (IL-10Ab/CHX 群、CHX 群)、投与後 2 または 6 時間に肝臓を採取した。定量的 RT-PCR および血清サイトカイン測定の結果、CHX 群では肝臓の *IL-10* mRNA 発現および血清 IL-10 濃度が増加したが、IL-10Ab/CHX 群ではその増加が抑制された。一方、IL-10Ab/CHX 群では肝臓の *TNF-α*、*IL-6* mRNA 発現、血清 *TNF-α*、*IL-1β*、*IL-6* 濃度が CHX 群に対して有意に増加した。さらに、IL-10Ab/CHX 群では CHX 群と比べ、CHX 投与後 2 時間に TUNEL 陽性肝細胞数、肝臓の caspase 8、9、3/7 活性の有意な増加を、6 時間には血清 ALT および AST 活性の有意な増加と肝細胞ネクロシスの増悪をそれぞれ認めた。加えて、定量的 RT-PCR の結果、IL-10Ab/CHX 群では CHX 群に比べ、*Ccl20*、*LOX-1*、*E-selectin* mRNA 発現も有意に増加した。抗ミエロペルオキシターゼ抗体を用いた免疫染色の結果、IL-10Ab/CHX 群の肝臓で CHX 群と比べて、好中球浸潤の程度が増強した。

以上より、CHX 誘発肝傷害の増悪には、IL-10 の阻害による炎症性サイトカインの作用増強が関係することが改めて確認され、CHX 誘発肝傷害に対する IL-10 の保護作用の重要性が示唆された。

本研究により、CHX による肝細胞アポトーシスには CHOP 経路の活性化が関係し、アミノ酸欠乏時に類似した経路を経ること、さらに Akt/PKB の不活性化が関与することが示された。さらに Kupffer 細胞は抗炎症性サイトカインを放出することで CHX 誘発肝傷害に対し保護的に作用すること、および IL-10 もこの肝傷害に対して保護作用を有することが明ら

かとなった。これらの研究成果は、毒性物質により誘発される肝細胞アポトーシスおよびネクローシスの機序を解明する上で、有用な基礎的知見を提供するものである。