

腫瘍壊死因子 $\alpha$ のラット初代培養肝実質細胞に対する増殖促進作用機構に関する研究

岡 本 浩

目次	-----	1
略語表	-----	3
第一章 腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) のラット初代培養肝細胞に対する増殖促進作用機構の検討		
1 緒言	-----	4
2 実験方法	-----	11
3 実験結果	-----	15
3-1) 肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$ の増殖促進作用の経時変化	-----	15
3-2) 肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$ の増殖促進作用の用量 - 反応関係	-----	15
3-3) 肝細胞における TNF- $\alpha$ の増殖促進作用に対する播種時の細胞密度の影響	-----	18
3-4) TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対する抗 TNF 受容体モノクローナル抗体の作用	-----	20
3-5) TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の作用	-----	23
3-6) TNF- $\alpha$ の肝実質細胞受容体チロシンキナーゼ活性に対する効果	-----	26
3-7) TNF- $\alpha$ の肝実質細胞 MAP キナーゼ活性に対する効果	-----	28
3-8) TNF- $\alpha$ の肝実質細胞内 c AMP 濃度に対する作用の経時変化	-----	30
3-9) ホスフォジエステラーゼ阻害剤存在下における肝実質細胞内 cAMP 濃度に対する TNF- $\alpha$ の効果	-----	31

4 考察	-----	32
第二章 腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) によるラット初代培養肝細胞からのトランスフォーミング成長因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) の分泌に対する作用		
1 緒言	-----	36
2 実験方法	-----	38
3 実験結果	-----	40
3-1) 肝実質細胞における TNF- $\alpha$ による p42 kDa MAPK 活性促進作用の経時変化	-----	40
3-2) TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対するモノクローナル抗 IGF-I 抗体, モノクローナル抗 TGF- $\alpha$ 抗体の作用	-----	42
3-3) TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ 分泌促進作用の経時変化・用量・反応関係	-----	45
3-4) TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ の分泌促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果	-----	47
4 考察	-----	49
結論 TNF 受容体 2 を介するラット初代培養肝細胞増殖促進作用のシグナル伝達経路		
	-----	52
謝辞	-----	54
参考文献	-----	55

略語表

TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
DDA	2,4-dideoxyadenosine
H-89	[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinorin sulfonamide dihydrochloride
AG1478	4-(3'-chloroanilino)-6,7-dimethoxy-guinazoline
PD98059	2'-amino-3'-methoxyflavone
AC	adenylate cyclase
cAMP	adenosine 3',5'-cyclophosphate
PKA	protein kinase A
RTK	receptor tyrosine kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
PI3K	phosphatidylinositol triphosphate kinase
p70 S6K	p70 ribosomal S6 kinase
mAb	monoclonal antibody
TNFR	tumor necrosis factor receptor
PBS	phosphate-buffered saline
TGF- $\alpha$	transforming growth factor- $\alpha$
IGF-I	insulin-like growth factor- I
LY294002	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine

# 第一章 腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) のラット初代培養肝細胞に対する増殖促進作用機構の検討

## 1 緒言

哺乳動物の肝臓は、脳に次ぐ大きな臓器で、体重の約 2% を占め、約 500 種以上の多種多様な生化学反応を営んでおり、物質代謝の中心的臓器である。肝臓を構成している約 3000 億個の総細胞のうち、約 70% (湿重量で約 90%) が実質細胞で、残りの約 30% が非実質細胞である。肝実質細胞は、肝臓代謝の中心的な働きを担うとともに、肝臓の容積を形成している。非実質細胞は、類洞壁を形成する血管内皮細胞、結合組織の線維芽細胞、肝臓の栄養、代謝を担う Ito 細胞や、免疫系に関する Kupffer 細胞などから構成されている。

肝臓に流入する血管系は門脈と肝動脈の 2 種類あり、門脈から 80%、肝動脈から 20% 栄養を受けている。このような臓器は他には無く、解剖学的構成としては血管系である固有肝動脈、類洞、門脈、肝静脈、および胆管とからなっている。構造としては、肝中心静脈を中心に約 50 万個の肝実質細胞が放射状および索状に並んでおり、その外側から顕微鏡下に観察すると約  $0.7\text{mm}^3$  の極小さな六角形または六角錐の形状をとる肝小葉からなる。このような構造により物質代謝が効率良く行われている。

肝臓の主たる働きは生体のホメオスタシスを維持することにある。すなわち、(1) 血糖調節と脂質及びタンパク質代謝、(2) 血中タンパク質 (アルブミン、血液凝固因子など) の合成、(3) 胆汁酸の合成と分泌、(4) 毒化合物の分解などを営んでいる。肝臓の有するこれらの機能の大部分は、肝実質細胞が担っている。また、これらの代謝過程は、ホルモン、自律神経伝達物質、成長因子、サイトカインなどの液性因子により巧妙な調節を受けている。

さらに肝臓は、これらの重要な役割とともに他の臓器にはあまり見られない自己増殖能を有しており、この現象は肝再生と呼ばれている。ギリシャ神話に

において、プロメテウスが、ゼウスから、鳥に肝臓をついばませるという刑罰を受けたが、翌日には肝臓が再生したと記されている<sup>1)</sup>。このような資料から類推すると、古来より人類は、肝再生現象を経験的に知っていたものと思われる。しかしながら、この肝再生現象が科学的方法により証明されたのは、かなり後世であり、20世紀初頭になってからのことである<sup>2)</sup>。哺乳動物の肝臓は、その約70%を切除しても残余肝が自動的に分裂・増殖を開始し、動物種により違いがあるが、およそ数週間でもとの容積にまでに再生し、この応答は自動的に停止することが知られている。この肝再生現象は、きわめて精密な機構によるものと考えられ、様々な研究が行われてきた。

その後の *in vivo* の研究により、肝細胞の増殖を引き起こす物質は液性因子であることが体液交流実験により示された<sup>3)</sup>。さらにその後の研究により、多くのサイトカインや成長因子が肝再生中の動物中の血液中や組織中から単離精製されている。例を挙げると、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は、血小板由来因子であり、肝障害に応答して著しく血中濃度が増加する。また、人為的に肝障害を起こさせたラットや、肝臓を外科的に除去したラットに HGF を投与すると肝臓の再生が促進されることが報告されている<sup>4)</sup>。

*in vivo* における成熟した哺乳動物の肝臓は、通常は細胞周期でいう静止期 ( $G_0$ 期) の状態にあり、増殖反応を停止していて、上記に示した分化機能 (肝特異機能) を営んでいる。しかし、最大で肝臓の約70%を外科的に除去した場合や四塩化炭素のような毒性化学的物質を投与して肝障害 (肝細胞の壊死) を誘発した場合、残余の肝細胞が増殖を開始する。この増殖は有限であり、ラットにおいてはおよそ10日間で元の容積に戻ると自動的に停止する。一般に、哺乳動物の生体内での肝再生は、 $G_0$ 期状態にある肝実質細胞が何らかの因子による刺激を受けて細胞周期の $G_1$ 期に入り、約24時間後に $G_1$ 期から始動して、S期においてDNAの合成がなされ、 $G_2$ 期に移行して、M期で細胞が分裂

することにより増殖し、肝臓が元の大きさにまで戻ると再びG<sub>0</sub>期に戻り増殖が停止すると考えられている(図 1-1)。またこの肝再生現象では、先ず肝実質細胞が増殖し、その後、徐々に非実質細胞が増殖すると考えられている。このような再生現象の開始と終了においては細胞密度などの物理的因子、肝細胞増殖調節因子などの生化学的因子等、複数の因子が複雑に関与しているものと考えられている<sup>5)</sup>。さらに、肝再生現象の自然な時間経過における個別の成長因子の役割やその細胞内シグナル伝達機構にはいまだに不明の部分が多く残されている。しかし、*in vivo*の実験系で肝再生の仕組みを研究するのは、関与する因子がきわめて多く、その中で何が応答の主な原因なのかについて一定の結論を導き出すのは大変困難である。

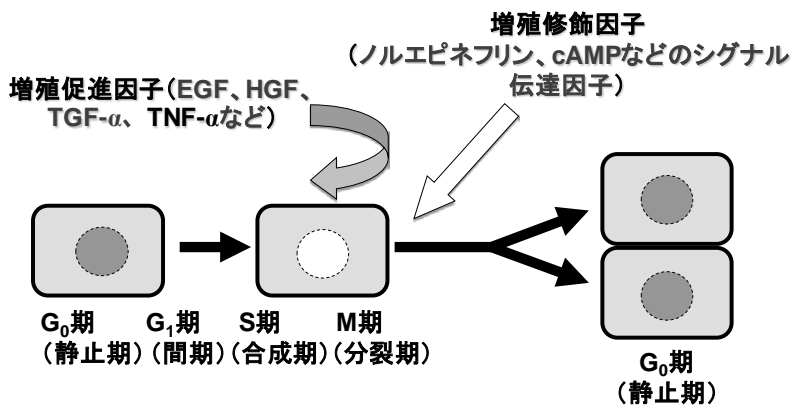


図 1-1 肝実質細胞分裂機構モデル

その後、初代培養肝実質細胞（以下、肝実質細胞と略す）実験系が確立されたことによって、*in vivo*における肝臓にほぼ匹敵する多様な肝機能を長時間維持させることが可能となり *in vivo*での実験系の複雑さを回避できる単純なモデル実験系が利用可能となった<sup>6)</sup>。Kimura らは、肝再生現象の比較的単純な *in vitro* モデル系としてのラット初代培養肝実質細胞実験系を独自に開発し、

この実験系を用いて、種々の成長因子の、細胞数で約7割を占めている肝実質細胞の増殖に対する作用とその仕組みを詳しく研究してきた。その理由は、このような肝実質細胞の増殖の開始、終了の仕組み（シグナル伝達機構）を研究することにより、臓器の形成、癌化の問題、さらには、いわゆる肝障害に対する新しい治療薬の開発など様々な分野への応用が期待できるからである。そして、上皮増殖因子（EGF: epidermal growth factor）などの増殖促進薬（mitogen）やメタプロテレノール（アドレナリン $\beta_2$ 受容体作動薬）などの増殖修飾薬（co-mitogen）とゲニステイン（チロシンキナーゼ阻害薬）、ワートマニン（ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ阻害薬）、PD98059（MAPKキナーゼ阻害薬）ラパマイシン（p70リボソームS6キナーゼ阻害薬）等のシグナル伝達因子阻害薬を用いた薬理的な研究から、これらの因子による肝再生の開始と終了の分子機構の研究が進められ、最近ようやくその実態が明らかになってきた<sup>78)</sup>。

これらの因子を分類すると以下のようなになる。

- 1 増殖促進因子には、1) 成長因子 2) ホルモン 3) サイトカイン 4) 栄養素（アミノ酸）などがある。
- 2 増殖修飾因子には、カテコールアミン、プロスタグランジン類（PG類）などがあり、これらは単独では増殖促進作用がないとされている。
- 3 増殖抑制因子には、サイトカイン（TGF- $\beta_1$ ）などがある。
- 4 物理的因子には細胞播種時の密度などがある。

Kimura らの結果によると、血清不含培養系においては（1）成長因子などによる肝実質細胞の分裂・増殖作用は、従来報告されていた時間経過よりもかなり早期に起こること、（2）カテコールアミンによる修飾効果も成長因子ごとに異なること、また、（3）細胞内シグナル伝達にかなりの共通性があること、そして、（4）増殖促進因子の効果は、肝細胞播種時の密度に影響を受け、肝細胞



数が多くなり、比較的高密度になるとその作用を発揮できなくなるものと、比較的高密度でも増殖促進作用を示すものがあることを見出した。前者には、生体高分子ペプチドである、上皮増殖因子 (epidermal growth factor; EGF)、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) インスリン様成長因子 I (insulin-like growth factor I; IGF-I) などが、後者には、トランスフォーミング成長因子  $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ; TGF- $\alpha$ )、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor; PDGF) インスリン様成長因子 II (insulin-like growth factor 2; IGF-II) などがあると報告されている<sup>9-13</sup>。細胞間接触 (cell-to-cell contact) が、上記の成長因子あるいはサイトカインの作用との関連でどのようなメカニズムにより、肝細胞の増殖開始と終了に関与しているのかは大変重要かつ興味深い問題である。

サイトカインは、細胞より分泌される分子量 8~30 kDa 程のタンパク質で、特定の細胞の情報伝達を担う。その生理活性は非常に強く、pmol 程度の低濃度で作用を示す。サイトカインの一種に分類される腫瘍壊死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ; TNF- $\alpha$ ) は、主として活性化マクロファージ (単球) から産生・分泌される 26 kDa のタンパク質で、マウスやその他いくつかの動物の腫瘍細胞を壊死させる因子として培養液中に初めて見出された<sup>14</sup>。TNF- $\alpha$  は腫瘍細胞を壊死させる作用のほか、血管内皮細胞の障害、微小血栓の形成やミトコンドリアの障害などがあるが、ある種の細胞に対しては、分裂・増殖を促進させる作用もあることが知られている<sup>15-17</sup>。TNF- $\alpha$  は、主にマクロファージ以外にも NK 細胞、T リンパ球、肥満細胞、クッパー細胞、平滑筋細胞や、ある種の癌細胞など多様な細胞種により産生されることが明らかとなってきた<sup>18-20</sup>。また、この TNF- $\alpha$  の産生は、インターフェロン、IL-1 などのサイトカインにより誘導され、TGF- $\beta$ 、IL-4 によって抑制を受ける。肝臓では、TNF- $\alpha$  はクッパー細胞より産生され、パラクリン様式で分泌される。TNF- $\alpha$  は、

