

## 学位論文要旨

### セロトニンの成熟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

内藤 浩太

肝臓は、代謝の中心的な役割を果たす腺臓器であり、その機能は 500 種類以上が知られている。その中でも、他の臓器にはみられない特徴的な機能として、非常に高い自己増殖能が挙げられる。例えば、ラットの肝臓の 70% を外科的に切除した場合、30% の残余肝が自動的に細胞増殖を開始し、10 日ほどで、元の肝重量にまで回復する。この現象は、肝再生と呼ばれている。

肝再生機構に関する研究は、20 世紀前半に Higgins と Anderson が 70% 部分肝切除モデルを発表したことをきっかけに飛躍的に前進した。これまでに、部分肝切除後の肝再生において、hepatocyte growth factor (HGF) や transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  などの増殖因子や、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や interleukin (IL)-6 等のサイトカインが深く関与することが明らかとなった。そして、これらの因子に加え、ホルモンやオータコイドなども肝再生の促進や抑制に関与しており、複数の因子が複雑に相互作用することで肝再生は完遂する。一方、増殖因子等の詳細な作用機構を検討する場合、*in vivo* モデルでは、多くの因子が複雑に相互作用をするために解析が困難である。そこで、*in vivo* モデルと並行し、*in vitro* モデルの開発及び各因子の詳細な作用機構の解明が研究されてきた。Seglen らが開発した *in situ* コラゲナーゼ還流法 (*in situ* collagenase perfusion method) を用いて肝実質細胞を単離し、初代培養することで、*in vivo* 並みの高い代謝活性と、種々増殖因子やサイトカインに対する応答性を有する細胞が得られるようになった。この実験系を用いることにより、肝実質細胞に対する増殖因子やサイトカインなどの詳細な細胞増殖促進作用機構を明らかにすることが可能になった。近年では、オータコイドの一種であるセロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT) が肝再生の促進に深く関わるとして研究が進んでいる。5-HT の生理作用は、腸管運動の調節、嘔吐運動や血液凝固反応の促進など多岐にわたっている。肝切除においては、切開部の傷口に血小板が急速に集積し、血小板の凝集が開始される。この時、血小板から 5-HT が分泌され、血小板凝集が亢進する。加えて、肝切除により、肝臓中の 5-HT<sub>2A</sub> 及び 5-HT<sub>2B</sub> 受容体の発現量が上昇することや 5-HT の生合成を抑制することで肝再生が遅延することから 5-HT は、肝再生に関わる重要な因子であり、「肝再生促進薬」になりうると考えられている。

しかし、5-HT の肝細胞に対する増殖促進作用機構は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、肝実質細胞に対する 5-HT の増殖促進作用を薬理的なアプローチにより検討することで 5-HT の詳細な細胞増殖促進作用機構の解明を目的とした。

第 1 章では、初代培養肝実質細胞実験系を用いて 5-HT 及び 5-HT<sub>2</sub> 受容体サブタイプ作動薬の肝実質細胞の増殖に対する効果を検討した。5-HT 及び 5-HT<sub>2B</sub> 受容体作動薬である BW723C86 は、それぞれ単独で、培養時間及び用量に依存した DNA 合成及び細胞増殖促進

作用を示すことが確認された。加えて、5-HT 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効果を薬理的に検討したところ、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用は、phospholipase C (PLC)、receptor tyrosine kinase (RTK)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)、mammalian target of rapamycin (mTOR) といったシグナル伝達因子を介するということが明らかになった。

第2章では、肝実質細胞の RTK、MAPK 及び ribosomal p70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化活性を測定し、より詳細な 5-HT の細胞内増殖シグナル伝達機構を生化学的に検討した。その結果、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT<sub>2B</sub> receptor/ PLC/Ca<sup>2+</sup>経路と epidermal growth factor (EGF)/TGF- $\alpha$  RTK/PI3K/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2/mTOR/p70S6K 経路が深く関与していることが明らかとなった。また、顆粒分泌を抑制するソマトスタチンにより、5-HT により誘発される RTK や MAPK、p70S6K のリン酸化活性 (最大活性 : 5-HT 添加後 10 分、20~30 分、30 分) が抑制されたことから、5-HT が何らかのオートクリン因子を肝実質細胞から自己分泌させたことが示唆された。

第3章では、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用に関するオートクリン因子分泌機構を検討した。その結果、5-HT 刺激により、急速な培養液中 TGF- $\alpha$  濃度の上昇 (5-HT 添加後 5~10 分) が確認された。また、5-HT による TGF- $\alpha$  の自己分泌は、5-HT<sub>2B</sub> receptor/PLC/Ca<sup>2+</sup>経路により引き起こされるということを明らかにした。

