

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

目次

略語	-----7
第1編 序論	-----10
第2編 本論	-----10
第1章 セロトニンによる成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する増殖促進作用 機構の検討	-----17
1. 緒言	-----17
2. 実験材料及び実験方法	-----22
2-1. 実験動物	-----22
2-2. 肝実質細胞の単離と培養	-----22
2-3. 肝実質細胞の DNA 合成能の測定	-----23
2-4. 肝実質細胞の核数計測	-----24
2-5. 肝実質細胞の細胞周期の測定	-----24
2-6. 実験材料	-----25
2-7. データの統計処理	-----25
3. 実験結果	-----26
3-1. セロトニンの初代培養肝実質細胞に対する効果	-----26

3-1-1. セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化	-----28
3-1-2. セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係	-----30
3-2. セロトニンの初代培養肝実質細胞に対する S 期移行性に関する検討	-----32
3-3. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用におけるセロトニン受容体サブタイプに関する検討	-----34
3-3-1. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT ₂ 受容体サブタイプ遮断薬の効果	-----34
3-3-2. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT ₂ 受容体サブタイプ刺激薬の効果	-----36
3-4. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討	-----38
4. 考察	-----41
4-1. セロトニンの成熟ラット初代培養肝実質細胞の増殖に対する効果	-----41
4-2. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対するセロトニン受容体サブタイプの関与に関する検討	-----43
4-3. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討	-----44
5. 小括	-----46

第 2 章 成熟ラット初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼ、MAP キナーゼ及び p70S6 キナーゼリン酸化促進作用の検討	-----48
1. 諸言	-----48
2. 実験材料及び実験方法	-----50
2-1. 実験動物	-----50
2-2. 肝実質細胞の単離と培養	-----50
2-3. EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定	-----50
2-4. MAP キナーゼリン酸化活性の測定	-----51
2-5. p70S6 キナーゼリン酸化活性の測定	-----52
2-6. 実験材料	-----52
2-7. データの統計処理	-----53
3. 実験結果	-----54
3-1. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の検討	-----54
3-2. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化促進作用に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果	-----56
3-3. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる MAP キナーゼリン酸化活性の検討	-----58

3-4. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの MAP キナーゼリン酸化促進作用 に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果	-----60
3-5. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる p70S6 キナーゼリン酸化活 性の検討	-----62
3-6. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの p70S6 キナーゼリン酸化促進作 用に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果	-----64
4. 考察	-----66
4-1. 肝実質細胞におけるセロトニンの EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼ、 MAP キナーゼ及び p70S6 キナーゼリン酸化作用の基礎的検討	-----66
4-2. 肝実質細胞におけるセロトニン誘発 EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼ、 MAP キナーゼ及び p70S6 キナーゼリン酸化促進作用に関する細胞内シグナ ル伝達機構	-----67
5. 小括	-----69
第 3 章 セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用におけるオートクリン因子分泌機構 に関する検討	-----71
1. 諸言	-----71
2. 実験材料及び実験方法	-----73
2-1. 実験動物	-----73

2-2. 肝実質細胞の単離と培養	-----73
2-3. 肝実質細胞の DNA 合成能の検討	-----73
2-4. 肝実質細胞の核数計測	-----73
2-5. 増殖因子に対する中和実験	-----73
2-6. 培養液中の TGF- α 濃度の測定	-----74
2-7. 肝実質細胞内 TGF- α の蛍光免疫染色	-----74
2-8. 実験材料	-----75
2-9. データの統計処理	-----75
3. 実験結果	-----76
3-1. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子抗体の効果に関する検討	-----76
3-2. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの TGF- α 分泌促進作用に関する検討	-----78
3-2-1. セロトニンの肝実質細胞における TGF- α 分泌促進作用の経時的変化	-----78
3-2-2. セロトニンの肝実質細胞における TGF- α 分泌促進作用の用量-反応関係	-----79
3-3. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの TGF- α 分泌促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構の検討	-----80
3-4. 肝実質細胞内 TGF- α に対するセロトニンによる自己分泌の検討	-----82
3-5. 肝実質細胞内 TGF- α に対するセロトニンによる分泌作用の経時的変化	-----83

4. 考察	-----84
4-1. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンのオートクリン因子分泌促進作用 に関する検討	-----84
4-2. セロトニンの肝実質細胞に対する TGF- α 分泌促進作用に関するシグナル伝 達機構の検討	-----85
5. 小括	-----86
第3編 結論	-----87
謝辞	-----91
参考文献	-----92

略語

①試薬、培地、増殖因子、サイトカイン、シグナル伝達因子など

5-HT	5-hydroxytryptamine (serotonin)
EGF	epidermal growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
TGF- α	transforming growth factor alpha
TGF- β	transforming growth factor beta
IGF-I	insulin-like growth factor-I
IL-6	interleukin-6
TCA	trichloroacetic acid
PBS	phosphate-buffered saline
MEM	minimum essential medium
ERK	extracellular signal-regulated kinase
AC	adenylate cyclase
DG	diacylglycerol
IP ₃	inositol triphosphate
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
p70S6K	ribosomal p70 S6 kinase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
RTK	receptor tyrosine kinase

②セロトニン受容体遮断薬、刺激薬

LY272015

1-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl]-2,3,4,9-tetrahydro-6-methyl-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indole hydrochloride

(5-HT_{2B} receptor antagonist)

SB242084

6-Chloro-2,3-dihydro-5-methyl-*N*-[6-[(2-methyl-3-pyridinyl)oxy]-3-pyridinyl]-1*H*-indole-1-carboxamide dihydrochloride

(5-HT_{2C} receptor antagonist)

TCB-2

(4-Bromo-3,6-dimethoxybenzocyclobuten-1-yl)methylamine hydrobromide

(5-HT_{2A} receptor agonist)

BW723C86

1-[5-(thiophen-2-ylmethoxy)-1*H*-indol-3-yl]propan-2-amine hydrochloride

(5-HT_{2B} receptor agonist)

CP809101

2-[(3-Chlorophenyl)methoxy]-6-(1-piperazinyl)pyrazine hydrochloride

(5-HT_{2C} receptor agonist)

③特異的シグナル伝達因子阻害薬及び活性化薬

AG1478

4-(3-Chloroanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline

(RTK inhibitor)

LY294002

2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-one

(PI3K inhibitor)

PD98059

2'-Amino-3'-methoxyflavone

(MEK inhibitor)

U-73122

1-(6-((17 β -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione

(PLC inhibitor)

U-73343

1-[6-[[[(17 β)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-pyrrolidine-2,5-dione

(Inactive analog of U-73122)

H-89

N-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride

(PKA inhibitor)

GF109203X

2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1*H*-indol-3-yl]-3-(1*H*-indol-3-yl)maleimide

(PKC inhibitor)

BAPTA/AM

1,2-*Bis*(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)

(membrane-permeable Ca²⁺ chelator)

第1編 序論

肝臓は、人体で最も大きな腺臓器であり、成人では体重の約2%を占めており、横隔膜直下の右上腹部に存在している。また、肝臓は代謝の中心的な役割を果たす臓器であり、500種類を超える機能が知られており、様々な生体機能の恒常性維持に関わっている。その多くの機能の中でも、肝臓に特徴的な機能として、糖・脂質・タンパク質の代謝、血漿タンパク質の合成及び分泌、胆汁の合成、尿素合成、解毒機能などが挙げられる¹⁾。

肝臓を構成する細胞は、大きく分けると肝実質細胞とそれ以外の肝非実質細胞となる。肝臓の総細胞数の約70% (湿重量では約90%) を占めているのが、肝実質細胞であり、肝機能の多くはこの細胞が担っている。肝非実質細胞とは、肝実質細胞以外の細胞集団で実質細胞に比較して約1/5～1/10のサイズの細胞から成り、類洞内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、ピット細胞などに分類され、それぞれ特徴的な機能を果たす²⁻⁴⁾。また、肝臓の解剖学的な特徴としては、非常に血管に富んでいることが挙げられえる。一般的な臓器は、流入血管である動脈があり、毛細血管を構築し、静脈へと繋がる。しかし、肝臓は、これらの動脈と静脈に加え、消化管から栄養血管である門脈血が流入する。このため、約1,500 ml/minもの血液が肝臓を通過することになり、この血液量は心拍出量の25%にも及ぶ。

さらに、肝臓は他の臓器にはみられない肝再生 (liver regeneration) と呼ばれる特徴的な自己増殖能を有する⁵⁾。例えば、外科的な肝臓の部分切除や薬物による肝障害が生じ、細胞数や密度が減少すると、自動的に細胞増殖が開始され、肝重量及び肝機能が回復する。ラットの場合では、1週間程度、イヌで約2ヶ月、ヒトでは、これよりやや長い。そして、元の状態に戻ると自動的に再生が停止するといったことが知られている。現在、先天的な肝疾患や肝硬変、肝癌の治療では肝移植が適応となっている。肝疾患の患者数

の増加や移植技術の向上により、肝移植例は増えており、2000年以降ではおよそ400~500例/年となっている⁶⁾。肝臓の再生能力が高いという利点もあり、肝移植では生体肝移植がよく施行されている。しかし、ドナー不足やレシピエント、ドナー双方の移植後のフォローアップには課題が残る。ドナーは、体調が完全に回復するまでに術後数年かかり、約4割の患者が術後の健康への影響を不安に感じている⁷⁾。そのため、これまでの肝再生に関する研究結果は、肝再生のメカニズムを解明し、臨床のニーズに答える新たな「肝再生促進薬」の開発へ繋がる可能性がある。

肝再生は、イモリなどの手足が切断された時の再生とは全く異なるプロセスで進行する⁵⁾。イモリなどの手足の切断部位では、細胞の脱分化が起こり、万能性を示すようになり、増殖能が高まるとされている。一方、肝再生の場合、肝臓の細胞は機能を保持した状態のまま増殖能を高めることができる。さらに、失われた部分が再生するイモリなどと異なり、肝再生は肝臓全体で再生が進行するといった特徴を有する。肝再生という現象自体はとても古くから知られていたと考えられる⁸⁾。その理由として、古代ギリシャ神話において、肝再生に関わる記述があるためである。ギリシャ神話では、「人々に火を与えたとするプロメテウスに対して、全能の神であるゼウスが怒り、プロメテウスは罰として生きながらにして秃鷹に肝臓をついばまれる。しかし、彼の肝臓は翌日には元に戻っており、彼は永久に苦痛を強いられた。」とされている。このように古くから知られていた肝臓の再生能力であったが、これが科学的に調査され、確認されたのは20世紀に入ってからである。1931年、Higgins と Anderson によって70%部分肝切除術 (partial hepatectomy) が発表された⁹⁾。70%の肝臓が外科的に切除されると、肝再生によりラットやマウスでは10日ほど、ヒトでは数ヶ月で元の容積まで回復する。この手法は、*in vivo* 実験系における肝再生モデルの作成法として、今日でも多くの研究で採用されている。*In vivo* 実験系における肝再生モデルの樹立により、肝再生現象の研究が大きく前進し、肝切除時にどのような生体反応が引き起こされているのかということが解明

されつつある。肝再生を進行させる重要な因子として、サイトカイン、成長因子、ホルモンなどの液性因子が挙げられ、これらの働きにより細胞増殖が誘発されると考えられている^{10,11)}。さらに、2匹のラットの血管系を結合した実験モデルにおいて、片方のラットに対して肝切除を施行すると、もう一方のラットの肝臓での DNA 合成能が上昇したとされている¹²⁾。このことは、肝再生における液性因子の重要性を示した。実際に、肝切除が行われた場合、肝臓の他に、消化管や膵臓、甲状腺などから分泌されたホルモンや成長因子が細胞増殖を制御している⁸⁾。例えば、肝切除後、動物の門脈を結紮し、膵臓からのインスリン供給を断つと肝再生が不完全なまま終了する。しかし、肝切除後門脈結紮動物に対し、インスリンを投与することで肝細胞の増殖能が回復し、元の肝重量へと戻すことができる¹³⁾。さらに、甲状腺から分泌される甲状腺ホルモン (triiodothyronine : T₃、thyroxine : T₄) も肝再生に関与していると考えられている^{14,15)}。特に T₃ やその受容体である T₃ hormone receptor β (TR β) のアゴニストは、 β -catenin の活性化に依存した DNA 合成促進作用を示し、肝再生を有意に促進する¹⁶⁾。Michalopoulos は、これら肝再生に関与する生化学的因子 (液性因子) を Fig. 1 のようにまとめている⁸⁾。このように、肝再生は、肝臓のみによって行われる反応ではなく、様々な臓器が関与する全身的な反応であるといえる。

肝再生は、肝切除直後から開始され、肝切除 5 分後にはウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (u-PT) が増加し、その結果、プラスミンやマトリックスメタロプロテアーゼが活性化され、細胞外マトリックスからの肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) の遊離が引き起こる。また、肝切除 30 分後には、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor alpha : TNF- α) やインターロイキン 6 (interleukin-6 : IL-6) などの残余肝付近での血中濃度が上昇する。これらはクッパー細胞から分泌されるサイトカインであり、肝実質細胞の転写因子を活性化する⁹⁾。そのため、TNF- α や IL-6 は、肝再生の開始因子 (priming factor) と考えられ、これらの開始因子により肝実質細胞の細胞周期

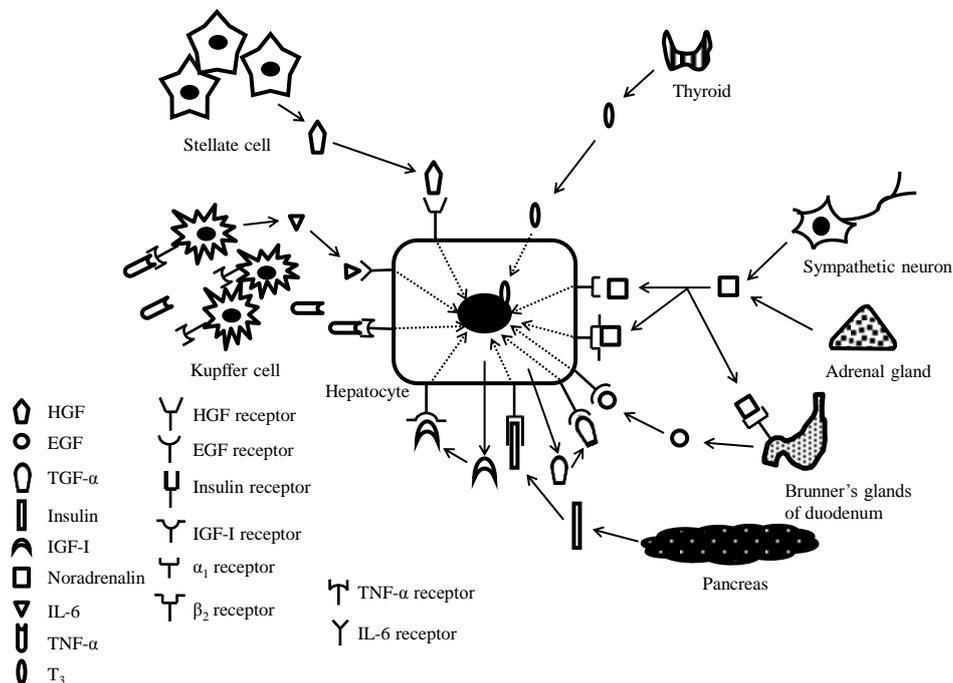


Fig. 1 肝再生に関与する生化学的因子 (液性因子)