部分肝切除や肝臓毒性を示す化学物質による肝障害からの早期の肝再生及び肝機能の回復において、比較的初期の段階で重要な役割を果たす因子であるとされている<sup>20)</sup>。しかし、全体として TNF- $\alpha$  に関する研究は、細胞死（アポトーシス）や炎症に関するものが多く<sup>21)</sup>、増殖促進作用に関する研究は極めて少ない。そのため、肝実質細胞増殖のシグナル伝達の詳細については、依然として不明のままである。

一方、TNF- $\alpha$  が種々の細胞に対して応答を発現させるには、先ず、その細胞膜の受容体に結合する必要がある。分子生物学的検討の結果では、TNF- $\alpha$  に結合する受容体には免疫学的に異なる 2 つの受容体 (TNF 受容体 1, 分子量約 55 kDa ; TNF 受容体 2, 分子量約 75 kDa) が存在することが明らかになっており、これらの受容体サブタイプに対応するヒト及びマウスの cDNA が単離されて、その性質が検討されてきている<sup>22)-25)</sup>。肝細胞膜表面には約 60% の TNF 受容体 2 が、約 40% の TNF 受容体 1 が発現しているといわれている。2 つの細胞膜表面受容体には、20% 程度の相同性があるが、細胞内領域には有意な相同性がないといわれている。このことは、2 つの受容体が異なったシグナル伝達経路と共役していることを支持している。TNF- $\alpha$  は、2 つの受容体にほぼ同じ親和性で結合するものの、TNF- $\alpha$  の大部分の生物学的な効果は、TNF 受容体 1 を介するものであると報告されている<sup>17)</sup>。TNF- $\alpha$  がその受容体に結合すると、多くのシグナル伝達システムが活性化され、多くの遺伝子が発現される。TNF 受容体 1 は、アポトーシス経路と共役しており、そしてまたサバイバル経路をも活性化する。一方、TNF 受容体 2 を介するシグナル伝達経路の詳細については不明のままである<sup>26)-29)</sup>。

先述したように、肝臓は、*in vivo* において通常は、細胞増殖を停止しているが、外科的部分肝切除や肝臓毒を示す化学物質の投与による肝障害に応答して、増殖を開始し、再生を開始する能力をもっている<sup>15)</sup>。*In vivo* 部分肝切除実験

系において、肝切除の前に抗 TNF- $\alpha$  抗体を前投与しておくこと、その肝再生が抑制されたことから、この一連の現象において、TNF- $\alpha$  は肝再生の初期に、調節因子として働いている可能性が、示唆されている<sup>9)10)30)</sup>。しかし、それが肝再生を誘発する直接的な刺激を起こしているのか否かは、明確になっていない。また、Yamada らは、TNF 受容体 1 が、肝再生時に重要な働きを示していると、TNF 受容体 1 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* 実験で示している<sup>31)-33)</sup>。しかし、TNF 受容体 2 に関しては検討を十分には行なっておらず、現時点では、TNF- $\alpha$  の肝細胞増殖促進作用及びその作用機構は明確になっていない<sup>34)35)</sup>。

このような背景から本論文では、増殖促進因子としての TNF- $\alpha$  に焦点を当てて、*in vitro* ラット初代培養肝実質細胞実験系における TNF- $\alpha$  の肝実質細胞増殖促進作用について、そのシグナル伝達機構を詳しく検討し、明らかにすることを目的とした。

## 2 実験材料及び実験方法

### 2-1 実験材料及び試薬

Wistar 系雄性ラット(体重 200~220 g)は、東京実験動物(株)から購入した。コラーゲン(type I)コートプラスチックディッシュ(35mmΦ)は、岩城硝子(株)から購入した。Williams' medium E、DDA (2,4-dideoxyadenosine)、AG1478(4-(3'-chloroanilino)-6,7-dimethoxy-guinazoline)は、Sigma(St. Louis, MO, USA)から購入した。Newborn calf serumは、Flow Laboratories (Irvine, Scotland,UK)から購入した。コラゲナーゼ(type II)は、Worthington(Freehold, NJ, USA)から購入した。TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , human,recombinant) は、Wako (Osaka, Japan) から購入した。H-89(N[2-(p-bromocinnamyl-amino)ethyl]-5-quinolinsulfonamide-dihydrochloride)は、Biomol Reseach Laboratores, Inc.(Plymouth Meeting,PA,USA)から購入した。PD98059(2'-amino-3'-methoxyflavone)は、Calbiochem-Behing (La,Jolla,CA,USA)から購入した。その他の試薬は市販の特級品を購入して用いた。

### 2-2 実験動物

東京実験動物(株)から購入した Wistar 系雄ラットは実験前に最低 3 日間、湿度、温度管理の飼育舎で馴化飼育した。これらには通常の食餌及び水を自由摂取させた。実験動物の取り扱いは、城西大学生命科学研究センター実験動物規範および The National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. に準拠して飼育した。

### 2-3 ラット肝実質細胞の単離と初代培養

ラット肝実質細胞の単離は当研究室で行っている *in situ* コラゲナーゼ還流法を用いた<sup>69)</sup>。

Wistar系雄性ラット(体重200~220 g)をペントバルビタール(50 mg/kg, i.p.)麻酔下で開腹し、門脈と下大静脈にカニューレーションを行い、前還流液、コラゲナーゼ液でそれぞれ還流し、肝臓の結合組織を消化させた。その肝臓を取り出し  $\text{Ca}^{2+}$ -free-Hanks 液で十分に肝細胞を分散させ、メッシュでろ過し、ろ液を  $50\times\text{g}$ 、600 rpm で1分間の遠心分離を2回行った。得られた肝実質細胞を5%Newborn calf serumを含むWilliams' medium Eに分散し、 $50\times\text{g}$ 、600 rpm で1分間の遠心分離を2回行い、肝実質細胞を単離、精製した。精製した肝実質細胞は、trypan blue 排除試験によって細胞の生死を判別し、97%以上の生存率のものを実験に用いた。単離した肝実質細胞は、コラーゲンコートしたプラスチックディッシュに、細胞密度が  $3.3\times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように調整し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで5% CO<sub>2</sub>、37°C条件下で、3時間培養し、肝実質細胞をディッシュに接着させた。培養3時間後、培地を血清不含 Williams' medium Eに替え、種々の薬物を添加しさらに培養した。

### 2-4 DNA 合成能の測定

Morley と Kingdon の方法<sup>36)</sup>に従い DNA 画分に取り込まれた<sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量を測定し、DNA 合成能を求めた。特異的<sup>3</sup>H-thymidine 量は  $10\ \mu\text{M}$  aphidicolin 共存下の計数量を差し引いて求めた。DNA 合成能としては単位時間、単位タンパク質当たり<sup>37)</sup>の<sup>3</sup>H-thymidine 量 (dpm/mg protein/h) で表した。

## 2-5 核数計測

無血清培地に交換後、直ちに種々の薬物を添加し、4~21 時間培養した肝実質細胞を phosphate-buffered saline (PBS) 2 mL で洗浄し、0.1% Triton X-100 溶液 0.1M クエン酸溶液 300  $\mu$ L で細胞膜を溶解し、裸核を得た。溶解した液を同量の 0.1% trypan blue で着色し、血球計算盤で核数を計測し、薬物による肝実質細胞の増殖を判定した<sup>938</sup>。この方法を用いたのは、培養した肝実質細胞が一度ディッシュに接着すると、酵素処理によっても容易に剥がれなくなり、細胞数を直接カウントするのが困難なためである。

## 2-6 受容体チロシンキナーゼ (RTK) および MAP キナーゼ (MAPK) 活性の測定

Towbin らの方法<sup>39)</sup>に従い、RTK 活性は、抗リン酸化抗 RTK モノクローナル抗体を用い、175 kDa の RTK 活性を、MAPK 活性は抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体を用い 42 kDa と 44kDa の MAPK (ERK2,ERK1) 活性を、各々 Western blot 解析法にて測定した。無血清培地に交換後、一定時間成長因子などで培養した肝実質細胞を PBS で洗浄し、lysis buffer (1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM DDT 含有 10 mM Tris, pH7.4) を加え、細胞を採取した。16,300g で遠心した上清画分を SDS-PAGE 電気泳動法にて分離後、PVDF 膜に転写した<sup>40)</sup>。転写膜上のリン酸化 RTK に対し、抗リン酸化 RTK モノクローナル抗体を、リン酸化 MAPK に対し、抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体を、各々一次抗体として、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体として、それぞれ反応させた。さらに、特異的に HRP で標識されたリン酸化 MAPK は、ECL キットを用いて発色させ、X線フィルムで検出した。黒化度の解析は、NIH image 6.20 を用いて行った。

## 2-7 細胞内 cAMP 濃度の測定

肝実質細胞内の cAMP 量は、cAMP ELISA assay kit と細胞内伝達物質測定システムを併用して測定した。細胞接着後、無血清培地に交換し、TNF- $\alpha$  や種々の薬物を添加して一定時間培養した肝実質細胞に、最終濃度 0.1M になるように 1N HCl を加え、反応を停止した。その細胞をラバーポリスマンでかきとり、1500  $\times$ g、5分で遠心分離し、上清を採取した。このサンプルを以下の ELISA 法により検出した。サンプルをマイクロプレートのウェルやプラスチックチューブ等の固相に、あらかじめ cAMP に対する抗体を結合させ、これに conditioned medium を添加し、サンプル中の cAMP を抗原抗体反応により固相に結合させた。夾雑物を流去後、酵素標識した第二の抗体を添加し再度抗原抗体反応させ、固相化抗体/目的物質/酵素標識抗体のサンドイッチ構造を構築させた。遊離の酵素標識抗体を流去後、発色基質を添加して固相化抗体/目的物質/酵素標識抗体に比例して起こる発色反応の発色物質の吸光度 (450nm) を細胞内伝達物質測定システムで測定し、濃度既知の標準品を用いて作成した標準曲線からサンプル中の目的物質を定量した<sup>4)</sup>

### 3 実験結果

#### 3-1 初代培養肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$ の増殖促進作用の経時変化

*in vitro* の成熟ラット初代培養肝実質細胞実験系において TNF- $\alpha$  が細胞増殖を促進するか否か、その経時変化を DNA 合成能 (S 期の指標とした) と核数の増加反応 (細胞数増加の指標とした) で検討した。図 1-2 には、肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$  の増殖促進作用の位相差顕微鏡写真像を示した。詳しい培養条件は、図の説明の項に記した。図 1-3 には TNF- $\alpha$  の初代培養肝細胞に対する DNA 合成能と核数の増加反応の経時変化を示したものである。単離した肝実質細胞をコラーゲンコートしたプラスチックディッシュに細胞密度が  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターを用い 5%CO<sub>2</sub> の条件下、37°C で培養し、肝実質細胞をディッシュに接着させた。培養 3 時間後、培養液を血清不含 Williams' medium E に替え、TNF- $\alpha$  を 30 ng/mL 添加し、さらに種々の時間培養して DNA 合成能と核数を測定した。その結果、DNA の合成能においては、添加後約 2.5 時間で、核数については、約 3 時間で有意に増加し、DNA の合成能が増加した後に核数が増加することを示した。DNA の合成能、核数共に約 3.5 時間で最大反応に達した後、24 時間まで増殖促進作用は持続した。またその最大反応はコントロール (TNF- $\alpha$  無処理群) と比較して DNA 合成能で最大約 6 倍、核数で最大約 1.2 倍の増加作用を示した。

#### 3-2 肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$ の増殖促進作用の用量 - 反応関係

図 1-3 で TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の増殖促進作用が見出されたので、肝細胞の培養時間を最大反応の見られた 4 時間に設定して、用量・反応関係を検討した。図 1-4 は、肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$  の用量・反応関係を検討したものである。細胞接着後、無血清培養液に培養液を交換後、直ちに種々の濃度の TNF- $\alpha$  を添加し、4 時間培養し、肝実質細胞の DNA 合成能と核数の用量・反応関係



を検討した。その結果、コントロール (TNF- $\alpha$  無処理群) と比較して、TNF- $\alpha$  による DNA の合成能および核数の変化は、各々 10ng/mL 付近から有意に増加を示し始め、用量依存的に増加して、30ng/mL 付近で最大反応となった。その反応は、コントロールと比較すると、DNA の合成能は最大約 6 倍、核数で約 1.2 倍の増加を示した。この DNA の合成能、核数の変化は 30 ng/mL 以上の濃度ではほぼ一定の増殖促進作用を示した。その結果、50%有効濃度 (EC<sub>50</sub> 値) は DNA 合成能、核数の変化において、共に 10.20  $\pm$  0.03 ng/mL であった。図 1-3 及び図 1-4 の結果から、最大反応の応答を観察するため刺激する TNF- $\alpha$  を 30 ng/mL の濃度に固定して添加し、無血清培養後、培養 4 時間および 21 時間後の DNA の合成能と核数を測定し、TNF- $\alpha$  の詳細な増殖能を検討することにした。

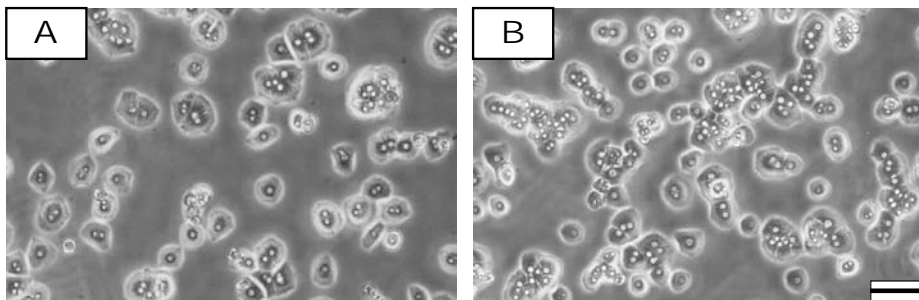


図 1-2 初代培養肝实质細胞における TNF- $\alpha$  の増殖促進作用：  
位相差顕微鏡像

A 図 : Control ; B 図 : TNF- $\alpha$  30 ng/mL

播種密度 : 3.3 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> 、培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間