以上の結果から、総合的に考察すると、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT が 5-HT<sub>2B</sub> 受容体サブタイプを刺激することで開始される。その後、その下流に存在する PLC が活性化され、その結果、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を引き金とし、肝実質細胞内に貯蔵されていた TGF- $\alpha$  が細胞外へと分泌される。分泌された TGF- $\alpha$  が、肝実質細胞膜上の EGF/TGF- $\alpha$  受容体と結合することで、RTK がリン酸化され、この増殖シグナルが、PI3K、ERK2、mTOR、p70S6K と経時的に順次伝達され、最終的に細胞増殖に至ることを見出した。

5-HT は、多彩な生理作用を示す生理活性物質であり、その作用を紐解く研究が古くから進められてきた。近年では、様々な細胞に対する細胞増殖促進作用が報告されており、本研究は、その中で、肝実質細胞に対する 5-HT の 5-HT<sub>2B</sub> 受容体を介した詳細な細胞増殖促進作用機構を初めて見出した。5-HT は、5-HT<sub>2B</sub> 受容体を介し、肝実質細胞から TGF- $\alpha$  を自己分泌させ、肝再生を完遂するために非常に重要な役割を果たす 1 つの増殖因子と位置づけられる。そのため、本研究で得られた知見は、5-HT をベースとした新たな「肝再生促進薬」の開発に貢献し、また、肝再生現象の解明にも役立つものであると考えられる。特に、5-HT による肝実質細胞の増殖には、5-HT<sub>2B</sub> 受容体が深く関与していることから、5-HT<sub>2B</sub> 受容体を選択性の高い薬物の創薬や肝実質細胞への効率的な薬物送達システムなどの研究が今後必要になると予想される。さらに、肝癌患者の 30%において、5-HT<sub>2B</sub> 受容体発現量が上昇しているとの報告もあることから、本研究は、癌化の仕組みの解明及び癌治療薬の開発といった研究領域にも貢献しうるものと期待される。

## Thesis abstract

### Signal transduction mechanism for serotonin-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes

Kota Naito

The liver is the largest glandular organ in humans; it accounts for 2% of the adult body weight. It has more than 500 functions and is a pivotal organ in metabolism. Specific functions of the liver include carbohydrate, lipid and protein metabolism, the synthesis and secretion of plasma proteins, biligenesis, and detoxification. Furthermore, the liver has very high autonomous proliferation potency, which is not observed in any other organ. For example, if 70% of a liver is surgically removed from a rat, the remaining portion of the liver undergoes mitogenesis and can recover to the original liver weight and function by approximately 10 days after the hepatectomy; this phenomenon is known as liver regeneration.

Studies on liver regeneration have been advancing rapidly since the establishment of the 70% partial hepatectomy *in vivo* model by Higgins and Anderson in the first half of the twentieth century. Since then, it has been clarified that liver regeneration after partial hepatectomy involves numerous growth factors, such as hepatocyte growth factor and transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ , and cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6. Moreover, adding of these factors, it is involved hormone and autacoid and minutely interacted by numerous factors to accomplish. However, since it is difficult to elucidate the detailed mechanism of liver regeneration by growth factors, hormones, and cytokines in an *in vivo* model, an *in vitro* model of cell growth has also been developed; this model allows the mechanism of each factor to be studied individually in parallel to the *in vivo* model. Primary cultures of hepatocytes, which are parenchymal cells that make up the majority of the liver, are typically used for *in vitro* models. In particular, the *in situ* collagenase perfusion method reported by Seglen et al. enables steady hepatocyte isolation. Using primary cultured hepatocytes, the mechanism of mitogenesis and how proliferative signaling pathways are regulated by growth factors and cytokines can be clarified. More recently, serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT), a kind of autacoid, has been studied to determine how it is involved as a mitogen in liver regeneration; however, it remains unclear how serotonin induces hepatocyte proliferation through intracellular signaling pathways. The present study aimed to elucidate the effect of 5-HT on hepatocyte proliferation and the detailed mechanism of proliferation from a pharmacological and biochemical approach.

The 5-HT is presented in platelet following the intestinal tract in peripheral tissue. The physiological action of 5-HT varies: it controls the movement of the intestine and the emetic response, and it can promote blood clotting. When liver tissue is injured by resection, platelets accumulate in the wounds and initiate the blood-clotting reaction. 5-HT is released from the platelets to promote blood clotting. Furthermore, since liver regeneration is delayed by the inhibition of 5-HT biosynthesis, platelet-derived 5-HT appears to contribute to hepatic tissue repair. Thus, 5-HT is an important factor involved in liver regeneration.