が G₀ 期から G₁ 期へと移行し、後に分泌される HGF や形質転換増殖因子 α (transforming growth factor alpha : TGF-α) などの増殖因子により、細胞の分裂・増殖が促進されるといわれている。さらに、肝切除数時間後から肝実質細胞や星細胞において TGF-α、繊維芽細胞増殖因子 1 (fibroblast growth factor-1 : FGF-1)、FGF-2、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF)、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor : PDGF) などの増殖因子の発現量が増加する¹⁷⁾。これらの増殖因子により G₁ 期であった細胞周期が S 期へ移行し、DNA 合成が進み、G₂ 期、M 期へと進行し、細胞分裂が起こる。肝再生が進み、肝臓が切除前の元の容積に戻ると、肝実質細胞や非実質細胞から TGF-β₁ やアクチビン A などの増殖抑制因子が分泌されることにより、DNA 合成を抑制し、増殖が停止すると考えられている^{18,19)}。この様に、肝再生は、肝臓と肝臓以外の様々な臓器と、そこから分泌される増殖因子が複雑に関わることで果たされるということが近年明確になりつつある。しかし、各因子の詳細な作用や作用機構を理解しようとした場合、*in vivo* モデルは個体差の問題や多くの因子が複雑に絡み合うため、それらの

解明には不適切である。そこで、*in vivo* 実験系と並行して単純化した系である *in vitro* 実験系が研究されてきた。

In vitro 実験系のモデルの 1 つとして肝臓の機能を良く反映した初代培養肝実質細胞実験系がある¹⁾。肝臓の主な構成細胞である、肝実質細胞を単離・精製し、初代培養する実験系であり、特に Seglen らが報告した *in situ* コラゲナーゼ還流法 (*in situ* collagenase perfusion method) は、安定した肝実質細胞の単離を可能にした²⁰⁾。この *in vitro* 実験系の確立により、肝実質細胞に対する増殖因子やホルモンの増殖促進作用機構が解明されてきた。例えば、インスリンは、単独でも肝実質細胞の増殖を促進する増殖因子 (mitogen) であるが、EGF と併用した場合、EGF による肝実質細胞増殖促進作用を増強させる²¹⁾。また、カテコールアミン類は、単独では肝実質細胞の増殖に対して影響を与えないが、EGF や HGF といった増殖因子と併用することにより、これらの増殖促進作用を増強させる作用を有する^{22, 23)}。このような因子は、増殖修飾因子 (co-mitogen) と呼ばれている。また、Nakamura らは、*in vitro* 実験系を用いることで肝実質細胞の増殖機構が細胞密度に影響されていることを見出した²⁴⁾。

このように、*in vivo* 部分肝切除モデルや *in vitro* 初代培養肝実質細胞モデルを用いることで、肝再生に関与する因子やその役割が明らかになりつつある。これらを総合的にまとめた肝実質細胞の細胞分裂モデルを Fig. 2 に示した。通常、肝実質細胞は、細胞周期 (cell cycle) から外れている (G_0) が、下記に示した因子により、cell cycle が作動する。そして、これまでに判明した肝再生に関与する因子を分類すると以下のようになる。

- ① 増殖促進因子 (サイトカイン、ホルモン、増殖因子など)
- ② 増殖修飾因子 (カテコールアミン、バソプレシン、アルドステロンなど)
- ③ 増殖抑制因子 (TGF- β_1 、アクチビン A など)
- ④ 細胞密度などの物理的因子

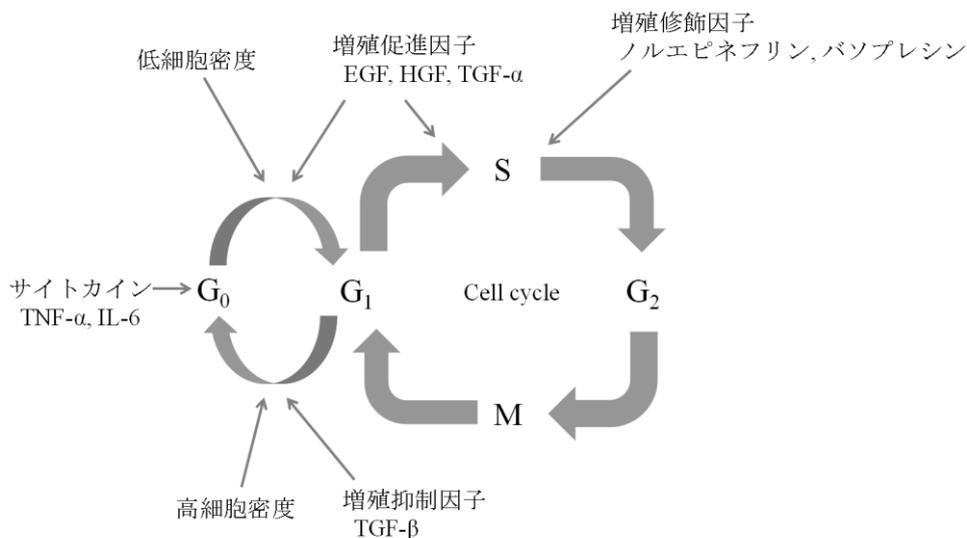


Fig. 2 肝実質細胞の細胞分裂モデル

肝再生時に上記の因子が相互に連携を取りながら細胞の増殖及びその停止、肝機能の回復を成し遂げていることが分かってきたものの、個々の因子の役割やどのようなシグナル伝達機構を介し、細胞応答を引き起こしているかは不明な点が多い。そこで、Kimuraらは、初代培養肝実質細胞実験系を用いて、これまでに成長因子やホルモンなどの肝実質細胞増殖促進（あるいは抑制）作用や増殖因子に対する co-mitogen の修飾作用の詳細なメカニズムを検討してきた。その結果、以前の知見 (Fig. 1 及び Fig. 2) に比較して、以下のような事が判明してきた。

- 1) 増殖因子などによる分裂・増殖促進作用は、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。
- 2) 増殖修飾因子の効果は増殖因子により異なる。
- 3) 増殖促進効果は肝実質細胞の密度に依存することが多い。
- 4) 細胞内シグナル伝達経路には、高い共通性がある。

このように、*in vivo* 実験系及び *in vitro* 実験系における肝再生モデルの確立、そしてこれらのモデルを用いた肝再生メカニズムの研究により、肝再生現象の仕組みが明らかとなりつつある。

さらに近年では、上記に挙げた増殖促進因子の他に、オータコイドの中にも肝実質細胞に対して増殖促進作用や増殖抑制作用を持つものがあることが明らかとなってきた。オータコイドとは、微量で強力な薬理作用を示す生理活性物質であり、ホルモン及び神経伝達物質以外のものであるとされているが、その中でプロスタグランジン類やアンギオテンシン II、セロトニンなどに肝再生を促進或いは抑制する作用が見出されてきた²⁵⁻²⁷⁾。例えば、部分肝切除マウスに対し、アンギオテンシン受容体拮抗薬を投与するとマウスの肝臓での DNA 合成能が上昇し、アンギオテンシン II の受容体の 1 つである AT₁ 受容体をノックアウトした部分肝切除マウスでは、血漿中の HGF 濃度が増加し、DNA 合成能が上昇する²⁶⁾。即ち、これらはアンギオテンシン II が肝再生に対し、抑制的に働いていることを示唆した。

また、セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用は、1998 年に初めて報告され、その後、肝再生におけるセロトニンの重要性が示唆されてきた²⁸⁾。セロトニンは、生体内において血小板に多く含まれ、出血などにより血小板が活性化されることで血小板から血中への放出が促進され、血小板凝集促進に重要な働きを示す。一方、肝臓には血管が多く、血液に富んでいることも寄与し、部分肝切除において、切除後直ちに血小板の集積と凝集が起こる。そのため、セロトニンによる肝再生促進作用は、特に血小板由来のセロトニンによることが注目されている。しかし、そのセロトニンによる詳細な肝再生促進作用機構は未だ報告されていない。そこで、本研究では、初代培養肝実質細胞実験系を用い、セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用とその詳細なメカニズムを解明することを目的とした。第 2 編の第 1 章において、セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用を確認し、基礎的な細胞増殖機構を検討する。そして、第 2 章では、セロトニンによる受容体チロシンキナーゼや MAP キナーゼなどの増殖シグナルに関連したタンパク質のリン酸化促進作用からより詳細な細胞増殖機構を検討し、第 3 章では、セロトニンによる肝実質細胞からの増殖因子の自己分泌促進作用を検討することとした。

第2編 本論

第1章 セロトニンによる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の検討

1. 諸言

セロトニン (5-hydroxytryptamine : 5-HT) は、インドールアミンの一種であり、必須アミノ酸であるトリプトファンから生合成される生理活性アミンである。トリプトファンからのセロトニン生合成は、水酸化と脱炭酸の2段階の反応で行われる。初めにトリプトファン水酸化酵素 (tryptophan hydroxylase : TPH) によりトリプトファンのインドール環の5位が水酸化され、続いて芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素 (aromatic L-amino acid decarboxylase : AADC) により脱炭酸反応を受け、セロトニンとなる (Fig. 3)。セロトニン生合成の律速段階は、TPHによるトリプトファンの水酸化である。また、律速酵素である TPH には、TPH-1 と TPH-2 の2つのアイソフォームが存在する²⁹⁾。TPH-1 は主に末梢のセロトニン産生細胞、TPH-2 は中枢神経系に存在している。尚、セロトニンは、血液脳関門を通過することができないため、中枢に必要なセロトニンは、中枢内のトリプトファンを基に生合成されることになる。

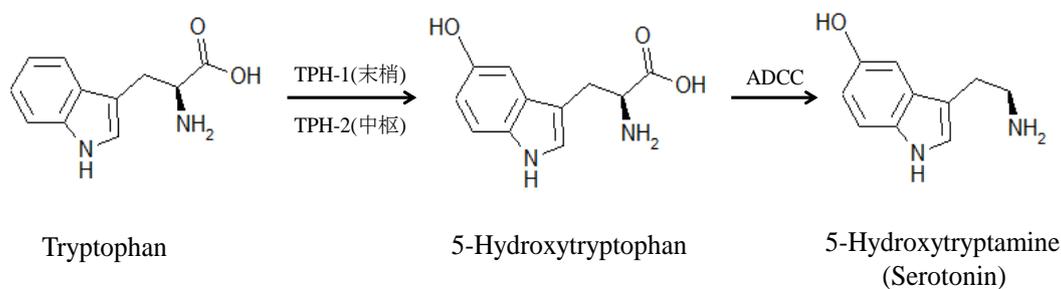


Fig. 3 セロトニンの生合成経路

セロトニンは、ヒトの生体内に約 10 mg あり、その大部分 (90%) が腸管内に分布し、血小板に 8~9%、中枢神経系 (主に松果体) に 1~2%が存在する。腸管に存在するセロトニンは、そのほとんどが腸クロム親和性 (enterochromaffin : EC) 細胞によって産生・分泌され、腸管蠕動運動の亢進や嘔吐運動に関与している。EC 細胞から血中へ分泌したセロトニンの多くは、血小板にあるセロトニントランスポーター (serotonin transporter) により血小板内へ取り込まれる³⁰⁾。そのため、血漿中セロトニン濃度が 0.01~0.05 $\mu\text{g/ml}$ であるのに対し、血小板内セロトニン濃度は 0.2~0.6 $\mu\text{g/ml}$ と高濃度に保たれている³¹⁾。即ち、末梢のセロトニンは、血小板により運搬され、必要に応じて血小板からの放出により供給される。腸管運動等を調節するほか、末梢でのセロトニンの重要な働きとして、血液凝固促進作用が挙げられる。前述した通り、血小板内に高濃度に蓄えられたセロトニンは、血液凝固反応に連動し、血小板外へ放出され、周辺の血小板に作用し、血小板凝集を促進する。また、セロトニンは、末梢組織において腸管運動、血液凝固などに関与するが、中枢神経系では神経伝達物質として働き、脳内のセロトニンは、睡眠と覚醒、生体リズム、体温調節など生体恒常性維持に重要な働きを持つ³²⁻³⁴⁾。また、睡眠ホルモンとして知られるメラトニンは、セロトニンから生合成され、睡眠リズムに関与する。この両者のバランスやサーカディアンリズムが睡眠と覚醒に重要な働きを示すことや不安行動や恐怖といった感情にセロトニンが関与していることも広く研究されている。

このように、セロトニンは末梢並びに中枢と幅広い器官において多彩な生理作用に関与している。これらの多彩な生理作用を可能にしている 1つの要因として、セロトニン受容体サブタイプの種類が多いということが考えられている。セロトニン受容体 (5-HT 受容体) は、大きく 7つに分かれ、さらに細分化され、全部で 14 のサブタイプに分類される³⁵⁾。Barnes らは、5-HT 受容体のアミノ酸配列の相同性の違いから Fig. 4 のような系統図を作成した³⁵⁾。