撮影倍率 :  $\times$  50  $\mu$  m

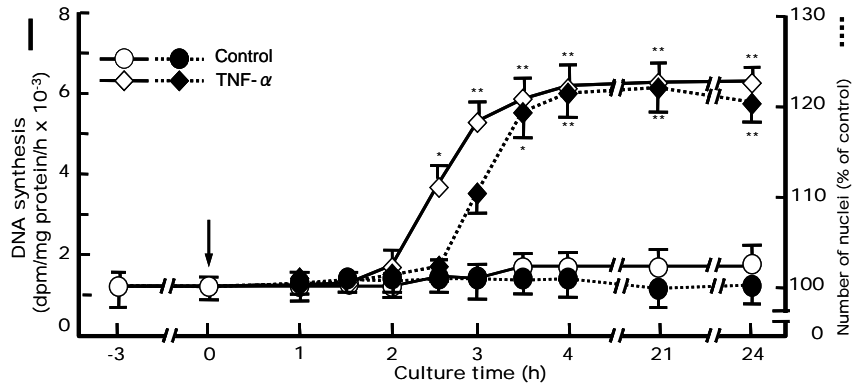


図 1-3 初代培養肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$  の増殖促進作用の経時的変化

播種密度： $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、薬物処理：TNF- $\alpha$  30 ng/mL

培養時間：無血清培地へ交換後 0～24 時間

有意差：Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、

\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

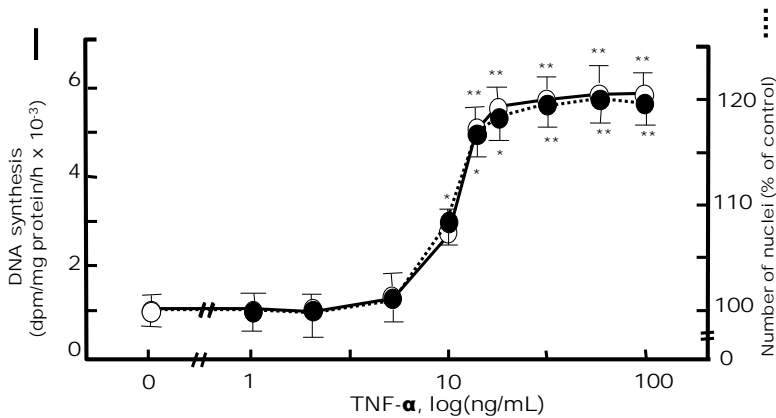


図 1-4 初代培養肝実質細胞に対する TNF- $\alpha$  の用量反応関係

播種密度： $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間：無血清培地へ交換後 4 時間

有意差：Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、

\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

EC<sub>50</sub> 値：DNA 合成能  $10.16 \pm 0.03$  ng/mL; 核数,  $10.31 \pm 0.14$  ng/mL

### 3-3 肝実質細胞における TNF- $\alpha$ の増殖促進作用に対する播種時の細胞密度の影響。

肝実質細胞における TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) の増殖促進作用について、播種時の細胞密度がどのように影響するかを、播種時の細胞密度を変えて、TNF- $\alpha$  による DNA 合成能と核数の変化を検討した。図 1-5 と図 1-6 は、肝実質細胞における TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) の増殖促進作用に対する播種時細胞密度の影響を示したものである。単離した肝実質細胞を様々な播種時密度で播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターを用い、5%CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養し、肝実質細胞をプラスチックディッシュに接着させた。培養 3 時間後、培地を血清不含 Williams' medium E に替え、TNF- $\alpha$  を 30 ng/mL 添加し、4 時間培養して、DNA 合成能(図 1-5)と核数(図 1-6)を測定した。その結果、DNA 合成能と核数の増加促進反応は、 $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> より低密度側から密度依存的に増加し、共に  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で最大反応を示した。それ以降の、高密度では、増殖反応は有意に低下した。よって、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) の肝実質細胞増殖促進作用は細胞密度に依存することが明らかとなった。図 1-5 と図 1-6 の結果から最大反応の応答が観察できる播種時の初代培養肝実質細胞を  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に固定し、以後の実験では、DNA の合成能および核数を測定することにより、TNF- $\alpha$  の詳細な増殖促進作用について検討することにした。

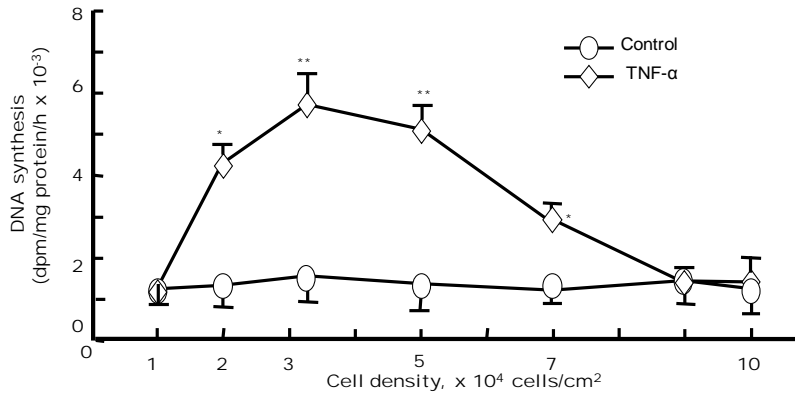


図 1-5 初代培養肝実質細胞における TNF- $\alpha$  の DNA 合成促進作用に対する播種時細胞密度の影響

薬物処理：TNF- $\alpha$  30 ng/mL、培養時間：無血清培地へ交換後 4 時間  
 有意差：Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、  
 \*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

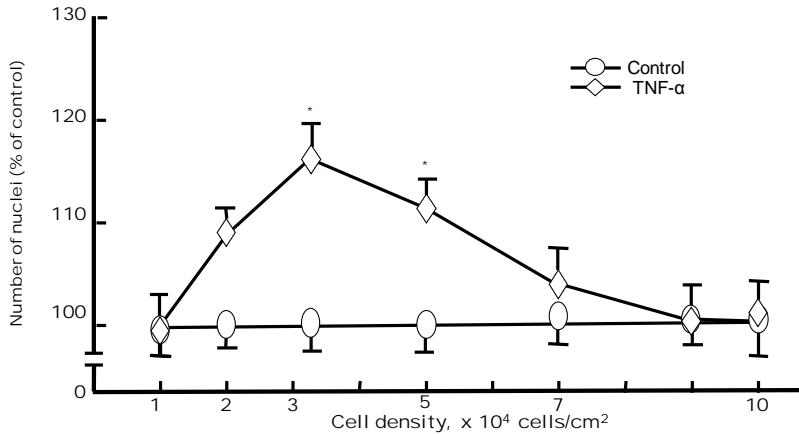


図 1-6 初代培養肝実質細胞における TNF- $\alpha$  の増殖促進作用に対する播種時細胞密度の影響

薬物処理：TNF- $\alpha$  30 ng/mL、培養時間：無血清培地へ交換後 4 時間  
 有意差：Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、  
 \*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-4 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対する抗 TNF 受容体モノクローナル抗体の作用

次に TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の増殖促進作用が、主に TNF- $\alpha$ のどちらの受容体サブタイプを介して発現しているのかについて、それぞれの受容体の特異的に中和するモノクローナル抗体を用いて検討した。図 1-7 と図 1-8 は、各 TNF- $\alpha$ 受容体サブタイプに対する特異的モノクローナル抗体 (mAb TNF 受容体 1、mAb TNF 受容体 2) を用いて、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の増殖促進作用 (DNA 合成能と核数の変化) に対する用量 - 反応関係を示した受容体中和実験を行った。その結果、TNF- $\alpha$  (30ng/mL) と mAb TNF 受容体 2 を併用

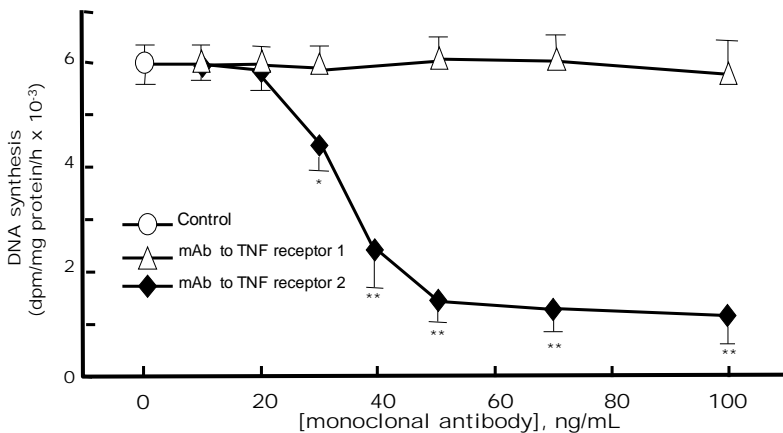


図 1-7 TNF- $\alpha$ による DNA 合成能促進作用に対する抗 TNF 受容体モノクローナル抗体及び抗 TNF 受容体 2モノクローナル抗体の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL

培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間

有意差 : TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01

(mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

IC<sub>50</sub> 値 : DNA 合成能 36.76 $\pm$ 0.03 ng/mL

すると、陽性コントロール (TNF- $\alpha$  処理群) と比較して、mAb TNF 受容体 2 は、その濃度が 30 ng/mL から用量依存的に有意に TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の DNA 合成能と核数の増加を抑制し、40 ng/mL でほぼコントロールと同程度にまで抑制した。一方、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) と mAb TNF 受容体 1 との併用では、TNF- $\alpha$  単独と比較して、mAb TNF 受容体 1 は、添加濃度 10 ng/mL ~100 ng/mL の間において、DNA 合成能および核数の変化に有意な差は示さなかった。すなわち、このことから、TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の増殖促進には、主として TNF 受容体 2 が関与していることを見出した (図 1-9)。

なお、mAb TNF 受容体 1 と mAb TNF 受容体 2 は、それぞれ単独に添加しても、ともに肝実質細胞の増殖には影響を及ぼさなかった (結果未提示)。

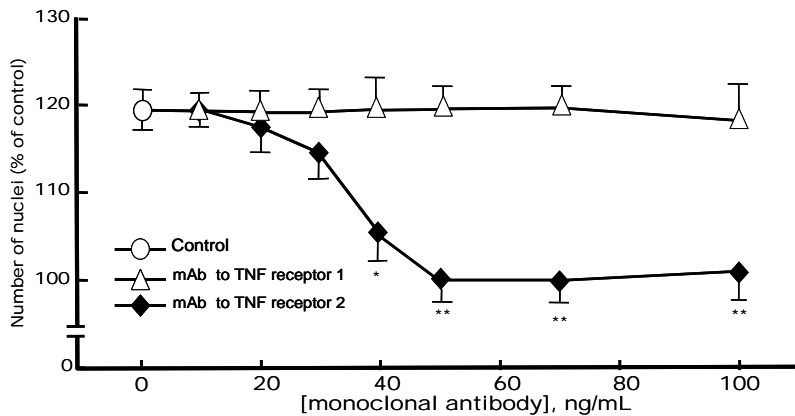


図 1-8 TNF- $\alpha$  による細胞増殖促進作用に対する抗 TNF 受容体 1 モノクローナル抗体及び抗 TNF 受容体 2 モノクローナル抗体の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、薬物処理 : TNF- $\alpha$  30 ng/mL、

培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間

有意差 : TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

IC<sub>50</sub> 値 : 核数の変化  $37.31 \pm 0.12$  ng/mL

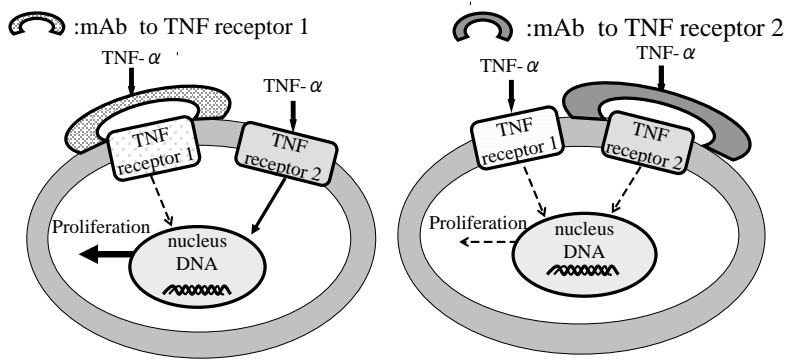


図 1-9 抗 TNF 受容体 1 モノクローナル抗体 1 及び 2 による受容体中和実験

### 3-5 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の作用

次に、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞のDNA合成及び細胞増殖のシグナル伝達機構を検討するために、アデニル酸シクラーゼ/Aキナーゼ系および受容体チロシンキナーゼ/MAPキナーゼ系における以下の特異的なシグナル伝達因子阻害薬（DDA：アデニル酸シクラーゼ阻害薬；H-89：Aキナーゼ阻害薬；AG1478：受容体チロシンキナーゼ阻害薬；LY294002：PI3キナーゼ阻害薬；PD98059：MAPキナーゼキナーゼ阻害薬；ラパマイシン：p70 S6キナーゼ阻害薬）を用いて、これらのシグナル伝達因子が関与しているかどうかを薬理的に検討した。図1-10と図1-11は、TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対する種々のシグナル伝達因子阻害薬の効果を示したものである。シグナル伝達阻害剤としては、 $10^{-7}$ M DDA（アデニル酸シクラーゼ阻害薬；<sup>42</sup>）、 $10^{-7}$ M H-89（Aキナーゼ阻害薬；<sup>43</sup>）、 $10^{-6}$ M ソマトスタチン（分泌顆粒共役アデニル酸シクラーゼの間接的阻害薬<sup>44</sup>）、1 ng/mL 百日咳毒素（Giタンパク阻害薬；<sup>45</sup>）、 $10^{-7}$ M AG1478（受容体チロシンキナーゼ阻害薬；<sup>46</sup>）、 $10^{-7}$ M LY294002（ホスファチジルイノシトール3キナーゼ阻害薬；<sup>47</sup>）、 $10^{-6}$ M PD98059（MAPKK阻害薬；<sup>48</sup>）、100 ng/mL ラパマイシン（p70リボソーマルS6キナーゼ阻害薬；<sup>49</sup> <sup>50</sup>）をそれぞれ単独で添加した。コントロールと比較してこれら特異的シグナル伝達阻害剤は、どれも単独では肝実質細胞のDNA合成と核数の変化には影響を及ぼさなかった。

