

〔別紙 2〕

審査の結果の要旨

氏名 小沢政成

肝臓は再生能を有する臓器であり、肝がんの切除や生体部分肝移植といった外科的治療は肝再生を期待して行われる。しかしながら、不十分な肝再生によって肝不全・予後不良がもたらされる例が報告されており、肝再生を積極的に制御する方法論の確立が望まれている。肝再生を抑制する一因として、肝臓内グルタチオン (GSH) 濃度の減少が動物モデルを用いた検討により示唆されており、臨床では生体部分肝移植に伴う移植片の冷虚血・再灌流によって肝臓内 GSH 濃度が 30%程度に減少することが報告されている。従って、臨床における肝臓内 GSH 濃度の低下は肝再生を抑制し、治療予後に影響を与えている可能性が想定される。

本研究は、これまで不明であった GSH 濃度の減少が肝再生を抑制する分子メカニズムの解明を目的とし、ラット部分肝切除に伴う肝再生過程をモデルとして、解析を行っている。まず、cyclin D1 の発現上昇および GSH 濃度の増加が観察される G₁ 中後期に着目して、cyclin D1 の発現誘導を制御するメカニズムの解明を試み、次いで GSH 濃度の減少がその cyclin D1 の誘導メカニズムに対して及ぼす影響を解析したものである。

まず、細胞周期 G₁ 期から S 期への移行を制御する cyclin D1 の誘導に重要な、G₁ 中後期におけるシグナル経路の解析を行っている。増殖因子 HGF 刺激後のラット初代培養肝細胞では、HGF 受容体である c-MET およびその下流シグナル分子である Akt、mTORC1、MEK が G₁ 中後期に至るまで持続的に活性化していることが示された。各シグナル分子に対する阻害剤を用いた検討からは、G₁ 中後期における c-MET/PI3K/Akt/mTORC1 経路の阻害が、cyclin D1 mRNA の誘導、および肝細胞の S 期への移行を抑制する一方で、やはり c-MET 下流で活性化する MEK/ERK 経路に対する阻害は影響を及ぼさないことが確認された。G₁ 中後期において c-MET が活性化されるメカニズムに関しては、G₁ 初期における HGF のウォッシュアウトがその後の c-MET およびその下流シグナル分子のリン酸化、更に肝細胞の S 期への移行割合に影響を及ぼさないことから HGF 非依存的であることが見出されている。また、ラット部分肝切除モデルを用いた検討からは、cyclin D1 の発現量および S 期肝細胞数が、G₁ 中期における c-MET キナーゼ阻害剤または mTORC1 阻害剤の投与によって減少することが確認されており、G₁ 中後期における c-MET/mTORC1 の活性が in vivo 肝再生においても必要であることが示唆されている。これら一連の検討は、cyclin D1 の発現上昇には G₁ 中後期における c-MET/PI3K/Akt/mTORC1 経路の持続的な活性化が必要であることを初めて示唆したものである。

続いて、GSH 濃度の減少による肝再生抑制メカニズムの解析を行っている。ラット部分肝切除モデルでは、S 期肝細胞数および cyclin D1 発現量が GSH 合成酵素阻害剤である L-buthionine (S,R)-sulphoximine (BSO) の投与によって減少することが確認されている。ラット初代培養肝細胞では、HGF 刺激に伴う cyclin D1 mRNA 発現量の上昇が BSO の処理によって抑制されることが確認され、cyclin D1 の誘導に必要な G₁ 中後期における c-MET/PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化に対して、肝細胞内 GSH 濃度の低下が抑制的に作用する可能性が想定された。この点に関しては、BSO の処理によって G₁ 中後期における mTORC1 の活性が減弱される一方、mTORC1 の上流に位置する Akt の活性は変化しないことが確認されている。mTORC1 の活性を制御する他のシグナル分子に対して解析を行った結果、BSO の処理は mTOR 抑制因子である AMPK のリン酸化を増大させることが見出されている。BSO の細胞増殖抑制効果に対する AMPK 阻害剤の影響を検討した結果、BSO と AMPK 阻害剤の併用群では肝細胞の S 期への移行割合は回復し、さらに mTORC1 の活性が HGF 単独添加群とほぼ同程度にまで回復する様子が確認されている。従って、GSH 濃度の低下による肝細胞の S 期への移行割合の減少は、AMPK の活性化を介した mTORC1 の活性抑制に起因したものであることが示唆されている。

以上、本研究は、GSH 濃度の減少によって肝細胞の増殖が抑制される分子メカニズムとして、AMPK が GSH 濃度の減少によって活性化し、cyclin D1 の誘導に必要な mTORC1 の活性を抑制する一連のスキームを見出している。本知見は、肝再生過程において GSH 濃度および mTORC1 の活性を保持することの重要性を示唆し、重症肝疾患患者における治療予後の向上を図る上での基盤情報になると期待される。また、本研究は、AMPK が GSH 濃度の減少に起因して活性化することを初めて見出し、これまで全般的に詳細な分子メカニズムが不明であった酸化ストレスの細胞増殖抑制効果において、AMPK が関与している可能性を示唆した価値ある研究と考えられる。従って、申請者の本業績は学位の授与に値するものと判断される。