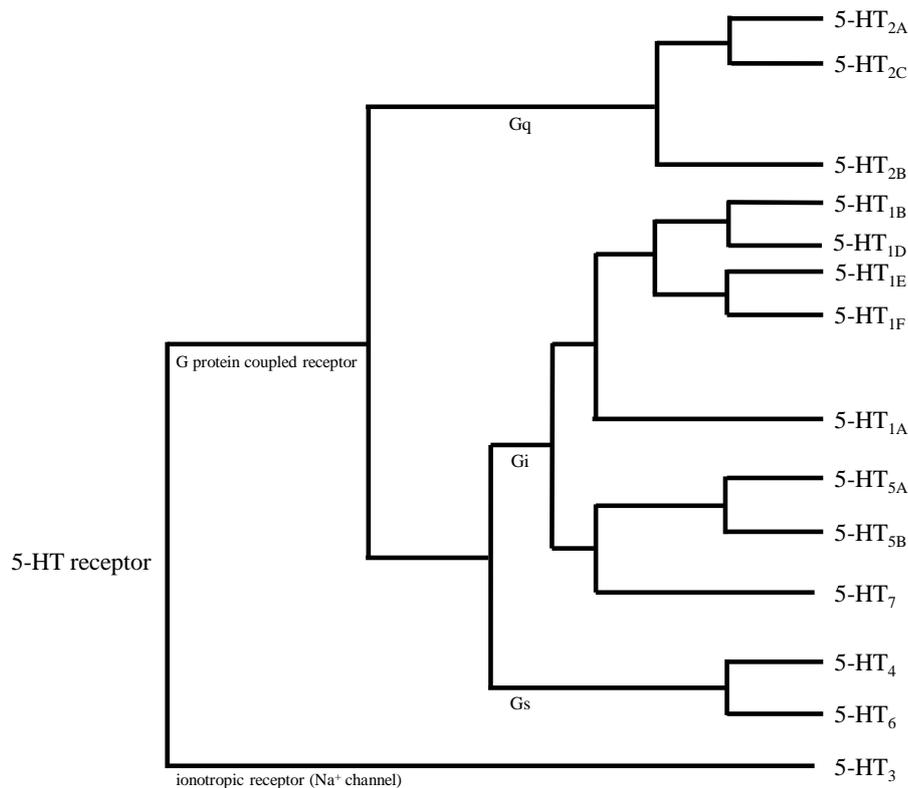


Fig. 4 セロトニン受容体の種類 (Barnes et al., 1999³⁵⁾)

5-HT 受容体のほとんどは、G タンパク質共役型の受容体であり、5-HT₃ 受容体のみが Na⁺チャネルを内蔵している。さらに 5-HT₂ 受容体は、Gq タンパク質共役型であり、5-HT_{1, 4-7} 受容体は、アデニル酸シクラーゼの活性化の調節を行っている。そのため、セロトニンが 5-HT 受容体と結合すると、多くの場合 G タンパク質に関連した種々のタンパク質が活性化などを受け、対応した遺伝子発現やタンパク質修飾を調節する。5-HT 受容体のサブタイプや生体内の分布の違いによりセロトニンは多彩な生理作用を可能としている。セロトニンの働きを理解するためには、5-HT 受容体サブタイプや細胞内における情報伝達を解明することが重要であるといえる。

近年では、セロトニンによる細胞増殖促進作用が様々な細胞で報告されている。例えば、セロトニンは、肺動脈平滑筋細胞 (pulmonary artery smooth muscle cell : PAMSCs) に対して用量依存的 (10⁻⁹-10⁻⁶ M) な細胞増殖促進作用及び抗アポトーシス作用を示した

36)。この作用は、PASMCs のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor) γ の mRNA 量の低下と、それに続く ERK1/2 の活性化であると報告されている。また、ヒト胎盤絨毛癌細胞 (JEG-3) に対する 5-HT_{2A} 受容体を介した増殖促進作用も報告されており、この増殖促進作用は janus kinase (JAK) 2/signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 経路や MEK/ERK 経路が関与しているとされている³⁷⁾。一方、骨芽細胞に対して、セロトニンは、用量依存的 (10^{-9} - 10^{-7} M) に増殖を抑制する。しかし、高用量 (10^{-6} - 10^{-5} M) では、増殖抑制作用が減弱する³⁸⁾。肝細胞におけるセロトニンの増殖促進作用は、ラット初代培養肝実質細胞や正常ヒト肝細胞株 (L-02) でも報告されている。Balasubramanian らが報告したセロトニンの肝実質細胞増殖促進作用は、EGF とセロトニンを併用することで EGF による細胞増殖促進作用を増強するというもので、この作用には、PLC が関与するとされている²⁸⁾。また、5-HT_{1D}、_{2B}、_{2C} 受容体に高親和性を示す quipazine (2~250 μ g/ml) によって L-02 の S 期移行性が増加し、細胞増殖促進作用を示した³⁹⁾。

肝再生、特に部分肝切除時における血小板及び血小板由来のセロトニンの重要性を示した報告としては、血小板による 70%及び 90%部分肝切除マウスや肝硬変ラットに対する肝再生促進作用を示したものがある^{40,41)}。一方、臨床試験において慢性肝炎や肝硬変患者に対する濃厚血小板輸血療法の有用性が検討され、治療により血清アルブミンとコリンエステラーゼの有意な上昇がみられ、一定の効果を示した⁴²⁾。しかし、この探索的臨床試験は、被験者が 10 人と少なく、十分なデータが集められたとは言い難い。さらに、血小板は、献血により入手することからも、貴重な成分であるとともに保存期間が短く (採血後 4 日)、高価であるという側面も問題となるであろう⁴³⁾。そこで、血小板輸血に代わる新たな「肝再生促進薬」の試みの 1 つとしてセロトニンが挙げられる。以上のように、セロトニンの肝再生促進作用はいくつか報告されているが、詳細な細胞内シグナル伝達機構を報告した例は少ない。そこで第 1 章では、ラット初代培養肝実質

細胞に対するセロトニンの細胞増殖促進作用を検討し、その作用がどのような細胞内シグナル伝達機構を介しているのかを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. 実験動物

本実験では、Wistar 系雄性ラット (200-220 g) を用いた。実験動物は、実験前に少なくとも 3 日間、湿度、温度管理及び 12 時間明暗周期の飼育舎で通常の食餌及び水を自由摂取させ、馴化飼育した。尚、実験動物の飼育と取り扱いは、城西大学実験動物実験規定 (動物管理委員会) に準拠した。

2-2. 肝実質細胞の単離と培養

ラット肝実質細胞の単離は、*in situ* コラゲナーゼ還流法により行った¹⁸⁾。Wistar 系雄性ラットに対し、ペントバルビタール (45 mg/kg) を腹腔内に投与した後、開腹し、門脈と下大静脈にカニューレーションを行い、前還流液及びコラゼナーゼ還流液をそれぞれ一定時間還流し、肝臓の結合組織を消化させた。その肝臓を取り出し、Ca²⁺-free-Hanks 液中で十分に肝細胞を分散させ、遠心分離 (600 rpm, 1 min×2) した。更に、肝細胞を 5% ウシ新生児血清 (newborn bovine serum : NBS) 含有の minimum essential medium 液 (以下、MEM と略す) に分散し、遠心分離 (600 rpm, 1 min×2) を行い、肝実質細胞を単離した。単離した肝実質細胞は、トリパンブルー排除試験により細胞の生死を判断し、生存率 97%以上のものを実験に用いた。

単離した肝実質細胞を 5% NBS 及び 10⁻¹⁰ M デキサメタゾン含有 MEM に細胞播種密度が 3.3×10⁴ cells/cm² となるように調整し、それを 6-well collagen-coated plastic culture dish (35 mmφ) に播種した。その後、37°C、5% CO₂ 存在下で 3 時間培養し、ディッシュ

に肝実質細胞を接着された⁴⁴⁾。肝実質細胞接着後、培地を無血清 MEM に交換し、セロトニンや選択的セロトニン受容体刺激薬及び遮断薬、特異的シグナル伝達因子阻害薬などの薬物を添加し、一定時間培養した。

2-3. 肝実質細胞の DNA 合成能の測定

肝実質細胞の DNA 合成能は、³H]-thymidine の取り込み量を測定することで評価した⁴⁵⁾。肝実質細胞を単離し、接着させ、無血清 MEM に交換後、種々の薬物を添加し、培養した。培養終了 2 時間前に³H]-thymidine (1.0 μ Ci/ml) を添加し、培養終了後 phosphate-buffered saline (以下、PBS と略す) で 2 回洗浄し、5% trichloroacetic acid (以下、TCA と略す) を加え、4°C で 30 分間静置し、細胞を沈殿させた。その後、余分な TCA を除き、可溶化剤 (0.1 M NaOH+1% SDS) を 1 ml 加え、細胞を可溶化した。その液 0.4 ml を 40% TCA で中和し、液体シンチレーションカウンター (アロカ LSC5100) で核内に取り込まれた³H]-thymidine を測定した。DNA 合成能は単位時間、単位タンパク質当たりの³H]-thymidine 量 (dpm/mg protein/h) で表した。尚、肝実質細胞のタンパク質量は、SDS-Lowry 法により定量し、補正した⁴⁶⁾。さらに 10 μ M アフィジコリン共存在下の計数量を非特異的取り込み量とし、各薬物群の結果から非特異的取り込み量を差し引いたものを特異的³H]-thymidine 取り込み量として求めた。

2-4. 肝実質細胞の核数計測

核数の計測は、Nakamura らの方法を一部改変して行った⁴⁷⁾。肝実質細胞を単離し、接着させ、無血清 MEM に交換後、種々の薬物で刺激し、一定時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% Triton X-100 含有 0.1 M クエン酸水溶液を 0.3 ml 加え、37°C で 5 分間静置し、細胞膜を溶解し裸核を得た。この液に同量の 0.3% trypan blue 含有 PBS を加え、核を染色し、血球計算盤を用いて核数を計測した。

本実験において、細胞増殖促進作用の指標として細胞数ではなく核数を用いた。その理由として、初代培養肝実質細胞は、一度、細胞をディッシュに接着させると通常のトリプシンなどによる酵素処理では、容易には剥がれにくく、細胞数の計測が困難になるためである。

2-5. 肝実質細胞の細胞周期の測定

肝実質細胞の細胞周期は、セルアナライザーを用いて G₀/G₁ 期及び S 期を測定した。肝実質細胞を単離し、接着させ、無血清 MEM に交換後、5-HT を添加し、一定時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% Triton X-100 含有 0.1 M クエン酸水溶液を加え、37°C で 5 分間静置し、細胞膜を溶解し裸核を得た。この核懸濁液とクエン酸緩衝液及びヨウ化プロピジウムを混和し、暗所にて 15 分間静置した。その後、Muse™ Cell Analyzer (merckmillipore Inc.) を用い、肝実質細胞の G₀/G₁ 期及び S 期を測定した。

2-6. 実験材料

- Wistar 系雄性ラットは、三協ラボサービス (株) (Tokyo, Japan) から購入した。
- セロトニン、デキサメタゾン、アプロチニン、アフィジコリン、BW723C86 は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。
- TCB-2、CP809101、SB242084 は、Tocris Bioscience (Bristol, UK) から購入した。
- ケタンセリン、U-73122、U-73343、GF109203X、H-89、AG1478、LY294002、ラパマイシンは、Enzo Life Sciences (Dallas, TX, U.S.A.) から購入した。
- LY272015、BAPTA/AM は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, U.S.A.) から購入した。
- PD98059 は、Calbiochem-Behring (La Jolla, CA, U.S.A.) から購入した。
- Minimum essential medium (MEM) 、newborn bovine serum (NBS) は、Flow Laboratories (Irvine, Scotland) から購入した。
- Collagenase (type II) は、Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, U.S.A.) から購入した。
- [Methyl ³H]-thymidine (20 Ci/mmol) は、PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, U.S.A.) 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。

2-7. データの統計処理

データは、 $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ で表した。また、有意差検定は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、post hoc 検定として、Dunnett の多重比較検定を用いて、各群の比較を行った。尚、危険率 0.05 未満 ($P < 0.05$) を統計学上有意とみなした。

3. 実験結果

3-1. セロトニンの初代培養肝実質細胞に対する効果

In vitro 実験系の成熟ラット初代培養肝実質細胞において、セロトニン (以下、5-HT と略す) が肝実質細胞に対して増殖促進作用を示すか否かを検討した。Fig. 5 には培地を無血清 MEM へ交換後、5-HT を添加し、4 時間及び 21 時間培養後の肝実質細胞の位相差顕微鏡像を示した。培養 21 時間後において、5-HT (10^{-6} M) を添加した肝実質細胞 (Fig. 5C) では、control (medium ; Fig. 5B) と比べ、1 視野あたりの細胞数の増加が観察された。このことから、5-HT は、肝実質細胞に対して何らかの作用を果たすことにより、肝実質細胞の細胞増殖を引き起こしていると考えられる。また、5-HT のインドール環のヒドロキシ基がメチル基へと置換された 5-methyltryptamine (以下、5-MT と略す) では、5-HT のような肝実質細胞増殖促進効果は、認められなかった (Fig. 5D)。これらの結果から、5-HT は、肝実質細胞に対し単独で細胞増殖促進作用を有すると考えられた。そこで、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用をより詳細に検討するために、肝実質細胞の [3 H]-thymidine の取り込み量と核数を指標とし、検討した。尚、 [3 H]-thymidine の取り込みを DNA 合成能の指標、核数計測を細胞増殖の指標とした。