次にTNF- $\alpha$ （30 ng/mL）による肝実質細胞増殖促進作用のシグナル伝達経路を検討する目的で、シグナル伝達因子阻害剤を併用添加した。TNF- $\alpha$ （30 ng/mL）による肝実質細胞のDNA合成と核数の変化は、共に $10^{-7}$ M AG1478、 $10^{-7}$ M LY294002、 $10^{-6}$ M PD98059、100 ng/mL ラパマイシンによりほぼ完全に抑制された。これらの結果は、TNF- $\alpha$ （30 ng/mL）添加による増殖促



進作用が、受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ経路に、完全に依存していることを示唆した。また、培養4時間において、 $10^{-7}\text{M}$  DDA、 $10^{-7}\text{M}$  H-89、 $10^{-6}\text{M}$  ソマトスタチンは、 $\text{TNF-}\alpha$  (30 ng/mL) による肝実質細胞の DNA 合成と核数の増加が、コントロールレベルまで、著しく抑制された。さらに、この  $10^{-6}\text{M}$  ソマトスタチンの  $\text{TNF-}\alpha$  の増殖促進作用に対する抑制効果は、Gi タンパク質活性を阻害する 1 ng/mL 百日咳毒素の前処理によって完全に解除された。これらの結果は、アデニル酸シクラーゼ阻害薬/A キナーゼ経路が、 $\text{TNF-}\alpha$  (30 ng/mL) による肝実質細胞の DNA 合成と増殖促進作用に深く関与することを示唆していた。

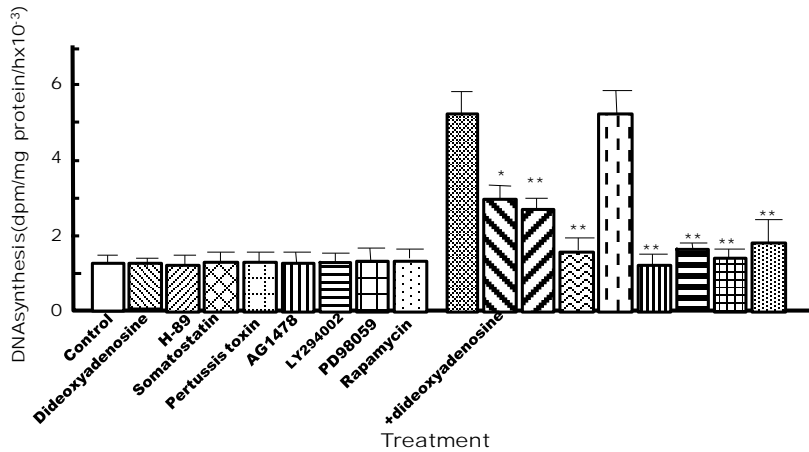


図 1-10 TNF- $\alpha$ の DNA 合成促進作用に対するシグナル伝達因子阻害剤の作用

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間  
 薬物処理 : TNF- $\alpha$  30 ng/mL; dideoxyadenosine,  $10^{-7}$  M; H-89,  $10^{-7}$  M;  
 somatostatin,  $10^{-6}$  M; pertussis toxin 1 ng/mL; AG1478,  $10^{-7}$  M;  
 LY294002,  $10^{-7}$  M; PD98059,  $10^{-6}$  M; rapamycin, 100 ng/ml.  
 有意差 : TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

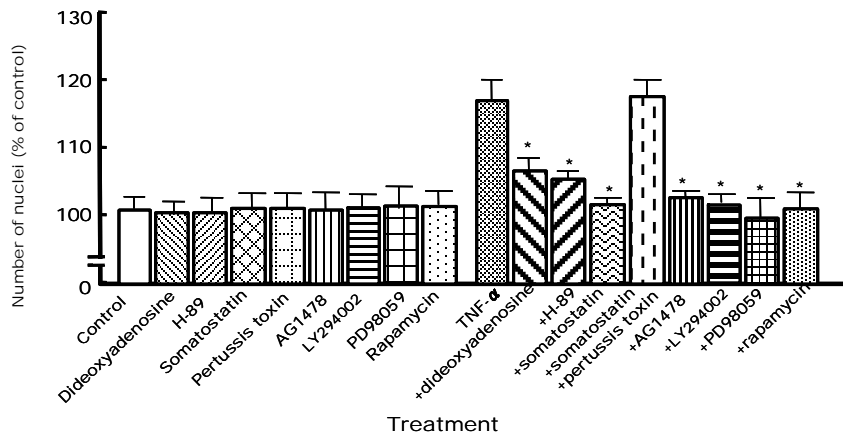


図 1-11 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対するシグナル伝達因子阻害剤の作用

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間  
 薬物処理 : TNF- $\alpha$  30 ng/mL; dideoxyadenosine,  $10^{-7}$  M; H-89,  $10^{-7}$  M;  
 somatostatin,  $10^{-6}$  M; pertussis toxin 1 ng/mL; AG1478,  $10^{-7}$  M;  
 LY294002,  $10^{-7}$  M; PD98059,  $10^{-6}$  M; rapamycin, 100 ng/ml.  
 有意差 : TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-6 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞受容体チロシンキナーゼ活性に対する効果

前節では、肝実質細胞の DNA 合成能と核数の変化を指標にして、TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用のシグナル伝達因子機構を検討するために、特異的シグナル伝達因子阻害剤を用いて薬理的検討を行った(図 1-10 と図 1-11)。その結果、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の増殖促進作用が、受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ経路に完全に依存することが示唆された。そこで、本節では、種々の特異的シグナル伝達阻害剤を用いて、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の受容体チロシンキナーゼ活性を Western blot 解析法にて、直接測定した。その結果、TNF- $\alpha$ による p175kDa 受容体チロシンキナーゼ (RTK) 活性促進作用は、RTK 阻害薬の AG1478 (10<sup>-7</sup>M) によって、コントロールレベルまで著しく抑制された。これに対し、PI3K 阻害薬の LY294002 (10<sup>-6</sup>M) と MEK 阻害薬の PD98059 (10<sup>-6</sup> M) は、TNF- $\alpha$ の受容体チロシンキナーゼの活性促進作用に影響を及ぼさず、PI3K と MEK は、TNF- $\alpha$ の増殖促進作用のシグナル伝達において、RTK の下流に位置していることが示唆された。さらに、TNF- $\alpha$ の受容体チロシンキナーゼの活性促進作用は、ソマトスタチン (10<sup>-7</sup>M) により AG1478 と同様に、コントロールレベルにまで完全に抑制された。このソマトスタチンの抑制効果は、百日咳毒素の前処理により解除された。すなわち、肝実質細胞において TNF- $\alpha$ の TNF 受容体 2 を介した増殖のシグナル伝達機構には、アデニル酸シクラーゼ/Aキナーゼ系も介することが示唆された。なお、これらの伝達因子阻害薬それぞれ単独では、肝実質細胞の 175kDa 受容体チロシンキナーゼのリン酸化活性には影響を及ぼさなかった (図 1-12)。

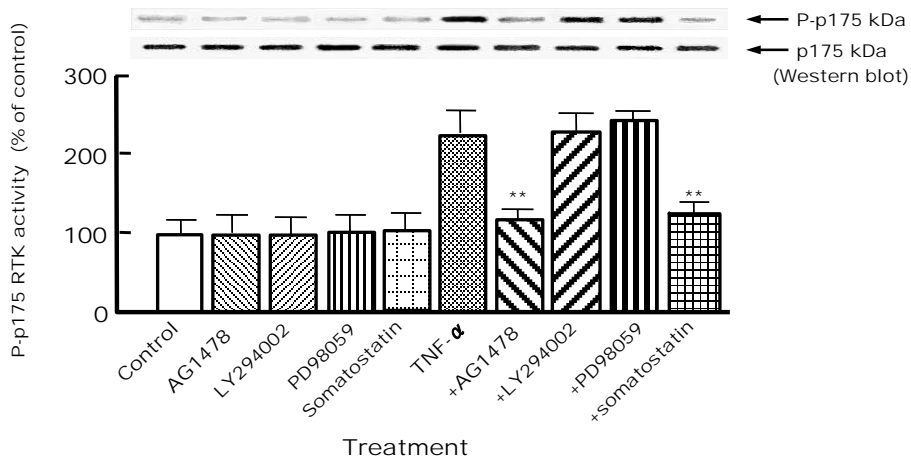


図 1-12 TNF- $\alpha$ による受容体チロシンキナーゼ活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害剤の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 10 分

薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; AG1478,  $10^{-7}$  M; LY294002,  $10^{-7}$  M; PD98059,  $10^{-6}$  M; somatostatin,  $10^{-6}$  M

有意差 : TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-7 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞 MAP キナーゼ活性に対する効果

3-6 では、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の 175 kDa 受容体チロシンキナーゼを Western blot 解析にて直接測定した結果、3-5 で示唆された TNF- $\alpha$ の TNF 受容体 2 を介した増殖のシグナル伝達に、RTK の直接的な関与と、その下流に PI3K と MAP キナーゼが存在している可能性が示唆された(図 1-12)。そこで、特異的シグナル伝達阻害剤を用いて、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の MAP キナーゼ活性に対する効果を、Western blot 解析法にて直接測定した。その結果、まず TNF- $\alpha$ の肝実質細胞 MAP 活性は、p42 kDa MAPK (ERK)を特異的に活性化した。一方、p44 kDa MAPK (ERK1) 活性には影響を及ぼさなかった。次に、シグナル伝達因子の特異的阻害薬である AG1478、LY29002、PD98059 およびソマトスタチンを用い、TNF- $\alpha$ による p42 MAP キナーゼ活性促進作用に対する効果を検討した。その結果、TNF- $\alpha$ による p42 kDa MAPK 活性促進作用は、RTK 阻害薬の AG1478、PI3K 阻害薬の LY294002 と MEK 阻害薬の PD98059 により、それぞれ、コントロールレベルまで、完全に抑制された。すなわち、TNF- $\alpha$ の TNF 受容体 2 を介する肝実質細胞増殖促進作用のシグナル伝達には、p42 kDa MAPK 活性化が深く関与しており、その上流に、RTK と PI3K が、その下流に p70S6K が位置していることが示された。さらに、TNF- $\alpha$ の p42 kDa MAPK 活性促進作用は、RTK 同様、ソマトスタチンにより、コントロールレベルにまで完全に抑制され、RTK 同様、肝実質細胞において TNF- $\alpha$ の TNF 受容体 2 を介した増殖のシグナル伝達に、アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系も介することがさらに示唆された。なお、これらの伝達因子阻害薬単独では、肝実質細胞の p42 および p44 MAPK のリン酸化活性には影響を及ぼさなかった(図 1-13)。

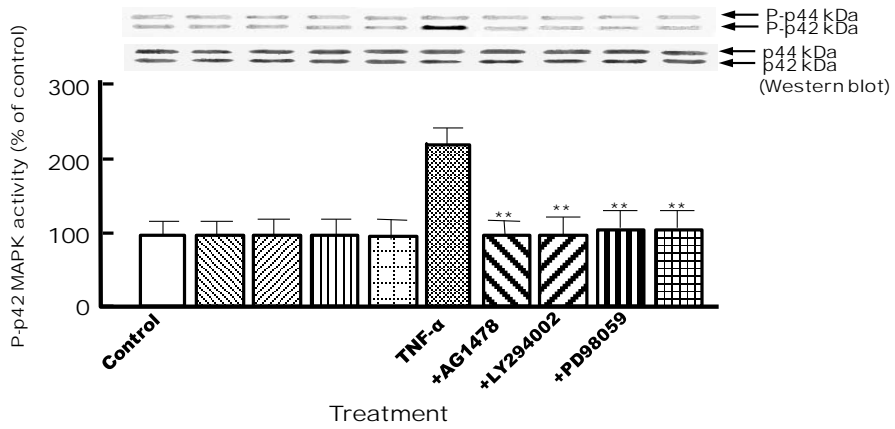


図 1-13 TNF- $\alpha$ による MAP キナーゼ活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害剤の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 10 分  
 薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; AG1478,  $10^{-7}$  M; LY294002,  $10^{-7}$  M; PD98059,  $10^{-6}$  M; somatostatin,  $10^{-6}$  M  
 有意差: TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-8 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞内 cAMP 濃度に対する作用の経時変化

