

論文審査の結果の要旨

くまがい かずよし

申請者氏名 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。高用量の CHX は肝細胞アポトーシスを誘発するとされるが、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という報告も多い。本研究では、CHX によ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ため、病理学および分子生物学的に検索を行った。また、本病態における Kupffer 細胞およびサイトカインの関与についても検索した。

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/EBPβ* 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。*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、CHX 投与ラット肝臓における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なかった。タンパク質の発現を調べるため二次元ディフュージョン電気泳動と MALDI-TOF-MS を行ったところ、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。また、定量的 RT-PCR で CHX 投与後の *Akt/PKB* mRNA の有意な減少、ELISA 法では投与後 1 時間にリン酸化 *Akt/PKB* の有意な減少も認めた。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。

次に、肝細胞アポトーシスとネクローシス誘導過程における Kupffer 細胞の関与を検索した。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、マクロファージ阻害剤 $GdCl_3$ 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（それぞれ Saline 群、CHX 群、 $GdCl_3$ /saline 群、 $GdCl_3$ /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、 $GdCl_3$ /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ーシスの増悪を認めた。また、 $GdCl_3$ /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、GdCl₃/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 GdCl₃/CHX 群で認めた。以上の結果から、Kupffer 細胞不活性化は IL-10 の産生を減少、TNF シグナル経路などの炎症経路を増強し、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。

最後に CHX による肝細胞アポトーシスとネクロシスにおける IL-10 の関与を調べた。雄 F344 ラットに抗 IL-10 抗体 (IL-10Ab) を 50 µg 尾静脈内投与した後、CHX を尾静脈内投与し、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、CHX に加えて IL-10Ab を投与した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。さらに、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。以上の結果から、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シスの機序を解明する上で極めて有用な基礎的知見を提供するものであり、毒性病理学研究の発展に寄与することが大きい。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位を授与するに値するものと認めた。