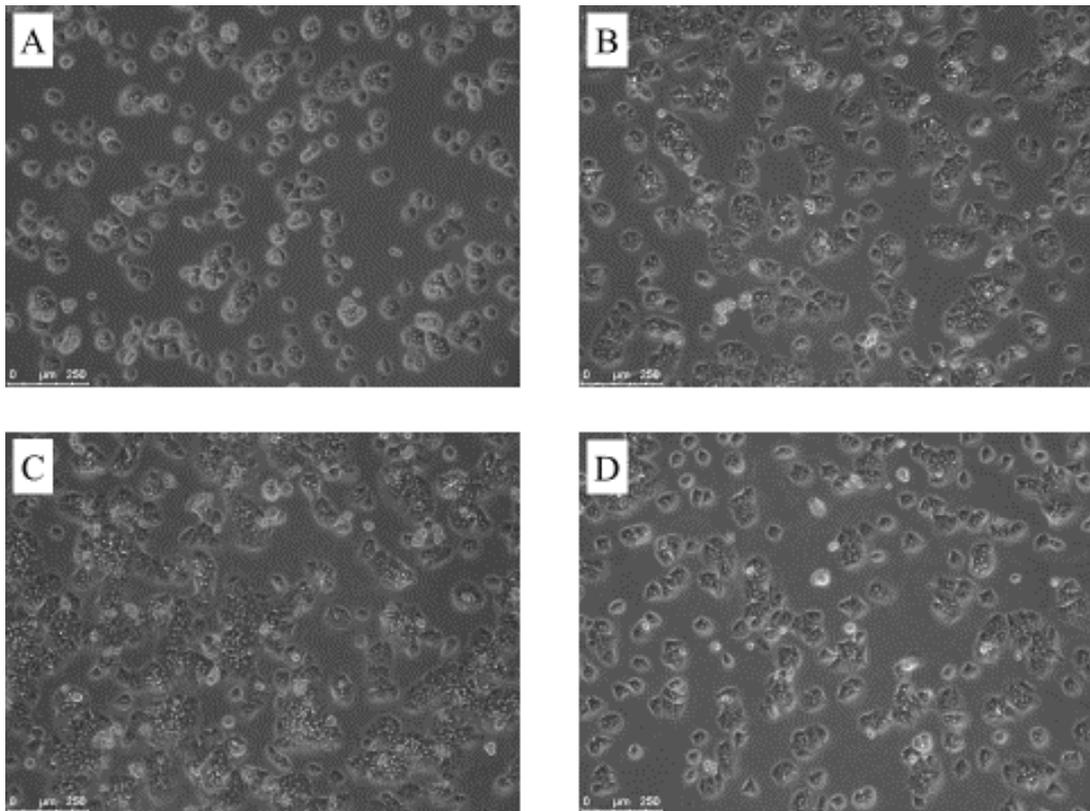


Fig. 5 セロトニンの初代培養肝実質細胞に対する効果
(位相差顕微鏡像)

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm²

培養時間：A, 4 時間, B-D, 21 時間

薬物処理：A, B, Control (medium),
C, 5-hydroxytryptamine (5-HT, 10^{-6} M),
D, 5-methyltryptamine (5-MT, 10^{-6} M)

スケールバー：250 μm

3-1-1. セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化

培地を無血清 MEM に交換し、5-HT (10^{-6} M) または 5-MT (10^{-6} M) を添加した時間を培養 0 時間とし、培養 21 時間後までの肝実質細胞の DNA 合成能及び核数の経時的変化を検討し、その結果を Fig. 6A (DNA 合成能) と Fig. 6B (核数計測) に示した。

5-HT は、培養 2 時間後から肝実質細胞の DNA 合成能を上昇させ始め、培養 2.5 時間後には control に対して有意な DNA 合成能の上昇がみられ、培養 3.5 時間後には最大となり、この時の DNA 合成能は control と比較し、約 6 倍となった (Fig. 6A)。一方、5-MT は培養 21 時間までの間で肝実質細胞の DNA 合成能に対して影響を与えなかった。また、核数計測における 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用の検討では、培養 2.5 時間後でその核数の増加が示され始め、培養 4 時間後に最大となった。この時の 5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は control と比較し、約 1.2 倍となった (Fig. 6B)。一方、5-MT は、肝実質細胞の DNA 合成能と同様に培養 21 時間までの間で肝実質細胞の核数に影響を与えなかった。

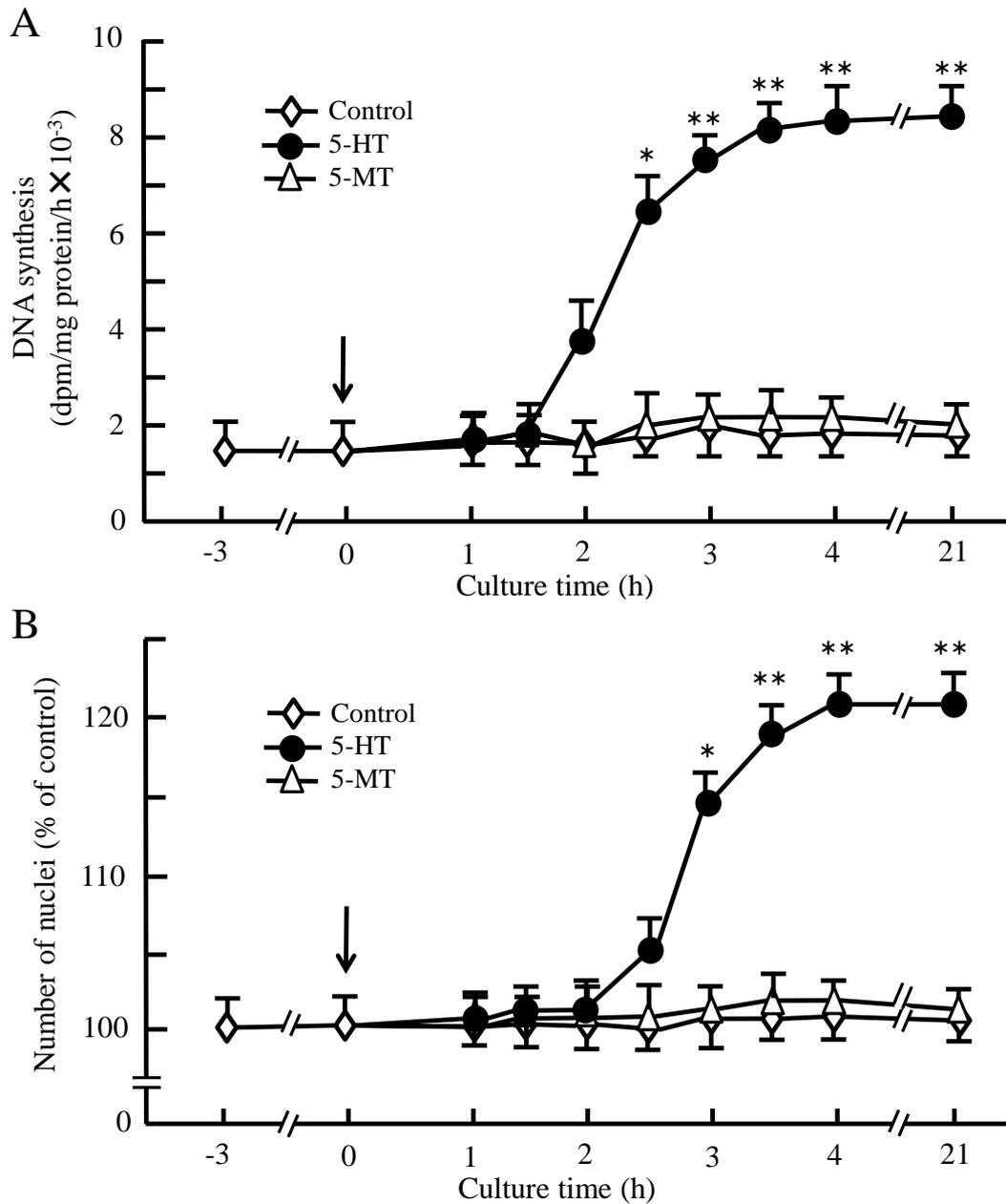


Fig. 6 セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化

A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), 5-MT (10^{-6} M)

値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

有意差 : 各々 control に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

矢印 : 薬物添加

3-1-2. セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係

次に、5-HT による肝実質細胞 DNA 合成促進作用及び増殖促進作用の用量-反応関係を検討した。経時的変化の結果より、培養時間を肝実質細胞増殖促進作用の最大反応が得られた 4 時間に設定し、種々濃度の 5-HT あるいは 5-MT を添加し、DNA 合成能及び核数の変化を検討した。その結果をそれぞれ Fig. 7A (DNA 合成能) と Fig. 7B (核数計測) に示した。

5-HT (10^{-10} - 10^{-5} M) は、用量依存的に肝実質細胞の DNA 合成能を上昇させ、細胞増殖を促進させた。5-HT では、 3×10^{-8} M から DNA 合成能の上昇が示され、 3×10^{-7} M で有意な DNA 合成能の上昇がみられ、 3×10^{-6} M で最大反応を示し、control と比較して約 6 倍の DNA 合成能となり、それより高濃度で DNA 合成促進作用はプラトーとなった (Fig. 7A)。5-HT の肝実質細胞に対する DNA 合成促進作用の 50%有効濃度 (EC_{50}) は 1.85×10^{-7} M であった。また、核数計測においても 5-HT は、DNA 合成能とほぼ同様の結果となり、最大反応を示した時の核数は control と比較し、約 1.2 倍の増加 ($EC_{50} = 2.14 \times 10^{-7}$ M) であった (Fig. 7B)。一方、5-MT は 10^{-10} - 10^{-5} M において、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対してほとんど影響を与えなかった。

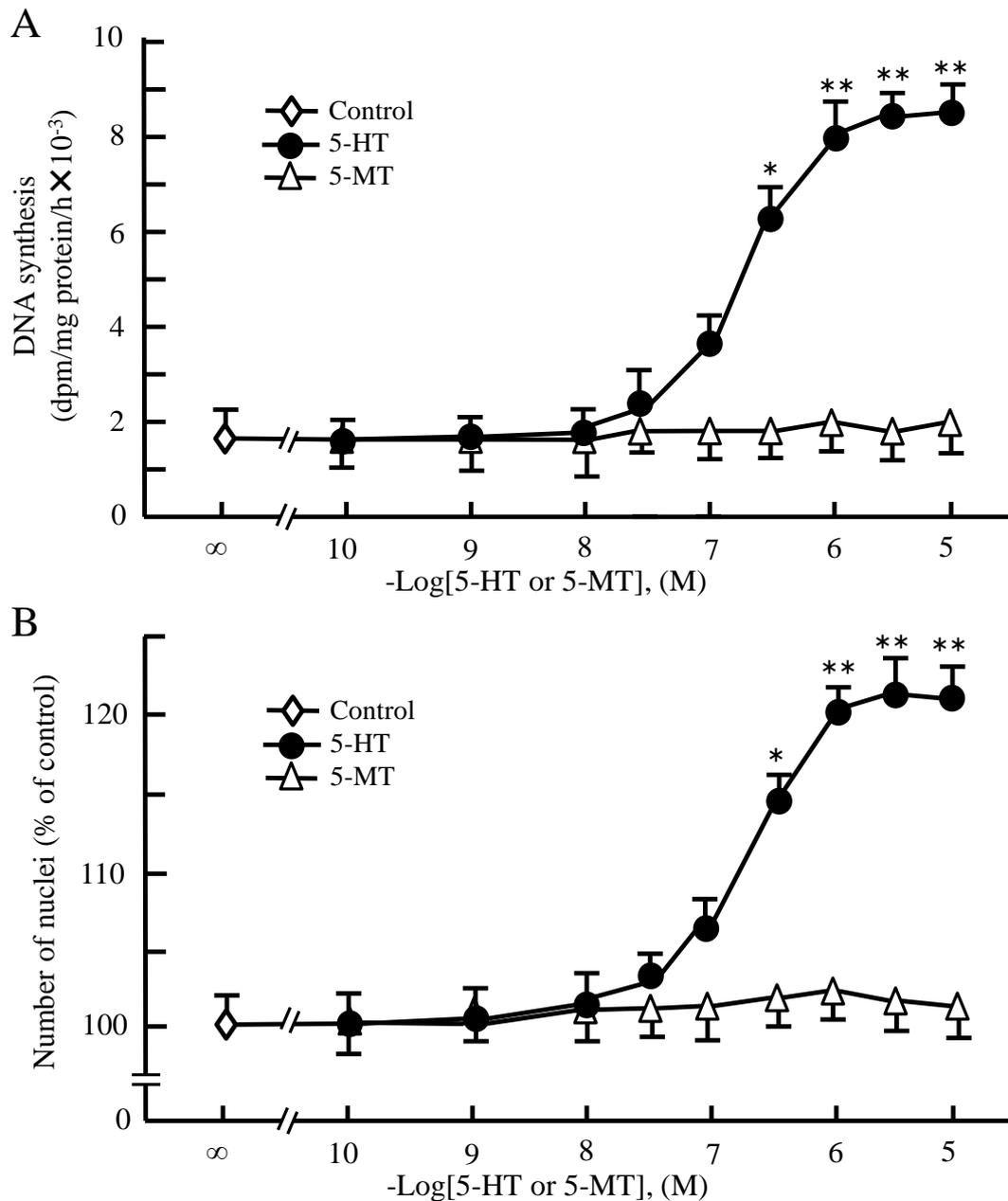


Fig. 7 セロトニンによる肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係

A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理 : 5-HT (10^{-10} - 10^{-5} M), 5-MT (10^{-10} - 10^{-5} M)

値 : 平均値±標準誤差 (n=3)

有意差 : 各々 control に対するに対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2. セロトニンの初代培養肝実質細胞に対する S 期移行性に関する検討

次に、実際に肝実質細胞の細胞周期において 5-HT により G₀/G₁ 期から S 期への移行が促進しているか否かを検討した。5-HT を添加した時間を培養 0 時間とし、培養 4 時間後までの G₀/G₁ 期及び S 期の割合を検討し、その結果をそれぞれ Fig. 8A(G₀/G₁ 期) と Fig. 8B(S 期) に示した。

肝実質細胞の G₀/G₁ 期の割合は、薬物添加の開始前 (-3 時間) と比較し、0 時間以降で有意な減少がみられた。さらに、5-HT (10⁻⁶ M) は、培養 2 時間後では control と比較し有意に G₀/G₁ 期の割合を減少させた。この G₀/G₁ 期の減少は、培養 4 時間後までみられた。肝実質細胞の S 期の割合は、control では薬物添加の開始前 (-3 時間) と比較し、培養 4 時間後までの間で有意な変化はなかった。一方、5-HT (10⁻⁶ M) は、培養 2 時間以降では control と比較し、有意な S 期の増加がみられ、培養 4 時間後では約 3.5 倍 S 期の割合が増加した。