図 1-10 と図 1-11 における、TNF- $\alpha$  の肝実質細胞の DNA 合成能と核数に対する効果の検討において、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) は、TNF 受容体 2 を介して、促進性 G タンパク質 (Gs) / アデニル酸シクラーゼを活性化させて細胞内の cAMP を増加させることが示唆された。そこで、このことを証明するために TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による肝実質細胞内 cAMP 濃度の変化を直接測定した。

図 1-14 は、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) 添加による肝実質細胞内 cAMP 濃度の経時変化を示したものである。無血清培地交換 10 分後に、無血清培地のコントロール群の肝実質細胞内 cAMP 濃度は  $2.00 \pm 0.02$  pmol/mg protein であったのに対して、TNF- $\alpha$  30 ng/mL 添加群の肝実質細胞内 cAMP 濃度は、 $4.00 \pm 0.02$  pmol/mg protein と有意な増加が認められ、添加 25 分後には、最大応答を示し、コントロール群の約 4 倍の増加を示した。このことから、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) は、アデニル酸シクラーゼを活性化させて細胞内の cAMP 濃度を有意に増加させることが、直接的に証明された。

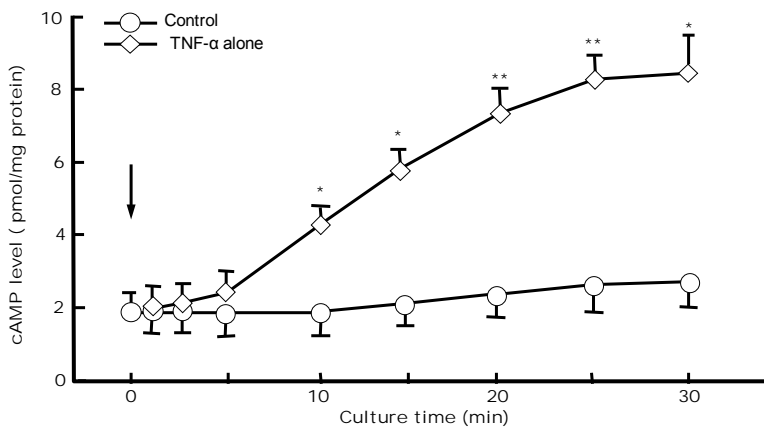


図 1-14 TNF- $\alpha$  による細胞内 cAMP レベルの経時変化

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 0-30 分

薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL

有意差 : Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-9 ホスフォジエステラーゼ阻害剤存在下における肝実質細胞内 cAMP 濃度に対する TNF- $\alpha$ の効果

図 1-14 の結果から、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による肝実質細胞内の DNA 合成能と増殖促進作用が、アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系を活性化させて細胞内の cAMP 濃度を増加させることが示されたため、ホスフォジエステラーゼ阻害剤 IBMX<sup>5)</sup> 存在下における TNF- $\alpha$  による細胞内 cAMP レベルの蓄積効果を検討した。図 1-15 は、ホスフォジエステラーゼ阻害剤 IBMX 存在下における細胞内 cAMP レベルへの蓄積における TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) の効果を示したものである。IBMX 存在下、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による肝実質細胞の細胞内 cAMP レベルは、TNF- $\alpha$  添加後、5 分から 10 分で急激に蓄積がおり、20 分で最大反応 (コントロールの 15 倍) を示した。TNF 受容体 2 を介する TNF- $\alpha$  の肝実質細胞増殖促進シグナルには、アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系の活性化が深く関与していることが、IBMX 存在下での TNF- $\alpha$  による細胞内の cAMP 蓄積を増強させたことからより強く支持された。

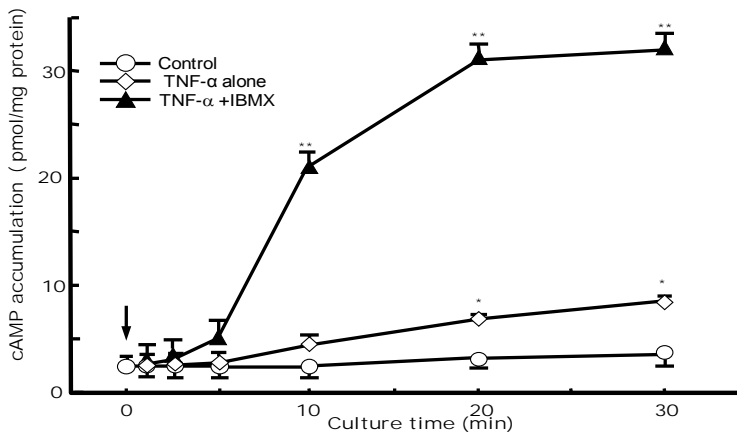


図 1-15 TNF- $\alpha$  の細胞内 cAMP レベル増加作用に対するホスフォジエステラーゼ阻害薬の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 0-30 分

薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; IBMX,  $10^{-4}$  M

有意差: Control (TNF- $\alpha$  無処理群)に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)



## 第一章 考察

図 1-3 と図 1-4 に示したように、TNF- $\alpha$  の添加により初代培養肝実質細胞は、時間依存的にまた、用量依存的に増殖を促進することを見出した。TNF 受容体 1、及び TNF 受容体 2 に対する、それぞれ特異的なモノクローナル抗体を用いた実験により、DNA 合成と細胞増殖が、抗 TNF 受容体 1 抗体でなく抗 TNF 受容体 2 抗体に強く影響を受けることを見出した。このことから、TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の増殖促進作用には、主として TNF 受容体 2 が関与していることが明らかになった。今回の結果に一致して、Tartaglia や他の研究グループでは、*in vitro* の実験において、TNF 受容体 1 でなく、TNF 受容体 2 が、げっ歯類の胸腺細胞の増殖を促進することを報告している<sup>18)52)</sup>。これに対して、Yamada らは、TNF 受容体 1 ノックアウトマウスを用いて、部分肝切除や肝臓毒である化学物質を用いた肝再生実験を行ったところ、肝再生は強く抑制されることを見出した。この、*in vivo* の結果は、肝再生に TNF 受容体 1 が、関与していることを示している<sup>31) -33)</sup>。彼らの研究結果と *in vitro* での研究結果との矛盾の理由は、現時点で不明であるが以下のことが考えられる。1) 動物種が異なること、2) 実験条件が異なること、3) ノックアウトマウスの実験では、TNF 受容体 2 あるいは、TNF 受容体 1 及び 2 をノックアウトした動物での検討結果が必ずしも明確でないことなどがあげられ、全体像の解明には、今後の研究を待たなければならない。しかし、本論文におけるそれぞれの TNF- $\alpha$  受容体サブタイプに対して特異的なモノクローナル抗体を用いた受容体の中和実験結果では、TNF- $\alpha$  による初代培養肝実質細胞の増殖促進作用には、主に TNF 受容体 2 が関与していることを明確に示していることから、次に、TNF 受容体 2 を介する肝実質細胞の増殖促進作用の、細胞内シグナル伝達機構を詳しく検討することにした。

細胞の増殖に関与するシグナル伝達因子は、しばしば、リン酸化反応により調

節されていることが知られている<sup>53)54)</sup>。特に、受容体チロシンキナーゼ/MAPキナーゼ系が重要な役割を果たすことは良く知られている。この過程は、細胞増殖の信号が、細胞膜から核にまで伝達されるためにきわめて重要である。しかし、他の多くの成長因子(例、HGF や EGF)とは異なり、TNF 受容体2は、細胞膜領域にチロシンキナーゼ領域を持っていないとされている<sup>55)</sup>。TNF 受容体1に TNF- $\alpha$  が結合すると受容体に会合するチロシンキナーゼを活性化し、受容体をリン酸化することが知られているが、TNF 受容体2を介する細胞内シグナル伝達経路の大部分は、不明のままである。TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖のシグナル伝達機構を検討するために、受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ系のシグナル伝達因子に対する以下の特異的な阻害薬 (AG1478 : 受容体チロシンキナーゼ阻害薬; LY294002 : PI3 キナーゼ阻害薬; PD98059 : MAP キナーゼキナーゼ阻害薬; ラパマイシン : p70 S6 キナーゼ阻害薬) を用いて、それらのシグナル伝達因子が関与しているかどうかを薬理的に検討した。図 1-10 と図 1-11 に示したように、TNF- $\alpha$  (30 ng/ml) による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖促進作用は、これらの阻害薬によりそれぞれほぼ完全に抑制されることが見出された。これらの結果は、TNF- $\alpha$  による TNF 受容体2を介する肝実質細胞の増殖促進作用には、受容体チロシンキナーゼ、PI3 キナーゼ、MAP キナーゼキナーゼ、p70 S6 キナーゼの活性化が関与していることを示唆している。その結果をさらに支持する目的で、MAP キナーゼ (MAPK) 及び受容体チロシンキナーゼ活性を直接測定した。図 1-12 と図 1-13 に示したように、TNF- $\alpha$  は、実際に受容体チロシンキナーゼ (p175kDa)、p42 MAP キナーゼを活性化することが見出された。本論文の結

果と同様に、Vietor らは、TNF- $\alpha$  がヒト線維芽細胞の MAP キナーゼを活性化することを見出している<sup>56)</sup>。

別の、よく知られたシグナル伝達経路としては、G タンパク質に共役した受容体が、アデニル酸シクラーゼを活性化（あるいは、抑制）して、細胞内 cAMP 濃度を変化させて、タンパク質キナーゼ A（A キナーゼ）活性を調節して代謝や成長を制御するというものがある<sup>57)</sup>。しかし、TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の増殖促進作用におけるアデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系の役割については不明な点が多い。TNF- $\alpha$ （30 ng/ml）による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖のシグナル伝達機構を検討するために、アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系における以下の特異的なシグナル伝達因子阻害薬（dideoxyadenosine：アデニル酸シクラーゼの直接的阻害薬；ソマトスタチン：アデニル酸シクラーゼの間接的阻害薬、H-89：A キナーゼの阻害薬）を用いて、それらのシグナル伝達因子が関与しているかどうかを薬理的に検討した。図 1-10 と図 1-11 に示したように、TNF- $\alpha$ （30 ng/ml）による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖促進作用は、これらの阻害薬によりそれぞれほぼ完全に抑制されることが見出された。そこで、新たに見出されたシグナル伝達経路をさらに確認するために、ソマトスタチンを用いてその作用を検討した。ソマトスタチンは、内分泌線からのホルモンの分泌を抑制する物質としてよく知られている。このソマトスタチンによる抑制効果は、抑制性 G タンパク質（Gi）を介して、アデニル酸シクラーゼ活性を低下させることに起因している。図 1-10 と図 1-11 で示したように、TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖促進作用が、ソマトスタチンによりほぼ完全に抑制されることが見出され、この抑制作用が百日咳毒

素の前処理により解除された。百日咳毒素は、Gi タンパク質の活性の特異的阻害剤であり、受容体と効果器へのシグナル伝達を特異的に遮断することが知られていることから、このソマトスタチンによる抑制効果は、抑制性 G タンパク質 (Gi) を介して、アデニル酸シクラーゼ活性を低下させることにより起因していることが確認された。これらの事実を総合すると、TNF- $\alpha$  による TNF 受容体 2 を介する肝実質細胞の増殖促進作用には、アデニル酸シクラーゼ、A キナーゼの活性化が関与していることが支持された。これらの結果をさらに支持するデータとして、図 1-14 および図 1-15 では、TNF- $\alpha$  (30 ng/ml) により肝実質細胞内の cAMP 濃度が急速にかつ有意に増加することを見出した。TNF- $\alpha$  による細胞内 cAMP 濃度増加作用については、Zhang らがヒトの線維芽細胞を用いた実験でも示している<sup>58)</sup>。

上記の結果は、TNF- $\alpha$  による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖促進のシグナル伝達機構に、受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ系、及びアデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系が深く関与していることを初めて示したものである。ホルモンなどの分泌阻害剤として知られるソマトスタチンを用いた実験結果から、TNF- $\alpha$  の肝実質細胞 DNA 合成及び増殖促進作用には何らかの増殖因子 (メディエーター) が自己分泌されている可能性が見出されたが、これらの 2 つのシグナル伝達経路の関連性については不明であり、さらに詳しく検討する必要がある。

## 第二章 腫瘍壊死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) によるラット初代培養肝細胞からのトランスフォーミング成長因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) の分泌に対する作用

### 1 緒言

本論文の第一章においては、TNF- $\alpha$  (30ng/mL) の刺激によりラット初代培養肝実質細胞の増殖が、TNF 受容体2を介して促進されることが新たに見出された。また、TNF 受容体2を介して促進される増殖応答には、(1) アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系が関与していること、(2) 受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ系が関与していることが示唆された。そして、ホルモンなどの分泌阻害剤として知られるソマトスタチンを用いた実験結果から、TNF- $\alpha$  の肝実質細胞 DNA 合成及び増殖促進作用には何らかの増殖因子 (メディエーター) が自己分泌されている可能性が見出されたことから、本章では、TNF- $\alpha$  により自己分泌される増殖因子の探索とそのオートクリン分泌機構を生化学・薬理学的手法を用いて解明することを目的とした。