In the present study, I investigated the effects of 5-HT as well as a 5-HT<sub>2</sub> receptor subtype agonist and antagonist using a modified Seglen's method. I found that 5-HT and selective 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist BW723C86 independently induced hepatocyte DNA synthesis and proliferation in a time- and dose-dependent manner. Next, by investigating the effects of specific signal transduction inhibitors on 5-HT- or BW723C86-induced hepatocyte proliferation, I determined the involvement of growth-related signal transduction factors. Furthermore, to more thoroughly examine the detailed intracellular growth signal transduction mechanism, I determined the phosphorylation patterns of epidermal growth factor (EGF)/TGF- $\alpha$  receptor tyrosine kinase (RTK), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and ribosomal p70 S6 kinase (p70S6K) by 5-HT. The results showed that the proliferative effect of 5-HT in hepatocytes involved the 5-HT<sub>2B</sub> receptor/phospholipase C (PLC)/Ca<sup>2+</sup> and EGF/TGF- $\alpha$  RTK/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)2/mammalian target of rapamycin (mTOR)/p70S6K pathways. Additionally, the activation of the pathways was abolished by somatostatin, which inhibits mitogen-activated exocytosis. Results confirmed that 5-HT induced a significant increase in the TGF- $\alpha$  concentration through the 5-HT<sub>2B</sub> receptor/PLC/Ca<sup>2+</sup> pathway.

These results suggested that stimulation of the 5-HT<sub>2B</sub> receptor by 5-HT initiates hepatocyte DNA synthesis and proliferation, and transmit to a downstream of the signal such as PLC. Consequently, the activation of PLC increases the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, which then triggers the extracellular secretion of stored TGF- $\alpha$  in the hepatocytes. The TGF- $\alpha$  subsequently activates a second pathway by binding to EGF/TGF- $\alpha$  receptor, phosphorylated RTK, and transmits a succession of growth signals to the PI3K, ERK2, mTOR and p70S6K pathway. As a result, DNA synthesis and proliferation are increased in the hepatocytes.

5-HT has many biological functions that have been studied extensively for the elucidation of their mechanisms. In recent years, there have been many reports on the effects of 5-HT on the proliferation of a variety of cell types. In the present study, I uncovered the detailed mechanism of hepatocyte proliferation induced by 5-HT. Autocrine secretion of TGF- $\alpha$  in hepatocytes induced by 5-HT is a kind of growth factor, perform really important role of liver regeneration accomplishment. Therefore, the data on 5-HT gained from the present study will contribute to the development of breakthrough liver regeneration-accelerating agents as well as the elucidation of the remaining unclear aspects of liver regeneration. Notably, this study found that the proliferative mechanism of action of 5-HT is mediated mainly through a 5-HT<sub>2B</sub> receptor/Gq/PLC-stimulated increase in the autocrine secretion of TGF- $\alpha$  from primary cultured hepatocytes. In the future, it will be necessary to develop more highly selective 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonists and to investigate efficient drug delivery systems targeting hepatocytes. Furthermore, since approximately 30% of hepatoma patients have an elevated expression level of 5-HT<sub>2B</sub> receptor in cancer cells, these studies will also contribute to the elucidation of the mechanism of the consecration, the development of carcinostatic agents, and investigations on the applicability of the tissue repair system, all of which are expected to have important clinical applications.

## 論文審査の結果の要旨

肝再生機構に関する研究は、20世紀前半に Higgins と Anderson が 70%部分肝切除モデルを発表したことをきっかけに飛躍的に前進した。これまでに、部分肝切除後の肝再生において、hepatocyte growth factor (HGF) や transforming growth factor (TGF)- $\alpha$  などの増殖因子や、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  や interleukin (IL)-6 等のサイトカインが深く関与することが明らかとなった。そして、これらの因子に加え、ホルモンやオータコイドなども肝再生の促進や抑制に関与しており、複数の因子が複雑に相互作用することで肝再生は完遂する。

一方、増殖因子等の詳細な作用機構を検討する場合、*in vivo* モデルでは、多くの因子が複雑に相互作用をするために解析が困難である。そこで、*in vivo* モデルと並行し、*in vitro* モデルの開発及び各因子の詳細な作用機構の解明が研究されてきた。Seglen らが開発した *in situ* コラゲナーゼ還流法 (*in situ* collagenase perfusion method) を用いて肝実質細胞を単離し、初代培養することで、*in vivo* 並みの高い代謝活性と、種々増殖因子やサイトカインに対する応答性を有する細胞が得られるようになった。この実験系を用いることにより、肝実質細胞に対する増殖因子やサイトカインなどの詳細な細胞増殖促進作用機構を明らかにすることが可能になった。近年では、オータコイドの一種であるセロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT) が肝再生の促進に深く関わるとして研究が進んでいる。肝切除において、切開部の傷口に血小板が急速に集積し、血小板の凝集が開始される。この時、血小板から 5-HT が分泌され、血小板凝集が亢進する。加えて、肝切除により、肝臓中の 5-HT<sub>2A</sub> 及び 5-HT<sub>2B</sub> 受容体の発現量が上昇することや 5-HT の生合成を抑制することで肝再生が遅延することから 5-HT は、肝再生に関わる重要な因子であり、「肝再生促進薬」になりうると考えられている。