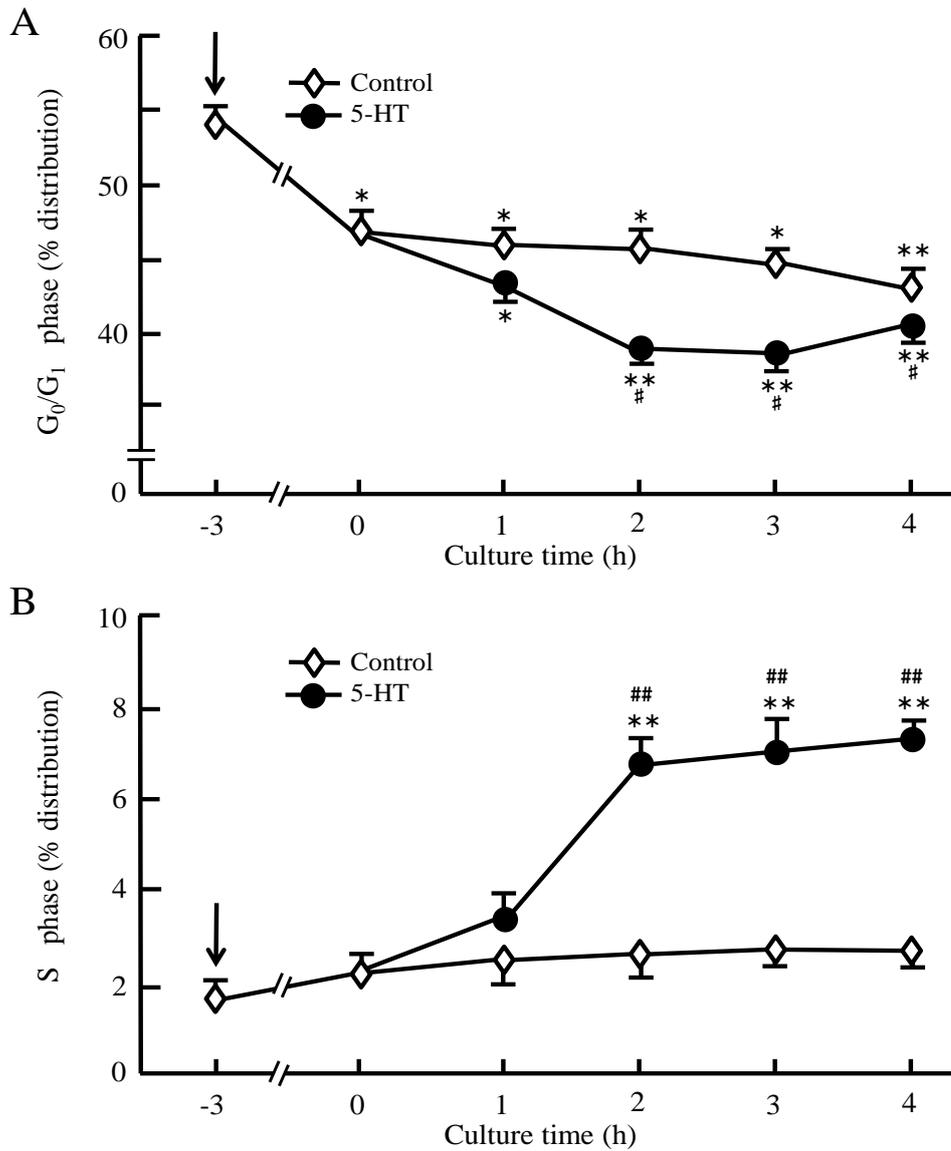


Fig. 8 肝実質細胞におけるセロトニンによるS期移行性に関する検討

A : G₀/G₁期 B : S期

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M)

値 : 平均値±標準誤差 (n=3)

有意差 : 薬物添加の開始前 (-3 時間) に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01),

有意差各々controlに対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

矢印 : 薬物添加

3-3. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用におけるセロトニン受容体サブタイプに関する検討

これまでの結果から、5-HT は肝実質細胞に対して用量及び培養時間に依存した DNA 合成促進作用及び細胞増殖促進作用を有していることを見出した。次に、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用が 5-HT 受容体のうち、どのサブタイプの受容体を介しているのかを検討した。尚、*in vitro* 及び *in vivo* における 5-HT の肝再生促進作用は 5-HT₂ 受容体を介しているという報告^{27,28)}があるため、本実験では、5-HT₂ 受容体サブタイプに対する選択的遮断薬及び刺激薬を用いて検討を行った。

3-3-1. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ遮断薬の効果

5-HT により誘発された肝実質細胞の DNA 合成促進作用及び細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ遮断薬の用量-反応関係を検討した。5-HT₂ 受容体には 3 つのサブタイプ (2A、2B、2C) が知られている。そこで本実験は、選択的 5-HT_{2A} 受容体遮断薬として ketanserin⁴⁸⁾、選択的 5-HT_{2B} 受容体遮断薬として LY272015⁴⁹⁾、選択的 5-HT_{2C} 受容体遮断薬として SB242084⁵⁰⁾を用いて行った。5-HT の用量を 10⁻⁶ M、培養時間を 4 時間と設定し、各種選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ遮断薬を 10⁻¹⁰-10⁻⁶ M の用量で併用した結果を Fig. 9A (DNA 合成能) 及び Fig. 9B (核数計測) に示した。

5-HT (10⁻⁶ M) により誘発された肝実質細胞の DNA 合成促進作用は、選択的 5-HT_{2B} 受容体遮断薬である LY272015 により阻害された。LY272015 による 5-HT の DNA 合成促進作用に対する阻害作用は用量依存的であり、10⁻⁷ M において control レベルまで完全に DNA 合成能を抑制した。一方、ketanserin (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M) と SB242084 (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M)

は、5-HT による DNA 合成促進作用に影響を与えなかった (Fig. 9A)。また、核数計測においても DNA 合成能と同様の傾向がみられ、5-HT による細胞増殖促進作用は LY272015 によってのみ用量依存的に抑制された (Fig. 9B)。

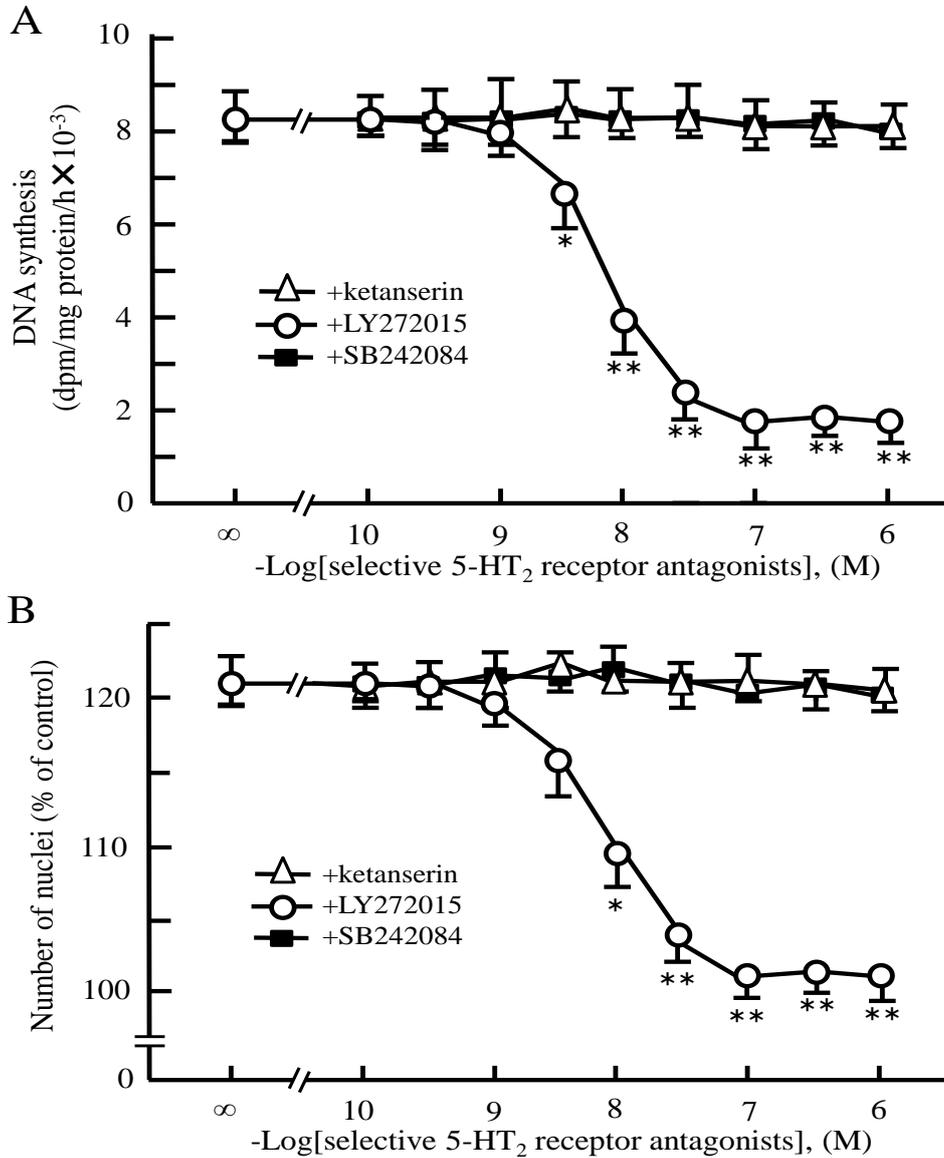


Fig. 9 セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ遮断薬の効果
 A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)
 細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
 薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), ketanserin (10^{-10} - 10^{-6} M), LY272015 (10^{-10} - 10^{-6} M), SB242084 (10^{-10} - 10^{-6} M)
 値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
 有意差 : 5-HT 単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-3-2. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ刺激薬の効果

次に、5-HT の肝実質細胞に対する DNA 合成促進作用と細胞増殖促進作用が 5-HT_{2B} 受容体を介しているかを更に確認するために、選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ刺激薬を用いて検討した。本実験では、選択的 5-HT_{2A} 受容体刺激薬として TCB-2⁵¹⁾、選択的 5-HT_{2B} 受容体刺激薬として BW723C86⁵²⁾、選択的 5-HT_{2C} 受容体刺激薬として CP809101⁵³⁾ を用い、これらの肝実質細胞に対する細胞増殖促進作用の用量-反応関係の結果を Fig. 10A (DNA 合成能) 及び Fig. 10B (核数計測) に示した。

肝実質細胞の DNA 合成能は、選択的 5-HT_{2B} 受容体刺激薬である BW723C86 (10^{-10} - 10^{-5} M) によって上昇がみられ、 10^{-7} M では control に対し有意な DNA 合成能の上昇が生じ、 10^{-6} M で最大反応に達し、この時、control と比較して DNA 合成能は約 6 倍となった。そして、 10^{-6} M 以上の用量の BW723C86 による DNA 合成促進作用はプラトーとなり、その EC₅₀ は 6.89×10^{-8} M であった (Fig. 10A)。BW723C86 による DNA 合成促進作用の最大反応は、5-HT のそれとほぼ同様の結果を示した。一方、TCB-2 (選択的 5-HT_{2A} 受容体刺激薬) 及び CP809101 (選択的 5-HT_{2C} 受容体刺激薬) は 10^{-10} - 10^{-5} M において、肝実質細胞の DNA 合成能に対して影響を与えなかった。

また、肝実質細胞増殖促進作用においても、DNA 合成能とほぼ同様の結果 (BW723C86 の EC₅₀ = 8.39×10^{-8} M) を示した (Fig. 10B)。

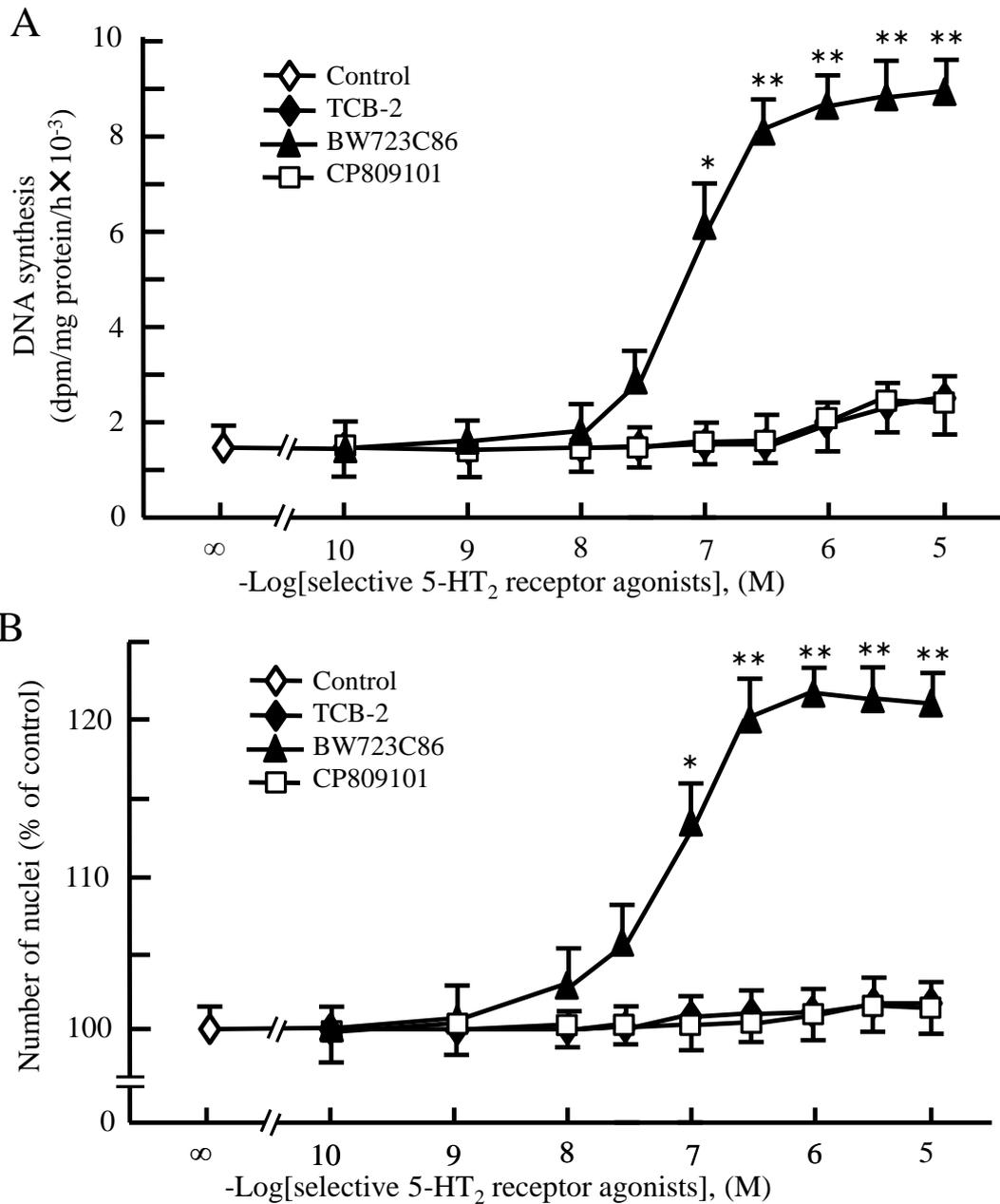


Fig. 10 セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ刺激薬の効果
 A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)
 細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
 薬物処理 : TCB-2 (10^{-10} - 10^{-5} M), BW723C86 (10^{-10} - 10^{-5} M), CP809101 (10^{-10} - 10^{-5} M)
 値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
 有意差 : 各々 control に対するに対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-4. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討