初代培養肝実質細胞内で生合成・貯蔵され、何らかの刺激でオートクリン分泌される成長因子の候補としては、IGF-I 及び TGF- $\alpha$  が知られている。最近、サイトカインが、肝実質細胞の増殖を促進したり抑制したりすることに関して詳しく研究されてきている<sup>59)</sup>。その中で TGF- $\alpha$  の検討も行われている。TGF- $\alpha$  はオートクリン因子とされており、癌化した線維芽細胞の培養液中に発見されたものである<sup>60)</sup>。さらに、TGF- $\alpha$  は、幼若、新生そして成熟ラットの肝部分切除後の肝臓に存在することが報告されている<sup>61)62)</sup>。TGF- $\alpha$  は、色々な細胞種において、単に癌化の因子としてだけでなく、正常な細胞の生理的な増殖にも重要な役割を果たしているものとして知られている<sup>63)</sup>。TGF- $\alpha$  による肝実質細胞の増殖促進のシグナル伝達機構について及び $\alpha$ 、 $\beta$  アドレナリン受容体作動薬との相互作用については、すでに報告がある<sup>13)</sup>。

また、インスリン様成長因子 (IGF) は、ポリペプチドホルモンファミリーの1つであり、インスリンと構造と機能がよく似ているとされている<sup>64)</sup>。IGFペプチドはオートクリン因子として働き、胎児の成長の調節及び *in vitro* 系で肝細胞及びその他の株化細胞の増殖促進に関与しているといわれている<sup>65)66)</sup>。IGF-I の生理的な作用は細胞膜の特異的な受容体に結合して発現するとされている<sup>67)</sup>。IGF-I (及び IGF-II) の肝実質細胞の増殖促進作用及びそのシグナル伝達機構について、さらに  $\alpha$ 、 $\beta$  アドレナリン受容体作動薬との相互作用については、すでに報告がある<sup>12)</sup>。

そこで、第二章において検討する具体的な項目を以下のように設定した。すなわち、(1) TNF- $\alpha$ により肝実質細胞より自己分泌される増殖因子が何であるかの対応するモノクローナル抗体を用いた検討、(2) TNF- $\alpha$ により分泌されるオートクリン因子の分泌の経時変化、及び用量-反応関係 (3) TNF- $\alpha$ の用量とオートクリン因子の分泌反応との関係の検討、(4) TNF- $\alpha$ によるオートクリン因子の分泌が TNF- $\alpha$ により TNF受容体2を介するのか否かの検討、(5) TNF- $\alpha$ によるオートクリン因子分泌のシグナル伝達経路について検討することにした。そして、これらの検討結果から、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞増殖促進作用機構の一連の全体像を明らかにすることを試みた。

## 2 実験材料及び実験方法

### 2-1 実験材料及び試薬

第一章の実験材料及び試薬の項目に準じた。

### 2-2 実験動物

第一章の実験動物の項目に準じた。

### 2-3 ラット肝実質細胞の初代培養

第一章のラット肝実質細胞の初代培養の項目に準じた。

### 2-4 DNA 合成能の測定

第一章の DNA 合成能の測定の項目に準じた。

### 2-5 核数計測

第一章の核数計測の測定の項目に準じた。

### 2-6 MAP キナーゼ (MAPK) 活性の測定

第一章の MAP キナーゼ (MAPK) 活性の測定の項目に準じた。

### 2-7 トランスフォーミング成長因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ) の測定

培養液中の TGF- $\alpha$  の測定は、TGF- $\alpha$  ELISA assay kit と細胞内伝達物質測定システムを併用して測定した。細胞接着後、無血清培地に交換し、TNF- $\alpha$  や種々の薬物を添加して一定時間培養した。肝実質細胞を培養した conditioned medium から一定量をサンプルリングし、ELISA 用プレートに既

知量を分取し、その中の TGF- $\alpha$  を抗原抗体反応により固相に結合させた。夾雑物を流去後、酵素標識した第二の抗体を添加し再度抗原抗体反応させ、固相化抗体/目的物質/酵素標識抗体のサンドイッチ構造を構築させた。遊離の酵素標識抗体を流去後、発色基質 を添加して固相化抗体/目的物質/酵素標識抗体に比例して起こる発色反応の発色物質の吸光度 (450 nm) を細胞内伝達物質測定システムで測定し、濃度既知の標準品を用いて作成した標準曲線からサンプル中の目的物質を定量した<sup>68)</sup>。



### 3 実験結果

#### 3-1 肝実質細胞における TNF- $\alpha$ による p42 kDa MAPK 活性促進作用の経時変化

TNF- $\alpha$  による p42 kDa MAPK 活性の経時変化を、肝実質細胞の増殖を促進させる因子としてよく知られている TGF- $\alpha$ <sup>13)</sup>と比較して、検討した。その結果、TGF- $\alpha$  (5 ng/ml) を添加した培養では、約 5 分を頂点とする急激な一過性の活性促進作用が認められた。これに対し、TNF- $\alpha$  (30 ng/ml) の p42 kDa MAPK 活性化促進作用は、刺激後、それよりも遅れて発現し、20 分を頂点とする活性上昇が認められ、その後、緩やかな低下が認められた。そして、この TNF- $\alpha$  による活性上昇は、抗 TNF 受容体 2 モノクローナル抗体 (50 ng/mL) やソマトスタチン( $10^{-6}$  M)共存下で、それぞれ完全に抑制された。すなわち、TNF- $\alpha$  刺激による p42 kDa MAPK 活性の促進作用は、発現までに約 15 分の遅延時間が生じたことから、TNF- $\alpha$  の増殖シグナル伝達経路は、TGF- $\alpha$  のような RTK や MAPK などの増殖関連因子と直性連関しているシグナル伝達系とは異なり、何らかの因子を分泌し、その結果、細胞外に分泌された因子が肝実質細胞に対して増殖促進作用を示している可能性が示唆された(図 2-1)。

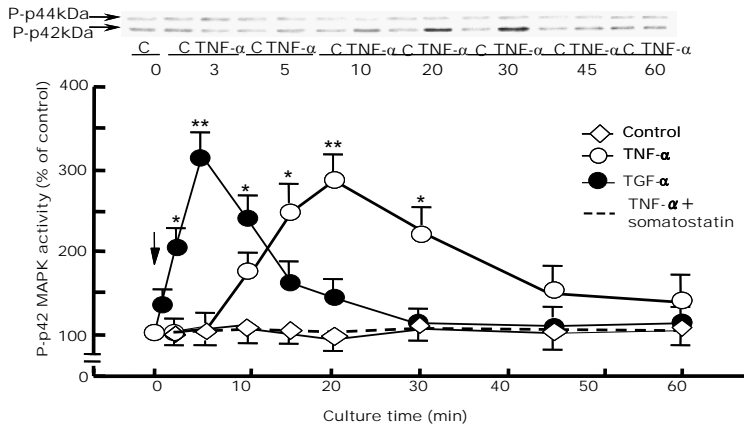


図 2-1 初代培養肝細胞における TNF- $\alpha$  による p42 MAP キナーゼ活性促進作用の経時変化

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 0-60 分  
 薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; TGF- $\alpha$ , 5 ng/mL; somatostatin,  $10^{-6}$  M.  
 有意差 : Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01  
 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-2 TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対するモノクローナル抗 IGF-I 抗体, モノクローナル抗 TGF- $\alpha$ 抗体の作用

第一章により、TNF- $\alpha$ の肝実質細胞に対する増殖促進作用のシグナル伝達機構の中には、TNF 受容体 2 を介したアデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系と受容体(175 kDa)チロシンキナーゼ/MAPK系の少なくとも主要な2系統の伝達機構が含まれることが明らかとなった。これらの系列は、受容体チロシンキナーゼの特異的なシグナル伝達因子阻害薬の AG1478 で完全に抑制されたことと、分泌ゲート連関阻害薬であるソマトスタチンで増殖促進作用と各種キナーゼ活性が抑制されたことから次のような作業仮説を考えた。すなわち、TNF 受容体 2 を介する肝細胞増殖促進作用は、ある増殖因子が、オートクリン分泌され、それが肝実質細胞の DNA 合成と増殖を刺激するものであると仮定した。肝実質細胞には、TGF- $\alpha$ か IGF-I が存在することが明らかとなっており肝実質細胞からオートクリン分泌される増殖因子の候補としては、これらの増殖因子がこの仮説に合致する有力な候補であると考えられた。そこで TGF- $\alpha$ か IGF-I が、TNF- $\alpha$ による初代培養肝実質細胞の DNA 合成能と細胞増殖促進作用に関係しているのか否かを、IGF-I または TGF- $\alpha$ を特異的に中和するモノクローナル抗体を用いて中和実験を行った。

図 2-2 と図 2-3 は、TNF- $\alpha$ の肝実質細胞増殖促進作用に対するモノクローナル抗 IGF-I 抗体, モノクローナル抗 TGF- $\alpha$ 抗体の作用を示したものである。抗 TGF- $\alpha$ モノクローナル抗体は TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の DNA 合成能と核数の増加を IC<sub>50</sub> 値 36.76 $\pm$ 0.03ng/mL で用量依存的に抑制し、抗体濃度が 50 ng/mL 以上の用量では、TNF- $\alpha$ の増殖促進効果は、完全に抑制された。一方、抗 IGF-I モノクローナル抗体には TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の DNA 合成能と核数の増加に有意な影響はなかった。したがって、これらの結果より TNF- $\alpha$ は、培養培地中へ TGF- $\alpha$ を分泌させることによって、肝実質細胞の DNA 合

成能と細胞増殖促進作用を示すことが示唆された(図 2-4)。

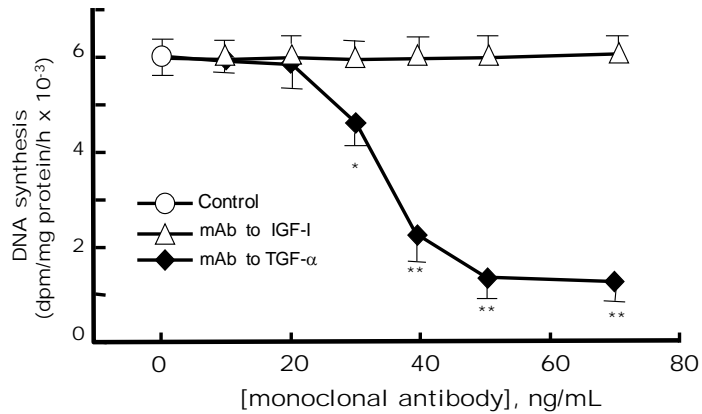


図 2-2  $\text{TNF-}\alpha$ による肝実質細胞 DNA 合成促進作用に対する抗  $\text{TGF-}\alpha$ 抗体および抗 IGF-I 抗体の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間  
薬物処理 :  $\text{TNF-}\alpha$ , 30 ng/mL; mAb to IGF-I, 10-75 ng/mL; mAb to  $\text{TGF-}\alpha$ , 10-75 ng/mL  
有意差  $\text{TNF-}\alpha$  処理群に対する有意差、\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)  
 $\text{IC}_{50}$  値 : DNA 合成能  $36.76 \pm 0.03$  ng/mL

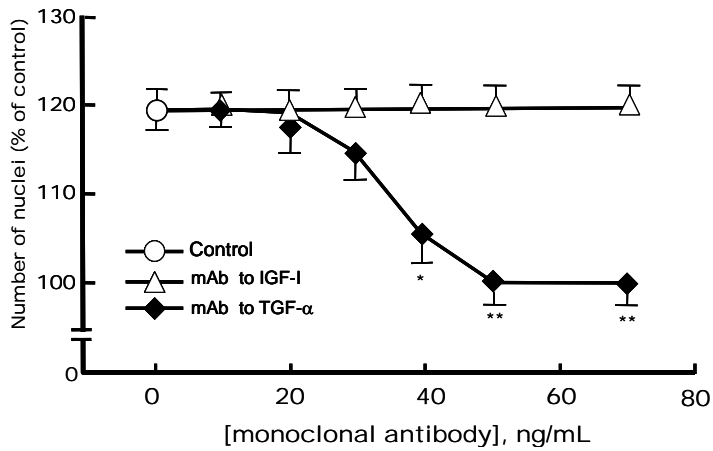


図 2-3 TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の核数増加作用に対する抗 TGF- $\alpha$ 抗体および抗 IGF-I 抗体の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 4 時間

薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; mAb to IGF-I, 10-75 ng/mL;

mAb to TGF- $\alpha$ , 10-75 ng/mL

有意差 TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01

(mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

IC<sub>50</sub> 値 : 核数, 37.31 $\pm$ 0.12 ng/mL

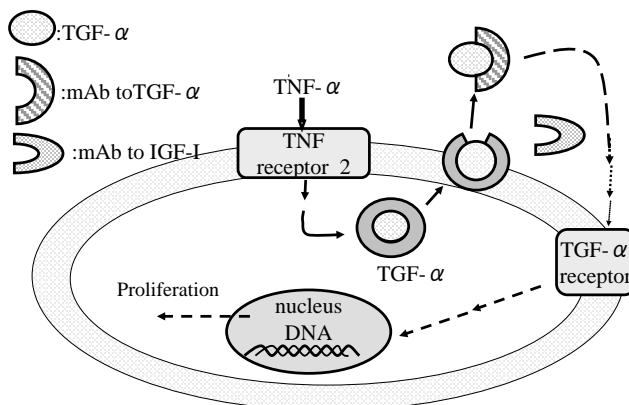


図 2-4 TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ または、IGF-I の自己分泌機構

### 3-3 TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ 分泌促進作用の経時変化及び用量-反応関係

*In vitro* の実験系において、TNF- $\alpha$ を添加し、肝実質細胞を培養した際に、実際に培養液中へ TGF- $\alpha$ を分泌させるかどうかを、高感度 ELISA 法で定量することは、先の作業仮説を実証する手段と考えた。図 2-5 は、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) 添加による培養液中での TGF- $\alpha$ 濃度の経時変化を示したものである。TNF- $\alpha$ を添加しないコントロール群では、培養液中の TGF- $\alpha$ 濃度は検出限界の 2 pg/mL 前後とほぼ一定であった。これに対し、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) 単独で刺激をすると、培養液中の TGF- $\alpha$ 濃度は、TNF- $\alpha$ 添加後 3 分で検出可能な有意な増加が認められた。この有意な TGF- $\alpha$ 濃度の増加は、TNF- $\alpha$ 刺激後、10 分から 30 分まで増加し、一定となり、コントロールの 10 倍に上昇した。一方、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) と抗 TNF 受容体 2 モノクローナル抗体を併用すると、培養液中の TGF- $\alpha$ 濃度の有意な上昇は認められず、抗 TNF 受容体 2 抗体により TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ の自己分泌作用が完全に抑制された。さらに、抗 TNF 受容体 1 モノクローナル抗体を併用した際は、TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ の自己分泌作用は、TNF- $\alpha$ 単独と同様に分泌が促進され、よって、TNF- $\alpha$ のこの効果には、TNF 受容体 1 は関与していないことが示された (結果未提示)。