以上のように肝再生機構の解明は広範囲で進んでいるものの、5-HT の肝細胞に対する増殖促進作用機構の詳細は未だ明らかとなっていない。そこで本研究において内藤氏は、肝実質細胞に対する 5-HT の増殖促進作用を薬理的なアプローチにより検討することで 5-HT の詳細な細胞増殖促進作用機構の解明を目的として検討を行った。

第 1 章において、内藤氏は初代培養肝実質細胞実験系を用いて 5-HT 及び 5-HT<sub>2</sub> 受容体サブタイプ作動薬の肝実質細胞の増殖に対する効果を詳細に検討した。5-HT 及び 5-HT<sub>2B</sub> 受容体作動薬である BW723C86 は、それぞれ単独で、培養時間及び用量に依存した DNA 合成及び細胞増殖促進作用を示すことを確認した。さらに、内藤氏は 5-HT 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効果を薬理的に検討した。その結果、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用は、phospholipase C (PLC)、receptor tyrosine kinase (RTK)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)、mammalian target of rapamycin (mTOR) といったシグナル伝達因子を介するというを明らか

かにした。

第2章において内藤氏は、肝実質細胞の RTK、MAPK 及び ribosomal p70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化活性を測定し、より詳細な 5-HT の細胞内増殖シグナル伝達機構の解明を試みた。その結果、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT<sub>2B</sub> receptor/PLC/Ca<sup>2+</sup>経路と epidermal growth factor (EGF)/TGF- $\alpha$  RTK/PI3K/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 2/mTOR/p70S6K 経路が深く関与していることを明らかにした。また、顆粒分泌を抑制するソマトスタチンにより、5-HT により誘発される RTK や MAPK、p70S6K のリン酸化活性 (それぞれの最大活性: 5-HT 添加後 10 分、20~30 分、30 分) が抑制されたことから、内藤氏は、5-HT が何らかのオートクリン因子を肝実質細胞から自己分泌させたとの推測をした。

第3章において内藤氏は、その存在が推測された 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用に関するオートクリン因子分泌機構の解明を試みた。その結果、5-HT 刺激により、急速な培養液中 TGF- $\alpha$  濃度の上昇 (5-HT 添加後 5~10 分) を確認した。さらに、5-HT による TGF- $\alpha$  の自己分泌は、5-HT<sub>2B</sub> receptor/PLC/Ca<sup>2+</sup>経路により引き起こされることを解明した。

以上の結果から、内藤氏は 5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT が 5-HT<sub>2B</sub> 受容体サブタイプを刺激することで開始される。その後、その下流に存在する PLC が活性化され、その結果、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を引き金とし、肝実質細胞内に貯蔵されていた TGF- $\alpha$  が細胞外へと分泌される。分泌された TGF- $\alpha$  が、肝実質細胞膜上の EGF/TGF- $\alpha$  受容体と結合することで、RTK がリン酸化され、この増殖シグナルが、PI3K、ERK2、mTOR、p70S6K と経時的に順次伝達され、最終的に細胞増殖に至ることを明確に示した。

以上、内藤氏によって、肝実質細胞に対する 5-HT の 5-HT<sub>2B</sub> 受容体を介した詳細な細胞増殖促進作用機構を初めて見出されたことが高く評価される。5-HT は、5-HT<sub>2B</sub> 受容体を介し、肝実質細胞から TGF- $\alpha$  を自己分泌させ、肝再生を進行させるために非常に重要な役割を果たす増殖因子と位置づけられる。そのため、本研究で得られた知見は、5-HT をベースとした新たな「肝再生促進薬」の開発に貢献する可能性があり、また、肝再生現象の解明にも深く寄与すると考えられる。特に、5-HT による肝実質細胞の増殖には、5-HT<sub>2B</sub> 受容体が深く関与していることが判明したことにより、5-HT<sub>2B</sub> 受容体に選択性の高い薬物の創薬や肝実質細胞への効率的な薬物送達システムなどの開発の重要性についても明示した。内藤氏は当研究分野において多くの新知見を加えたことにより多大な貢献をしたと評価でき、本研究科において課程による博士 (薬学) の学位を授与するに値するものと判断する。