これまでの結果より、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT_{2B} 受容体と結合することで発現することが判明した。次に 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用がどのような細胞内シグナル伝達経路を介して細胞増殖を果たしているのかを明らかにするために特異的シグナル伝達因子阻害薬を 5-HT と併用し、その効果を検討した。その結果を Fig. 11A (DNA 合成能) 及び Fig. 11B (核数計測) に示した。

本研究では、増殖関連シグナル伝達因子の阻害薬として、AG1478 (受容体チロシンキナーゼ阻害薬, 10^{-6} M)⁵⁴⁾、LY294002 (PI3K 阻害薬, 3×10^{-7} M)⁵⁵⁾、PD98059 (MEK 阻害薬, 10^{-6} M)⁵⁶⁾ 及びラパマイシン (mTOR 阻害薬, 10 ng/mL)^{57,58)} を用いた。また、5-HT 受容体の多くは G タンパク質と共役していることから、その下流に位置するシグナル伝達因子である adenylyate cyclase (以下、AC と略す)、protein kinase A (以下、PKA と略す)、phospholipase C (以下、PLC と略す)、protein kinase C (以下、PKC と略す) 及び細胞内 Ca²⁺ の阻害薬として、それぞれ 2,4-dideoxyadenosine (AC 阻害薬, 10^{-6} M)⁵⁹⁾、H-89 (PKA 阻害薬, 10^{-6} M)⁶⁰⁾、U-73122 (PLC 阻害薬, 10^{-6} M)、U-73343 (U-73122 の不活性型アナログ, 10^{-6} M)、GF109203X (PKC 阻害薬, 10^{-6} M)⁶¹⁾ 及び BAPTA/AM (細胞膜透過性 Ca²⁺キレート剤, 10^{-7} M)⁶²⁾ を用い、これらのシグナル伝達因子の関与も検討した。

その結果、5-HT (10^{-6} M) により誘発された肝実質細胞 DNA 合成促進作用は、AG1478、LY294002、PD98059、ラパマイシンにより、各々 control レベルまで抑制された。これらの結果から、5-HT による DNA 合成促進作用は、少なくとも受容体チロシンキナーゼ、PI3K、MEK、mTOR といったシグナル伝達因子を介していることが示唆された。さらに、U-73122、BAPTA/AM によっても DNA 合成能が抑制され、これは、Gq/PLC/Ca²⁺経路の関与を示す結果となった。一方、AC 阻害薬である 2,4-dideoxyadenosine、PKA 阻害薬である H-89、PKC 阻害薬である GF109203X は、5-HT による DNA 合成促進作用に対

して影響を与えなかった (Fig. 11A)。また、肝実質細胞増殖促進作用においても DNA 合成能の結果とほぼ同様の結果となった (Fig. 11B)。尚、本実験で用いた特異的シグナル因子阻害薬は、全て単独では肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖に対し、影響を与えなかった。また、5-HT 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薬の効果は、各々幾つかの濃度 (10^{-9} ~ 10^{-6} M、0.01~10 ng/ml) において評価し、最も抑制作用を示す適した濃度に設定し、実験を行った。尚、それらは、ほぼ文献的に示されている 50%阻害濃度 (IC_{50}) 付近の濃度であった。

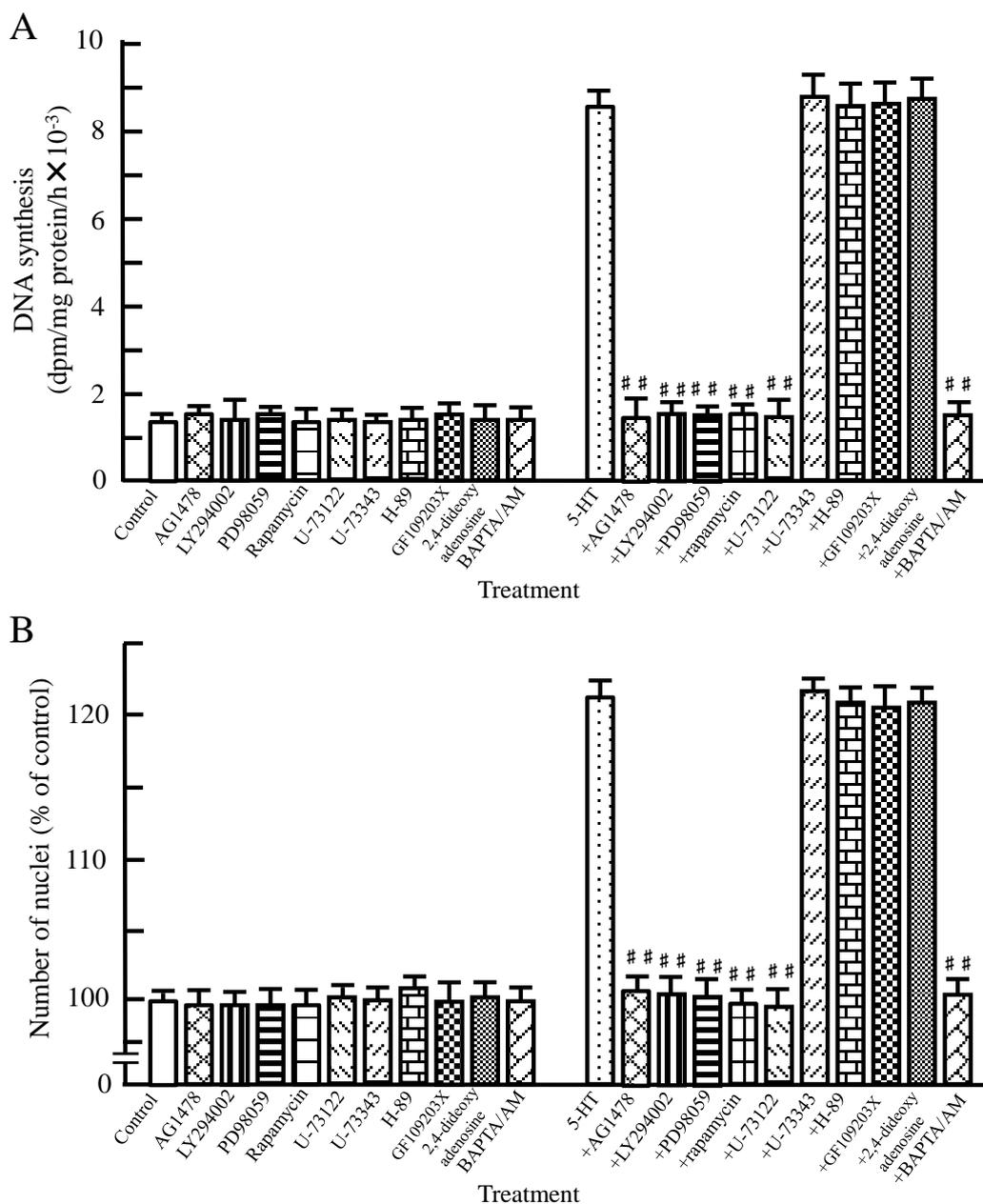


Fig.11 セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : DNA 合成能 B : 核数(細胞増殖)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (10^{-6} M), PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml), U-73122 (10^{-6} M), U-73343 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M), 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-6} M)

値 : 平均値±標準誤差(n=3)

有意差 : 5-HT 単独添加群に対する有意差(#P<0.05, ##P<0.01)

4. 考察

4-1. セロトニンの成熟ラット初代培養肝実質細胞の増殖に対する効果

本研究では、*in vitro* 実験系の肝再生モデルである初代培養肝実質細胞実験系において 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用の細胞内シグナル伝達機構を検討した。

Fig. 5 の位相差顕微鏡像では、無血清 MEM に交換し、5-HT (10^{-6} M) の添加後 21 時間で肝実質細胞の増殖が確認された。即ち、これは 5-HT が肝実質細胞に何らかの作用を示した結果、細胞増殖を引き起こすと考えられた。この 5-HT による肝実質細胞増殖促進作用のより詳細な作用機構を調査するために、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用を、 $[^3\text{H}]$ -thymidine の取り込みと核数計測を指標として検討した。

5-HT による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化 (Fig. 6) の検討において、5-HT は添加後の培養時間に依存した DNA 合成促進作用及び細胞増殖促進作用を示した。その DNA 合成能は培養 3.5 時間後で、細胞増殖促進作用は培養 4 時間後でそれぞれ最大反応を示した。これらの結果は、Balasubramanian らによって報告されていた 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用より早期に細胞増殖を起こすことが判明した。更に、本実験条件では、EGF や HGF といった増殖因子でも同様の傾向がみられている^{44,63)}。細胞増殖が早期に起こった原因としては次のようないくつかが考えられる。その 1 つとして、細胞播種時の細胞密度がある。肝実質細胞の増殖機構には、細胞密度が深く関係していると考えられている。*In vitro* 実験系において、肝実質細胞は高細胞密度条件下 (10^5 cells/cm²) では培養約 40 時間以上経過しないと DNA 合成能の上昇がみられないのに対し、 2.5×10^4 cells/cm² といった低細胞密度条件下では培養 5 時間程度で DNA 合成能の上昇がみられている⁴⁷⁾。また、*in vivo* 実験系において、肝切除後ラットの腹腔内スペースを制限すると、開始因子である TNF- α や IL-6 の血中濃度が変化せず、肝再生が遅延するといった

報告がある⁶⁴⁾。即ち、肝再生機構では詳しくは判明していないが、cell-to-cell communication や cell-to-cell contact といった細胞間での情報伝達が行われていると考えられている⁶⁵⁾。加えて、肝実質細胞増殖促進作用が早期に起こった 2 つ目の理由として、培養液中に含まれるデキサメタゾンの濃度が挙げられる。デキサメタゾンは初代培養肝実質細胞に対して、その用量に依存して、HGF や EGF による肝実質細胞増殖促進作用を遅延させる^{66,67)}。本実験条件では、従来報告されているデキサメタゾンの濃度が 10^{-10} M と非常に低濃度であったため、デキサメタゾンの影響がほとんどなく、細胞増殖が早期に起こったと考えられる。3 つ目としては、本実験で肝実質細胞の単離に用いたコラゲナーゼ還流法の影響である。通常の肝細胞は G_0 期であり、細胞周期が静止している状態であるが、コラゲナーゼによる還流を行い、肝実質細胞を単離した場合、 G_0 期から G_1 期への移行が始まるといわれている⁶⁸⁾。そして、血清含有培地で肝実質細胞を接着させるために 3 時間要しているため、肝実質細胞の細胞周期は S 期へ移行する手前まである程度進行していると推測される。そのため、5-HT の刺激に対して、素早い反応を示し、DNA 合成期である S 期へ早期に移行したと考えられる。

5-HT による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係 (Fig. 7) の検討において、5-HT (10^{-10} - 10^{-5} M) は、用量依存的な肝実質細胞増殖促進作用を示した。5-HT により誘発されたこれらの作用の最大反応 (DNA 合成能; 約 6 倍、細胞増殖促進作用; 約 1.2 倍) は、既存の増殖因子である EGF や TGF- α 、IGF-I などと同程度であった^{44, 69, 70)}。

5-MT は、5-HT 受容体に対して作動薬として働くが、5-HT 受容体との結合能に関する報告はほとんどない。しかし、1993 年に Watts らは、配列相同性が高い 5-HT_{1C} 受容体と 5-HT₂ 受容体 (約 50% 相同) において、5-MT が 5-HT₂ 受容体より 5-HT_{1C} 受容体に対し 1000 倍ほど受容体親和性が高いと報告している⁷¹⁾。現在では、5-HT_{1C} 受容体は 5-HT_{2C} 受容体と名称が変更されており、これは 5-HT の肝再生促進作用が 5-HT₂ 受容体を介しているという報告がいくつかある一方で、5-HT_{2C} 受容体刺激である可能性は、低

いといえる。

4-2. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対するセロトニン受容体サブタイプの関与に関する検討

5-HT による肝実質細胞増殖促進作用が、5-HT 受容体のどのサブタイプを介しているかを明らかにするために、選択的 5-HT 受容体遮断薬を用いて、5-HT によって誘発された DNA 合成促進作用及び肝実質細胞増殖促進作用に対する効果を検討した。5-HT の受容体には、7 種類 (5-HT₁ 受容体-5-HT₇ 受容体) が存在し、さらに細分化された 14 のサブタイプが明らかとなっている。一方、5-HT による肝再生促進作用が 5-HT₂ 受容体を介している可能性を示唆する報告^{27,28)}が多くあることから、本実験では、5-HT_{2A}~5-HT_{2C} 受容体サブタイプ遮断薬を用いた。

Fig. 9 で示すように、5-HT により誘発された肝実質細胞の DNA 合成促進作用及び細胞増殖促進作用は、選択的 5-HT_{2B} 受容体遮断薬である LY272015 によって阻害され、この阻害作用は用量依存的であった。一方、ketanserin (選択的 5-HT_{2A} 受容体遮断薬) や SB242084 (選択的 5-HT_{2C} 受容体遮断薬) を 5-HT と併用した場合には、各々 10⁻¹⁰-10⁻⁶ M の濃度において 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用に対して影響を与えなかった。これらの結果から、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT_{2B} 受容体を介して発現している可能性が示唆された。そこで、5-HT₂ 受容体サブタイプ刺激薬を用いて更なる検討を行った結果、選択的 5-HT_{2B} 受容体刺激薬である BW723C86 にのみ、用量依存的な肝実質細胞増殖促進作用が現れた (Fig. 10)。

以上の結果から、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT_{2B} 受容体を介し、増殖シグナルを細胞内へ伝達することで行われているということが明らかとなった。Lesurtel らの報告によると、ラットの肝臓を部分的に切除すると肝臓中で 5-HT_{2A} 及び 5-HT_{2B} 受

容体の mRNA 量が増えるとされている²⁷⁾。さらに、部分肝切除ラットに 5-HT₂ 受容体遮断薬を投与することで肝再生の抑制がみられたと報告している。5-HT の肝実質細胞増殖促進作用を初めて報告した Balasubramanian からも同様に 5-HT₂ 受容体の関与を示唆している²⁸⁾。