図 2-6 は、TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ 分泌促進作用の用量 - 反応関係を検討したものである。その結果、初代培養肝実質細胞において、TNF- $\alpha$ の TNF 受容体 2 を介した TGF- $\alpha$ 分泌促進作用は、添加した TNF- $\alpha$ の用量に依存して増加し、DNA 合成能ならびに核数の変化と同様に 30 ng/mL の TNF- $\alpha$ で、最大反応に達することが示された。この TGF- $\alpha$ 濃度の用量依存的増加は、抗 TNF 受容体 2 モノクローナル抗体の共存下で、完全に抑制された。

これらのことから TNF- $\alpha$ による肝実質細胞の DNA 合成能と細胞増殖作用は、TNF 受容体 2 を介した TGF- $\alpha$ のオートクリン分泌に起因していることが示された。

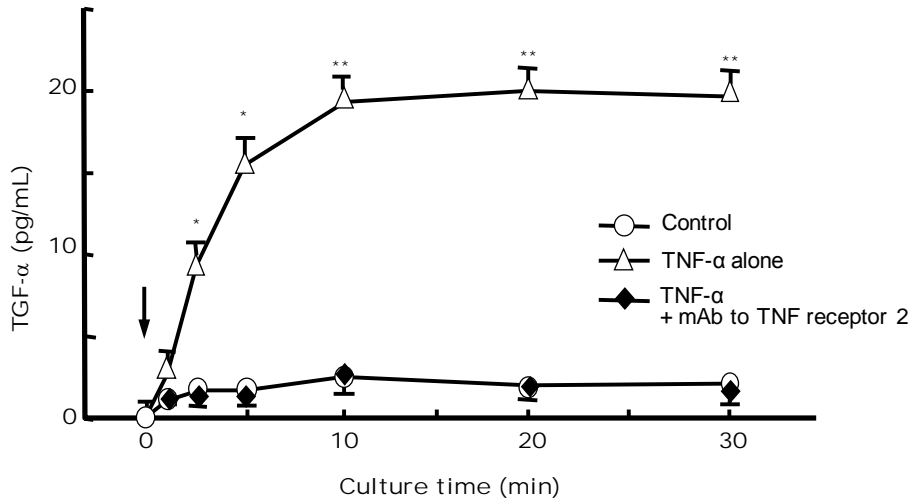


図 2-5 TNF- $\alpha$  による培養液中の TGF- $\alpha$  濃度の経時変化

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 0-30 分  
 薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; mAb to TNF receptor 2, 50 ng/mL  
 有意差 Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01  
 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

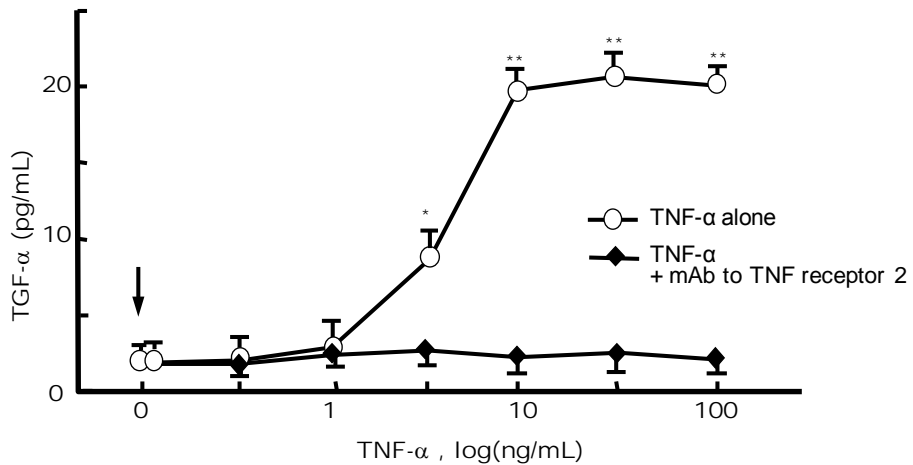


図 2-6 TNF- $\alpha$  による培養液中の TGF- $\alpha$  濃度の変化 ; 用量-反応関係

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 10 分  
 薬物処理 : TNF- $\alpha$ , 30 ng/mL; mAb to TNF receptor 2, 50 ng/mL  
 有意差 Control (TNF- $\alpha$  無処理群) に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01  
 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

### 3-4 TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ の分泌促進作用に対する特異的シグナル伝達因子 阻害薬の効果

TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) 添加による培養液中での TGF- $\alpha$  濃度の増加が確認されたことから、TNF- $\alpha$ により分泌された TGF- $\alpha$ が、どのようなシグナル伝達経路で分泌されるのかについて、細胞内シグナル伝達因子阻害薬を用いて、薬理的な検討を行い、TNF- $\alpha$ の増殖促進機構を一層明確にすることを目的とした。

そこで、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) が、アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ経路を介して TGF- $\alpha$ を培養液中へ分泌している可能性を検証するため、アデニル酸シクラーゼの直接の阻害剤 DDA および H-89 (A キナーゼ阻害薬) および、分泌ゲート連関間接的アデニル酸シクラーゼ阻害薬であるソマトスタチンを用いて検討をした。その結果、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による TGF- $\alpha$ の培養液中の分泌促進作用は、DDA、H-89、ソマトスタチンともに、コントロールレベルまで完全に抑制した(図 2-7)。また、ソマトスタチンの抑制効果は、Gi タンパク質活性を抑制する百日咳毒素の前処理により、完全に解除された。

一方、初代培養肝実質における TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による TGF- $\alpha$ 分泌促進作用は 増殖を十分に抑制する濃度の AG1478 (RTK 阻害薬)、LY294002 (PI3K 阻害薬) および PD98059 (MEK 阻害薬)では、影響を受けなかった(図 2-7)。したがって、受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ経路のシグナル伝達阻害薬は、初代培養肝実質細胞からの TGF- $\alpha$ の分泌に影響を与えずに、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による肝実質細胞の DNA 合成能と細胞増殖促進作用を抑制したことになる。これらシグナル伝達阻害剤はそれぞれ単独では、初代培養肝実質細胞の TGF- $\alpha$ 分泌のコントロールレベルにも影響を与えなかった。



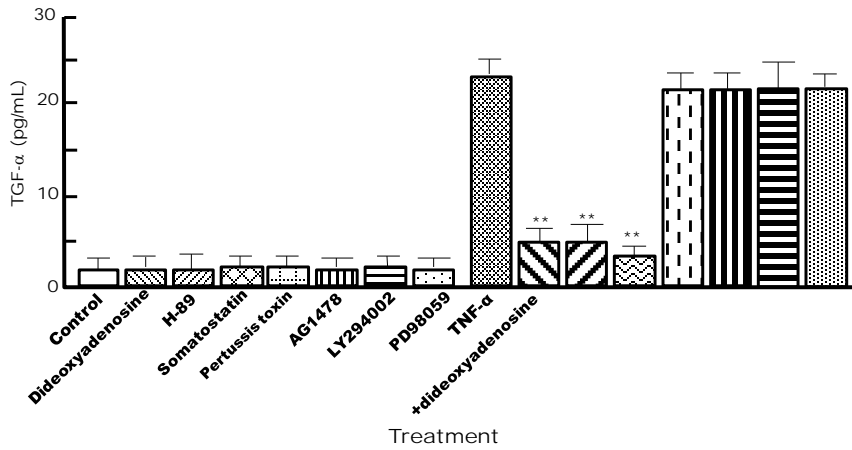


図 2-7 TNF- $\alpha$ による TGF- $\alpha$ 分泌促進作用に対する特異的伝達因子阻害剤の効果

播種密度 :  $3.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>、培養時間 : 無血清培地へ交換後 10 分

薬物処理 : TNF- $\alpha$  , 30 ng/mL; dideoxyadenosine,  $10^{-7}$  M; H-89,  $10^{-7}$  M;  
 somatostatin,  $10^{-6}$  M; pertussis toxin 1 ng/mL; AG1478,  $10^{-7}$  M;  
 LY294002,  $10^{-7}$  M; PD98059,  $10^{-6}$  M.

有意差 : TNF- $\alpha$  処理群に対する有意差、\*P<0.05, \*\*P<0.01 (mean  $\pm$  S.E.M., n=3)

## 第二章 考察

第一章の結果から *in vitro* の実験系において TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) によるラット初代培養肝実質細胞の DNA 合成能と細胞増殖促進作用が確認された。第二章では、TNF- $\alpha$  及び TGF- $\alpha$  の MAP キナーゼ活性に対する効果の経時変化の検討から TNF- $\alpha$  の肝細胞増殖促進作用には、肝実質細胞から成長因子が自己分泌されることが示唆された (図 2-1)。すなわち、TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) それ自体が、一次的な増殖因子(primary mitogen)でなく、二次的な増殖因子(secondary mitogen)であることが示唆された。そこで、以下の作業仮説を立てて、さらにシグナル伝達系路を検討することにした。すなわち、TNF- $\alpha$  は、TNF 受容体 2 を介して、アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系を活性化し、何らかの成長因子をオートクリン分泌する。そしてその分泌された成長因子が、実際に肝実質細胞膜上に存在する受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ系を活性化して、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を促進するというものである。この仮説に合致する肝実質細胞に関するオートクリン分泌される成長因子の候補としては、TGF- $\alpha$  および IGF-I が考えられる<sup>69)</sup>。図 2-2、図 2-3 に示したように TNF- $\alpha$  (30 ng/mL) による初代培養肝実質細胞の増殖促進作用は、抗 TGF- $\alpha$  モノクローナル抗体の添加で、用量依存的に有意に抑制されたが、抗 IGF-I モノクローナル抗体の添加では、影響を受けなかった。これらのことは、内在性の TGF- $\alpha$  が、TNF- $\alpha$  (30ng/mL) の刺激により誘導される肝実質細胞の増殖促進作用の主たるメディエーターであることを示していた。そこで、これらの結果を証明するために、TNF- $\alpha$  (30ng/mL) が肝実質細胞を刺激して、実際に TGF- $\alpha$  を分泌することができるか否かについて培養液中の TGF- $\alpha$  の濃度を直接測定して検討した。

図 2-5、図 2-6 に示したように肝実質細胞に、TNF- $\alpha$  (30ng/mL) を添加して培養すると、培養液に急速に、かつ用量依存的に TGF- $\alpha$  が分泌されること

が見出された。さらに、ソマトスタチンはこの分泌を抑制し、百日咳毒素の前処理によりソマトスタチンの抑制効果は解除された(図 2-7)。そして、抗 TNF 受容体 2 モノクローナル抗体の存在下では、TNF $\alpha$  による TGF- $\alpha$  の分泌促進作用が有意に抑制され、抗 TNF 受容体 1 モノクローナル抗体の存在下では、影響を受けないことが明らかとなった(図 2-5, 図 2-6)。また、これらの結果から肝実質細胞内には、それ自身の増殖を促進させる十分な量の TGF- $\alpha$  タンパク質が含まれることが示唆された(結果未提示)。次に、自己分泌された TGF- $\alpha$  が EGF/TGF- $\alpha$  受容体(175kDa)の結合部位に結合して(Lee et al.,1995)、自身の受容体チロシンキナーゼを活性化し、さらに下流の MAP キナーゼをも活性化して、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を引き起こすことが明らかとなった(図 2-4)。この結果を支持するデータとして、肝実質細胞の増殖を抑制することのできる濃度の AG1478、PD98059、LY294002 は、TGF- $\alpha$  の分泌には影響しなかったことが挙げられる。

一方、本研究では、TNF- $\alpha$  による IGF-I の培養液中への分泌については、直接測定していないので不明であるが、抗 IGF-I 抗体を用いた実験から、肝実質細胞を増殖させるレベルの IGF-I のオートクリン分泌はなかったものと考えられる。これらの結果は、TNF- $\alpha$  による TNF 受容体 2 を介する TGF- $\alpha$  の分泌促進機構は、TNF 受容体 2/Gs/アデニル酸シクラーゼ/A キナーゼ系によって調節を受けていることが示され、二章において提唱した作業仮説が証明された。

今回の実験結果と同様のメカニズムで初代培養肝実質細胞の増殖を促進させる例が報告されている。Kimura らは、はエイコサノイドの一種、プロスタグランジン E<sub>2</sub> ( Prostaglandin E<sub>2</sub> : PGE<sub>2</sub> ) が、*in vitro* の初代培養肝実質細胞実験系において、低濃度で細胞の増殖を促進することを初めて見出した(68)70)。さらにその仕組みを検討したところ、PGE<sub>2</sub> それ自体が増殖因子ではなく、PGE<sub>2</sub> が肝実質細胞の EP 受容体に結合し、これに働いて TGF- $\alpha$  の

分泌を促進することを定量的に示した。そして、オートクリン様式でごく微量ではあるが有意な量の TGF- $\alpha$  が培養液中に分泌され、それが二次的に肝細胞の増殖を促進するのであることを、TGF- $\alpha$  のシグナル伝達機構も確認することで初めて証明した<sup>70)</sup>。従って、PGE<sub>2</sub> は二次的な増殖因子 (secondary mitogen) であり TGF- $\alpha$  は一次的増殖因子 (primary mitogen) であるといえる。このように比較的単純な *in vitro* 初代培養肝細胞系でも、TNF- $\alpha$  による細胞増殖の仕組みはやや複雑であることが見出された。*In vivo* における肝障害時には、本来の肝機能を速やかに回復させる必要があり、このようなオートクリン様式により、局所的に増殖因子を分泌させ、細胞増殖を早期に促進させることは、合目的的応答であると考えられた。

## 結論

以上の、主な研究結果を総合すると、TNF- $\alpha$ による初代培養肝実質細胞の増殖促進作用機構は、以下のように考えられた。TNF- $\alpha$ は、肝実質細胞のTNF受容体2を刺激する。そして、その受容体に共役しているアデニル酸シクラーゼ/cAMP/Aキナーゼ系を活性化して、TGF- $\alpha$ を自己分泌する。細胞外に自己分泌されたTGF- $\alpha$ は、175kDa受容体に結合してチロシンキナーゼ/MAPキナーゼ系を活性化して肝実質細胞のDNA合成及び細胞増殖を誘導する。この一連のシグナル伝達経路を、図2-8に模式的に示した。これらの結果から、TNF- $\alpha$ による肝実質細胞のDNA合成及び肝細胞増殖促進作用は、TNF受容体2を介し、自己分泌されたTGF- $\alpha$ をメディエーターとする間接的な作用（二次的作用）であるということが新たに見出された。

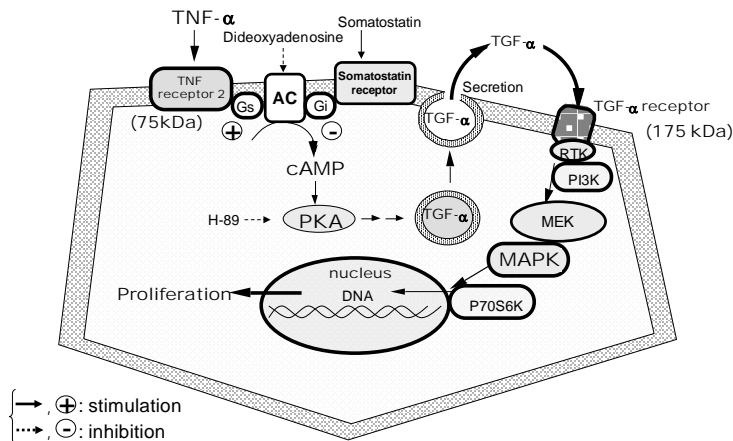


図2-8 TNF受容体2を介する腫瘍壊死因子TNF- $\alpha$ のラット初代培養肝実質細胞に対する増殖促進作用機構のモデル

外科的部分肝切除や肝毒性を示す化学物質による肝障害からの肝再生において、TNF- $\alpha$ は、比較的初期に重要な役割を果たす因子の1つとされているので、今回 *in vitro* で新たに見出されたTNF受容体2を介するシグナル伝達経路が *in vivo* でも作動するのかどうかの詳しい検討については、今後の課題と

なる。

本研究の意義としては、次のようなことが考えられる。すなわち、TNF- $\alpha$ のような増殖促進因子（あるいは増殖抑制因子など）の肝実質細胞に対する増殖の開始、及び停止の仕組みをより詳しく研究することにより、臓器形成の仕組みの解明、癌化の仕組みの解明、肝障害からの早期の機能回復（肝再生）、そして肝障害に対する新しい治療薬（いわゆる肝庇護薬）の開発など様々な研究分野への応用が期待できる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました、城西大学薬学部教授 荻原 政彦 先生に深く感謝の意を表します。

本論文作成にあたりご高閲とご教授を賜りました、副査 城西大学薬学部教授 谷 覺 先生、及び城西大学薬学部教授 従二 和彦 先生に深く感謝の意を表します。

また適切なるご助言、並びに快くご協力くださいました城西大学薬学部助教 木村 光利 先生に心から感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C., 1997. Liver regeneration. *Science* 276, 60-66.
- 2) Higgins, G.M., Anderson, R.M., 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial removal. *Arch. Pathol.* 12, 186-202.
- 3) Strain, A.J. *et al.* 1991. Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes. *J Clin Invest.*, 87, 1853-1857.
- 4) Ishiki, Y. *et al.* 1992. Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and antihepatitis effect in vivo. *Hepatology.* 16,1227-1235.
- 5) Michalopoulos, G.K., 1994. Control mechanisms of liver regeneration. *J. Gastroenterol.* 213, 286-300.
- 6) Seglen, P.O., 1975. Preparation of isolated liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
- 7) 荻原 政彦、2000、城西大学生命科学研究センター報告 4、9-19.



- 8) Fausto, N. *et al.* K.J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology* 43, S45-S53.
- 9) Kimura, M., Ogihara, M., 1997a. Density-dependent proliferation of adult rat hepatocytes in primary culture induced by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents. *Eur. J. Pharmacol.* 324, 267-276.
- 10) Kimura M, Ogihara M. 1997b, Proliferation of adult rat hepatocytes by hepatocyte growth factor is potentiated by both phenylephrine and metaproterenol. *J Pharmacol Exp Ther.* 282, 1146-1154.
- 11) Kimura M, Ogihara M. 1998a, Proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures induced by platelet-derived growth factor is potentiated by phenylephrine. *Jpn J Pharmacol.*, 76, 165-174.
- 12) Kimura M, Ogihara M. 1998b, Effects of insulin-like growth factor I and II on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 354, 271-281.
- 13) Kimura M, Ogihara M., 1999, Stimulation by transforming growth factor- $\alpha$  of DNA synthesis and proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures: modulation by  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 291, 171-180.

- 14) Carswell, E.A. *et al.* 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3666-3670.
- 15) Fiers, W., 1991. Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, cellular, and in vivo level. *FEBS Lett.* 285, 199-212.
- 16) Bazzoni, F., Beutler, B. 1996, The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N.Engl. J. Med.* 334, 1717-1725.
- 17) Wallach, D. *et al.* 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331-367.
- 18) Fendly, B.M., Palladino, Jr, M.A., 1993. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* 151, 4637-4641.
- 19) Grell, M. *et al.* 1998. TNF receptor type 2 mediates thymocytes proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.* 28, 257-263.
- 20) Fernandez, V. *et al.* 2007. Involvement of Kupffer cell-dependent signaling in T<sub>3</sub>-induced hepatocyte proliferation in vivo. *Biol. Chem.* 388, 831-837.
- 21) White, B. *et al.* 2000. Activated protein C inhibits

lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kB (NF-kB) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br. J. Haematol.* 110, 130-134.

22) Brockhaus, M. *et al.* 1990. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3127-3131.

23) Lewis, M. *et al.* 1991. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2830-2834.

24) Tartaglia, L.A. *et al.* 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9292-9296.

25) Mackay, F. *et al.* 1994. Differential responses of fibroblasts from wild-type and TNF-R55-deficient mice to mouse and human TNF- $\alpha$  activation. *J. Immunol.* 153, 5274-5284.

26) Naume, B. *et al.* 1991. Involvement of the 55- and 75-kDa tumor necrosis factor receptors in the generation of lymphokine-activated killer cell activity and proliferation of natural killer cells. *J. Immunol.* 146, 3045-3048.

- 27) Baeuerle, P.A., Baltimore, D., 1996. NF- $\kappa$ B: Ten years after. *Cell* 87, 13-20.
- 28) Kalb, A. *et al.* 1996. Tumor necrosis factor receptors (Tnfr) in mouse fibroblasts deficient in Tnfr1 or Tnfr2 are signaling competent and activate the mitogen-activated protein kinase pathway with differential kinetics. *J Biol Chem*, 271, 28097-28104.
- 29) Song, H.Y. *et al.* 1997. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: Bifurcation of nuclear factor- $\kappa$ B and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9792-9796.
- 30) Akerman, P. *et al.* 1992. Antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 263, G579-G589.
- 31) Yamada, Y. *et al.* 1997. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1441-1446.
- 32) Yamada, Y., Fausto, N., 1998. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am. J. Pathol.*, 152, 1577-1589.

- 33) Yamada, Y. *et al.* 1998. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: Requirement for type 1 but not type 2 receptor. *Hepatology* 28, 959-970.
- 34) Watanabe, Y. *et al.* 1997. TNF- $\alpha$  bifunctionally induces proliferation in primary hepatocytes: Role of cell anchorage and spreading. *J. Immunol.* 159, 4840-4847.
- 35) Weber, E.M. *et al.* 1998. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *J. Biol. Chem.* 28, 1226-1234.
- 36) Morley, C.G.D., Kingdon, H.S., 1972. Use of  $^3\text{H}$ -thymidine for measurement of DNA synthesis in rat liver—a warning. *Anal. Biochem.* 45, 298-305.
- 37) Lee, M.B., Paxman, S., 1972. Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. *Anal. Biochem.* 47, 184-192.
- 38) Nakamura, T. *et al.* 1983. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.* 94, 1029-1035.
- 39) Twobin, H. *et al.* 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

- 40) Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 41) Pradelles, P. *et al.* 1989. Enzyme immunoassays of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate using acetylcholinesterase. *Anal. Chem.* 61, 447-453.
- 42) Holgate, S.T. *et al.* 1980. Role of adenylate cyclase in immunologic release of mediators from rat mast cells: agonist and antagonist effects of purine- and ribose-modified adenosine analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6800-6804.
- 43) Zusick, M.J. *et al.* 1994. Cyclic-AMP-dependent protein kinase activity is not required by parathyroid hormone to stimulate phosphoinositide signaling in chondrocytes but is required to transduce the hormone's proliferative effect. *Arch. Biochem. Biophys.* 315, 352-361.
- 44) Hoyer, D. *et al.* 1995. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16, 86-88.
- 45) Fujinaga, Y. *et al.* 1989. A pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein plays a role in the G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> transition of rat hepatocytes following establishment in primary culture. *FEBS letters* 245, 117-121.

- 46) Levitzki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782-1788.
- 47) Vlahos, C.J. *et al.* 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269, 5241-5248.
- 48) Alessi, D. *et al.* 1995. PD098059 is a specific inhibitor of MAP kinase kinase-1 in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270, 27489-27494.
- 49) Chung, J. *et al.* 1992. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation and signaling by the 70 kD S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227-1236.
- 50) Price, D.J. *et al.* 1992. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 257, 973-977.
- 51) Coffin, V.L., Spealman, R.D. 1989. Psychomotor-stimulant effects of 3-isobutyl-1-methylxanthine: comparison with caffeine and 7-(2-chloroethyl) theophylline. *Eur J Pharmacol.* 170,35-40.
- 52) Tartaglia, L.A., *et al.* 1993. Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J. Immunol.* 151, 4637-4641.

- 53)Ullrich, A., Schlessinger, J., 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-212.
- 54)Davis R.J., 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 268, 14553-14556.
- 55)Rothe, M. *et al.* 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 78, 681-692.
- 56)Vieter, I. *et al.* 1993. Tumor necrosis factor-induced activation and increased tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 268, 18994-18999.
- 57)Rodbell, M., 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284, 17-22.
- 58)Zhang, Y. *et al.* 1988. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumor necrosis factor and interleukin 1 in human fibroblasts: Role in the induction of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 6802-6805.
- 59)Simpson, R.J. *et al.* 1997. Cytokine and the liver. *J. Hepatol.* 27 1120-1132.



- 60) De Larco J, Todaro, GJ. 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 4001-4005.
- 61) Russel, E.R. *et al.* 1993. Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) concentrations increase in regenerating rat liver: evidence for a delayed accumulation of mature TGF- $\alpha$ . *Endocrinology* 133, 1731-1738.
- 62) Weber, E.M. *et al.* 1993. Transforming growth factor- $\alpha$  expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interaction between transforming growth factor- $\alpha$  and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 18, 1422-1431.
- 63) Mead, J.E., Fausto, N., 1989. Transforming growth factor  $\alpha$  may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 1558-1562.
- 64) Humbel, R.E., 1990. Insulin-like growth factor-I and II. *Eur. J. Biochem.*, 190, 445-462.
- 65) Alphons, A. *et al.* 1995. Expression of insulin-like growth factor II in spontaneously immobilized rat mesothelial and spontaneous mesothelioma cells: a potential autocrine role of insulin-like growth factor. *Cancer Res.* 55, 3634-3639.

- 66) Lund, P.K. *et al.* 1986. Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.* 261, 14539-14544.
- 67) Steele-Perkins, G. *et al.* 1988. Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor-I receptor. *J. Biol. Chem.* 263, 11486-11492.
- 68) Kimura, M. *et al.* 2001. Prostaglandin E<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>) receptor agonist-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes: the involvement of TGF- $\alpha$ . *Endocrinology* 142, 4428-4440.
- 69) Andus, T. *et al.* 1991. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 13, 364-375.
- 70) Kimura, M., Ogihara, M., 2005. Effects of branched-chain amino acids on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 510, 167-180.