5-HT は、様々な 5-HT 受容体を介して細胞増殖に関与しているとされており、特に 5-HT_{2B} 受容体を介した作用が多く報告されている。心筋細胞、網膜細胞、骨芽細胞、膵β細胞や小腸の自動運動のペースメーカーとして機能するカハール介在細胞などは、5-HT_{2B} 受容体がそれぞれの細胞増殖に関与するとしてこれまでに報告されている⁷²⁻⁷⁷⁾。即ち、5-HT は、5-HT_{2B} 受容体を介して、増殖や生存をサポートすることで心臓や網膜の形成、目の形態形成を調節している^{72, 73)}。また、選択的 5-HT_{2B} 受容体作動薬である BW723C86 (5×10^{-8} M) は、カハール介在細胞に対して、細胞数を 135%増加させ、Ki-67 陽性細胞数も 128.5%増加させた⁷⁶⁾。

4-3. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討

5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT_{2B} 受容体と 5-HT が結合することで引き起こされることが判明した。そこで、5-HT_{2B} 受容体が 5-HT により活性化し、どのような細胞内シグナル伝達経路を経由するのかを、特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いて薬理的に検討した。

細胞は、細胞膜に存在する受容体 (receptor) とその受容体に対応するリガンド (ligand) が結合することで、外からの情報を受け取り、遺伝子発現を調節し、多彩な生理機能を発現する。細胞外の情報を細胞の核内へと伝達する働きを持つものがシグナル伝達因子であり、多種存在するシグナル伝達因子によって、いくつもの機能が厳密に調節されている。そのため、シグナル伝達因子及びその経路を解明することは生体機能の

理解や医薬品の開発にとって重要なことである。細胞増殖に関して言及すると、増殖因子である EGF などが受容体 (EGF であれば EGF receptor) と結合することで、受容体内蔵されたチロシンキナーゼが活性化され、この下流に存在する Ras が活性化される。活性化した Ras は Raf をリン酸化し、Raf は更にその下流のシグナル伝達因子をリン酸化または脱リン酸化してシグナルを伝えていく⁷⁸⁾。このように細胞外からの増殖シグナルは、細胞内でリン酸化を経由することで情報が増殖関連転写因子に到達し、細胞増殖を引き起こす。肝実質細胞では、多くの増殖因子 (HGF、TGF- α 、IGF-I など) において、受容体チロシンキナーゼ→Ras→Raf→PI3K→MAP キナーゼ→mTOR といったシグナル伝達が行われ、細胞増殖を引き起こす^{63,69,70)}。Fig. 11 で示すように 5-HT による肝実質細胞増殖促進作用もこれらの増殖因子と同様のシグナル伝達が行われている可能性が高い。さらに、これらの増殖関連シグナル伝達因子に加え、Gq/PLC/Ca²⁺経路を介しているという特徴がみられた。即ち、細胞内の Ca²⁺濃度が上昇したことで、増殖因子受容体の受容体チロシンキナーゼを活性化したのか、あるいは肝実質細胞からの増殖因子の自己分泌を促進させたということも考えられる。実際、肝実質細胞は TGF- α や IGF-I といった増殖因子を自身の細胞内に貯蔵しており、必要に応じて分泌する能力を持つ。また、プロスタグランジン E₂ や IL-1 β などの生理活性物質が肝実質細胞から TGF- α の分泌を促進したという報告が既にされている^{79,80)}。

以上のことから、5-HT は、Fig. 12 に示すように、肝実質細胞に対して増殖促進因子として働くことが判明し、そのシグナル伝達の一部に受容体チロシンキナーゼ/PI3K/MEK/mTOR/PLC/Ca²⁺を介することが示された。一方で、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用機構の解明のためには、Gq/PLC/Ca²⁺経路と受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ経路との関係性を明らかにする必要があると考えられる。

5. 小括

第1章では、5-HTの肝実質細胞に対する基礎的な増殖促進作用機構を薬理的なアプローチにより検討した。5-HTは、単独で培養時間及び濃度に依存した肝実質細胞増殖促進作用を有する増殖促進因子であるということが明らかとなった。その5-HTの肝実質細胞増殖促進作用は、選択的5-HT_{2B}受容体遮断薬であるLY272015により、完全に抑制された。一方、選択的5-HT_{2B}受容体刺激薬であるBW723C86も同様に、肝実質細胞増殖促進作用を有したことから、5-HTが肝実質細胞膜上の5-HT_{2B}受容体を刺激することで細胞増殖を引き起こすということが示唆された。また、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検討した結果、PLC、細胞内Ca²⁺、受容体チロシンキナーゼ、PI3K、MEK、mTORといったシグナル伝達因子が5-HTによる肝実質細胞の増殖に深く関与することが明らかとなった。

上記の結果を総合的にまとめると、Fig. 12のようなシグナル伝達機構が考えられる。即ち、5-HTは、5-HT_{2B}受容体/Gq/PLC/Ca²⁺経路を介し、何らかの作用により受容体チロシンキナーゼ/MAPキナーゼ経路を活性化することで細胞増殖に至ることが推測された。

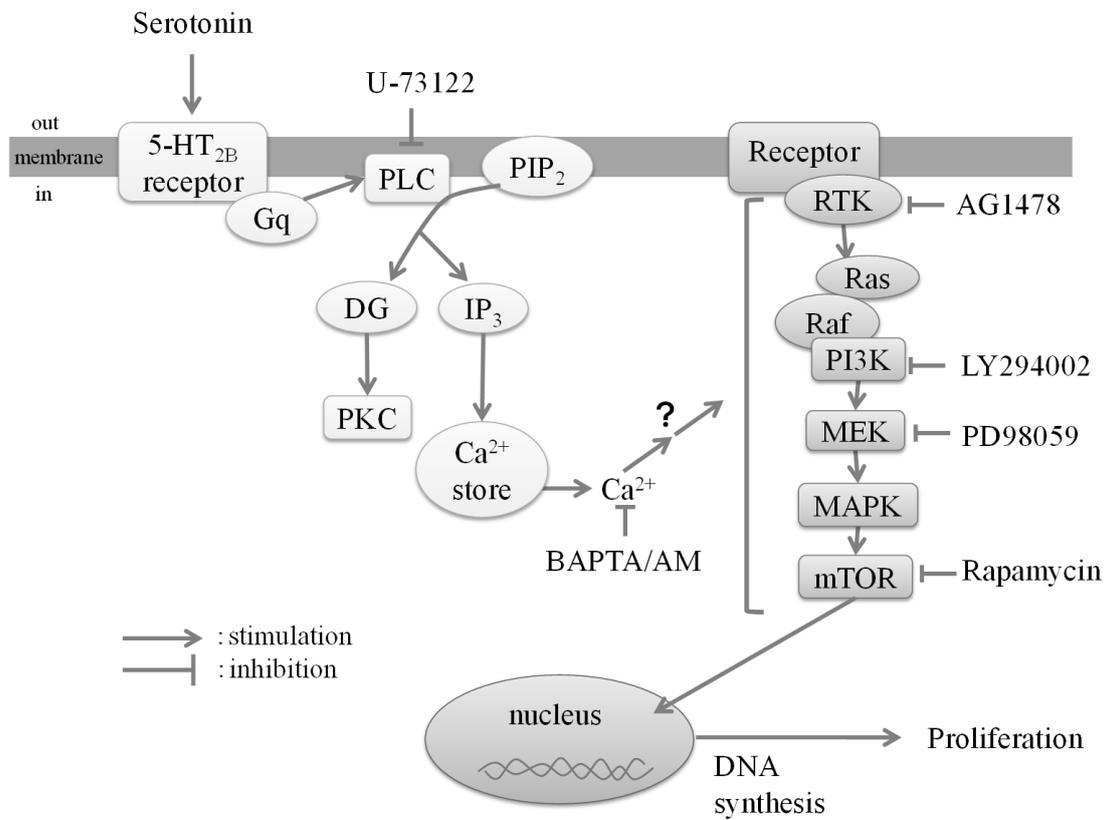


Fig. 12 セロトニンによる初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構のモデル (1)

第2章 成熟ラット初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼ、MAP キナーゼ及び p70S6 キナーゼリン酸化促進作用の検討

1. 諸言

第1章では、5-HT が肝実質細胞に対して単独で、培養時間及び用量に依存した細胞増殖促進作用を示すことを見出した。また、この 5-HT の肝実質細胞促進作用は、5-HT_{2B} 受容体を介し、Gq/PLC/Ca²⁺経路及び受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ経路と関連しているということが推測された。そこで本章では、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用に関わるシグナル伝達に関して、主要な増殖関連シグナル伝達因子である EGF/TGF- α 受容体 チロシンキナーゼ (EGF/TGF- α -receptor tyrosine kinase : EGF/TGF- α -RTK) と MAP キナーゼ (以下、MAPK と略す)、さらに、肝実質細胞の増殖に関与している可能性が示唆されている p70S6 キナーゼ (以下、p70S6K と略す) のリン酸化活性を検出することで、より詳細な検討を行うことを目的とした。

EGF/TGF- α 受容体は、その受容体内にチロシンキナーゼを内蔵しており、大きく3つのドメイン (リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン) に分かれている⁸¹⁾。チロシンキナーゼは、細胞内ドメインに内蔵されており、細胞外で受け取ったリガンドの情報を細胞内へと伝達するために重要な働きを行っている。EGF/TGF- α 受容体は、リガンドと結合し、2つの受容体が2量体を形成することで活性化される。互いの受容体をリン酸化することで EGF-TGF- α -RTK が活性化される。その後、アダプタータンパク質である Grb2 内の SH2 ドメインが受容体チロシンキナーゼの活性化を認識し、SH3 ドメインを介して Sos を活性化する。活性化した Sos は Ras を活性化させ、更に Raf→MEK→MAPK と順に活性化させていく。活性化した MAPK は遺伝子発現などを調節し、細胞分化や細胞増殖において中心的な役割を果たすとされている⁸²⁾。

5-HT による MAPK の活性化に関してもいくつか報告がある。例えば、血管平滑筋細胞における 5-HT によるシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase : COX)-2 の発現量上昇作用が挙げられる⁸³⁾。この作用は、5-HT の刺激により非受容体チロシンキナーゼである Src、PKC 並びに MAPK の関与が示唆されている。5-HT は、血管平滑筋細胞に対する COX-2 発現量上昇作用を有するほか、収縮機構にも関与しているとされ、この収縮機構には、5-HT_{2A} 受容体を介した MAPK の活性化が報告されている⁸⁴⁾。また、子宮平滑筋腫細胞では、5-HT_{1B} 受容体を遮断することで MAPK 活性が抑制され、細胞増殖を抑制し、アポトーシスを引き起こす⁸⁵⁾。

このように、5-HT による生理作用の中には MAPK を介したものが存在している。そして、本研究における 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用においても MAPK の関与が予想される。そこで、第 2 章では、増殖に関与するタンパク質のリン酸化活性を測定することで、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用の詳細な作用機構の解明を試みた。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験動物

第1章の「実験動物」の項目に準じた。

2-2. 肝実質細胞の単離と培養

第1章の「肝実質細胞の単離と培養」の項目に準じた。

2-3. EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定

EGF/TGF- α -RTK (175-kDa) のリン酸化活性は、抗リン酸化 EGF/TGF- α -RTK モノクローナル抗体を用いた western blot 解析法により測定した⁸⁶⁾。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、ディッシュに接着させた後、無血清 MEM へ交換し、5-HT や 5-HT 受容体遮断薬などを添加し、培養した。一定時間培養した後、肝実質細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 mL の lysis buffer (20 mM Tris buffer, pH7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2.5mM tetrasodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を加え、細胞をディッシュから剥離し、採取した。これを 3 分間超音波処理した後、遠心分離 (3,000 \times g, 3 min, 4 $^{\circ}$ C) し、上清画分を 5 分間煮沸し、サンプルとした。得られたサンプル (30 μ g/lane) を 7.5% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、polyvinylidene difluoride (以下、PVDF と略す) membrane に転写させた。その後、抗リン酸化 EGF/TGF- α -RTK モノクローナル抗体と反応させ、続けて horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG ポ

リクローナル抗体を用いて標識した。次に、リン酸化 EGF/TGF- α -RTK を ECL kit を用いて発光標識し、その強度として検出した。発光強度は化学発光解析装置 (KURABO, ChemiStage CC-16) を用いて測定及び解析を行った。尚、リン酸化 EGF/TGF- α -RTK (P-p175 kDa) は、非リン酸化 EGF/TGF- α -RTK モノクローナル抗体 (total p175kDa) を用いて基準化補正をした。

2-4. MAP キナーゼリン酸化活性の測定

MAPK のリン酸化活性は、抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体を用いて、MAP キナーゼのアイソフォームである extracellular signal-regulated kinase (以下、ERK と略す) 1 (44 kDa) 及び ERK2 (42 kDa) 各々について western blot 解析法により測定した^{87, 88)}。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、ディッシュに接着させ、無血清 MEM へ交換し、5-HT や 5-HT 受容体遮断薬などを添加し、培養した。一定時間培養した後、肝実質細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 mL の lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH7.4, 1% Triton X-100, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin) を加え、細胞をディッシュから剥離し、採取した。これを 3 分間超音波処理した後、遠心分離 (16,300 \times g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた上清画分を 5 分間煮沸した。そのサンプル (20 μ g/lane) を 10% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membran に転写させた。その後、抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体と反応させ、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて標識した。次に、リン酸化 MAPK を ECL kit を用いて測定及び解析を行った。尚、リン酸化 MAPK (P-p44 kDa /P-p42 kDa) は、非リン酸化 MAPK モノクローナル抗体 (total p44 kDa/p42 kDa) を用いて基準化補正をした。

2-5. p70S6 キナーゼリン酸化活性の測定

p70S6K のリン酸化活性は、抗リン酸化 p70S6K モノクローナル抗体を用いた western blot 解析法により測定した。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、ディッシュに接着させ、無血清 MEM へ交換し、5-HT や 5-HT 受容体遮断薬などを添加し、培養した。一定時間培養した後、肝実質細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 mL の lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH7.4, 0.1% SDS, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin) を加え、細胞をディッシュから剥離し、採取した。これを 3 分間超音波処理した後、遠心分離 (16,300×g, 30 min, 4°C) し、得られた上清画分を 5 分間煮沸した。そのサンプル (20 µg/lane) を 10% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membran に転写させた。その後、抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体と反応させ、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて標識した。次に、リン酸化 p70S6K を ECL kit を用いて測定及び解析した。尚、リン酸化 p70S6K(P-p70 kDa) は、非リン酸化 p70S6K モノクローナル抗体 (total p70 kDa) を用いて基準化補正をした。

2-6. 実験材料

- ・ソマトスタチンとベラパミルは、Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, U.S.A.) から購入した。
- ・抗リン酸化 EGF/TGF- α -RTK 抗体、抗 EGF/TGF- α -RTK 抗体、抗リン酸化 MAPK 抗体、抗 MAPK 抗体、抗リン酸化 p70S6K 抗体及び抗 p70S6K 抗体は、Cell Signaling Technology (Beverly, MA,U.S.A.) から購入した。
- ・その他の試薬は第 1 章の「実験材料」の項目に準じた。

2-7. データの統計処理

第1章の「データの統計処理」の項目に準じた。

3. 実験結果

3-1. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の検討

第 1 章の実験結果から、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用は、受容体チロシンキナーゼ/MAPK 経路を介している可能性が示唆された。そこで、受容体チロシンキナーゼ/MAPK 経路に関して、より詳細な細胞内シグナル伝達機構を調べるために、EGF/TGF- α -RTK のリン酸化活性を western blot 解析法により直接測定した。

培地を無血清 MEM に交換し、5-HT (10^{-6} M) を添加した時間を培養時間 0 分とし、培養 60 分までの肝実質細胞における EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性の経時的変化を検討した。その結果を Fig. 13 に示した。

5-HT (10^{-6} M) による EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性は、培養 1 分後には上昇がみられ、培養 5 分後には有意な EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性の上昇を示し、培養 10 分後にこの活性は、ピークとなった。その後は培養 60 分まで緩やかな EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性の減少を示し、培養 60 分後にはほぼ control レベルとなった。一過性の最大活性を示した時 (培養 10 分後)、control と比較して 5-HT (10^{-6} M) による EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性は、約 3 倍まで上昇した。

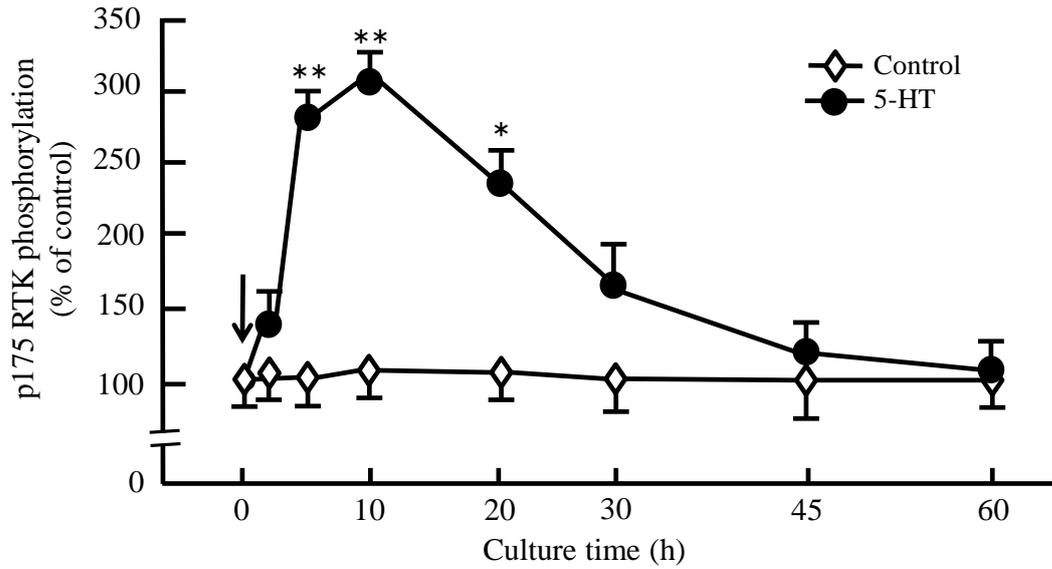


Fig. 13 肝実質細胞におけるセロトニンによる EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の経時的変化
 細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm²
 薬物処理：5-HT (10^{-6} M)
 値：平均値 \pm 標準誤差 (n=3)
 有意差：各々 control に対するに対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)
 矢印：薬物添加

3-2. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化促進作用に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果

Fig. 13 の結果から、5-HT の EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性は、刺激後 10 分で最大となることが判明した。そこで、この EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ遮断薬及び特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果を検討した。尚、用いた増殖関連シグナル伝達因子阻害薬及び G タンパク質関連シグナル伝達因子阻害薬は、第 1 章 3-2-2. の実験と同様である。さらに本実験では、ベラパミル (L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬, 10⁻⁶ M) とソマトスタチン (分泌顆粒分泌阻害薬, 10⁻⁷ M)⁸⁹⁾も用いた。

5-HT 添加 10 分後における EGF/TGF- α -RTK のリン酸化活性は、LY272015 (10⁻⁷ M)、AG1478 (10⁻⁶ M)、U-73122 (10⁻⁶ M)、BAPTA/AM (10⁻⁷ M)、ベラパミル (10⁻⁶ M) 及びソマトスタチン (10⁻⁷ M) によって、各々 control レベルまで抑制された。一方、LY294002 (3 \times 10⁻⁷ M)、PD98059 (10⁻⁶ M)、ラパマイシン (10 ng/mL)、U-73343 (10⁻⁶ M)、H-89 (10⁻⁶ M)、GF109203X (10⁻⁶ M) 並びに 2,4-dideoxyadenosine (10⁻⁶ M) を 5-HT と併用したところ、これらの薬物は全て 5-HT によって誘発された EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性に対して影響を与えなかった (Fig. 14)。

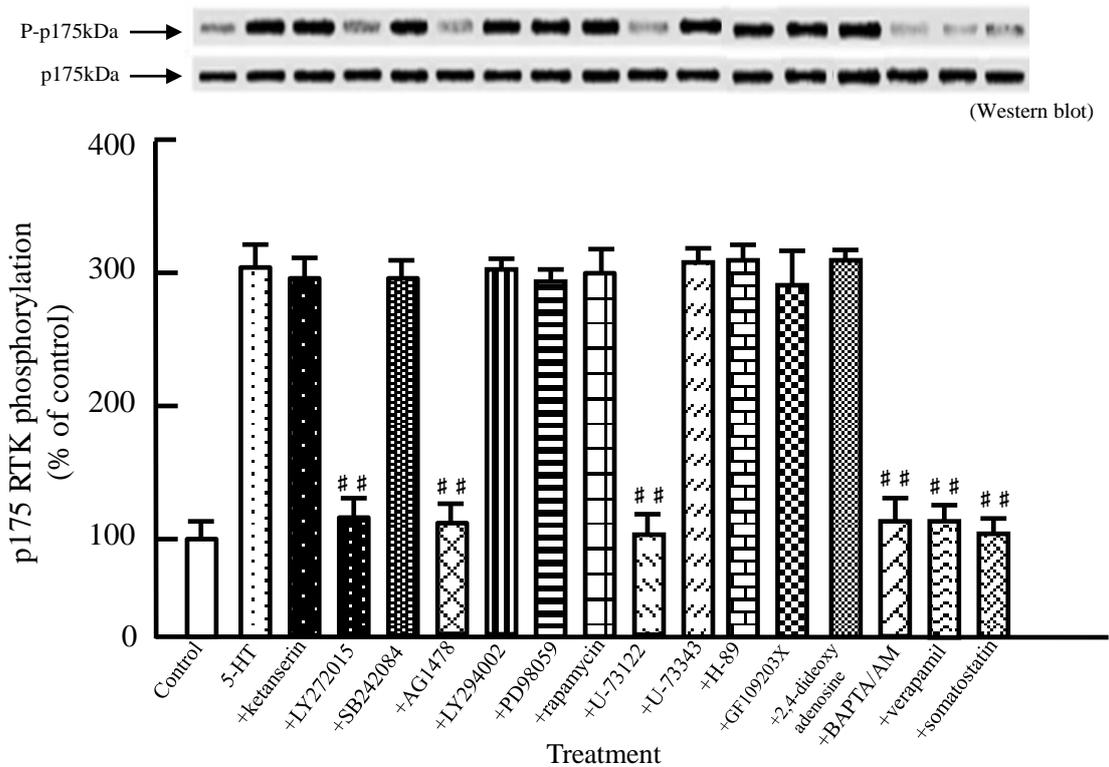


Fig. 14 肝実質細胞におけるセロトニンによる EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間：10 分

薬物処理：5-HT (10^{-6} M), ketanserin (10^{-6} M), LY272015 (10^{-7} M), SB242084 (10^{-6} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (3×10^{-7} M), PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml), U-73122 (10^{-6} M), U-73343 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M), 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M), verapamil (10^{-6} M), somatostatin (10^{-7} M)

値：平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差：5-HT 単独添加群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-3. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる MAP キナーゼリン酸化活性の検討

次に、肝実質細胞における 5-HT による MAPK のリン酸化活性の経時的変化を検討した。その結果を Fig. 15 に示した。

培地を無血清 MEM に交換し、5-HT (10^{-6} M) を添加した時間を培養時間 0 分とし、培養 60 分までの肝実質細胞における MAPK リン酸化活性を測定した。

MAPK には、ERK1 (p44 kDa) と ERK2 (p42 kDa) の 2 つのアイソフォームが存在するが、5-HT による MAPK リン酸化活性は ERK2 のみにみられ、この ERK2 リン酸化活性は培養 20 分後に control と比べ有意な上昇を示し、培養 30 分後で一過性のピークとなった。その後は培養 60 分後まで高い値を示した。最大反応をとった時 (培養 30 分後) の 5-HT (10^{-6} M) による ERK2 リン酸化活性は control と比較して約 3 倍であった。また、5-HT (10^{-6} M) による ERK1 のリン酸化活性は培養 60 分の間で認められなかった (Fig. 15)。

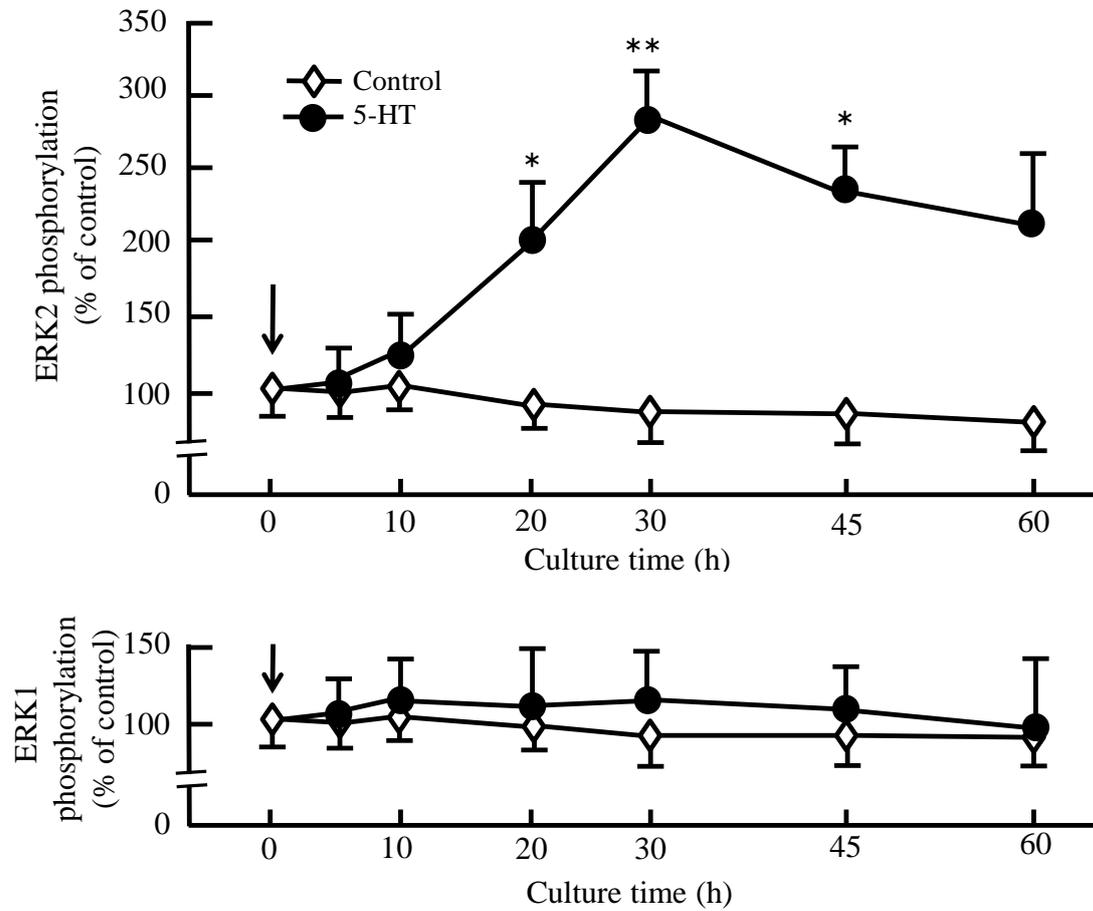
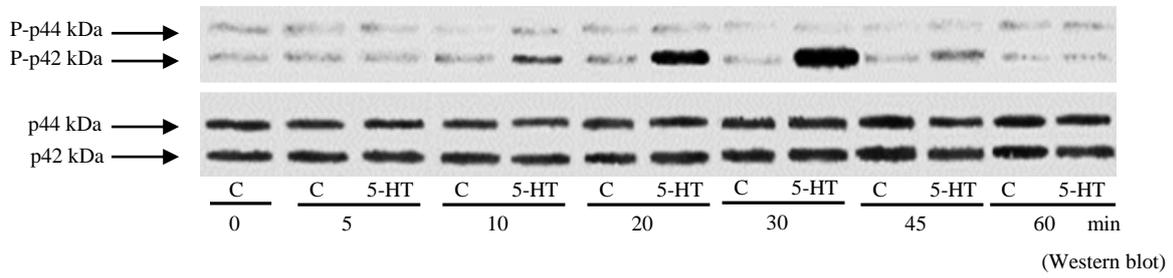


Fig. 15 肝实质細胞におけるセロトニンによる MAP キナーゼリン酸化活性の経時的変化

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理：5-HT (10^{-6} M)

値：平均値±標準誤差 (n=3)

有意差：各々control に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

矢印：薬物添加

3-4. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる MAP キナーゼリン酸化促進作用に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果

Fig. 16 の結果から、5-HT による MAPK (以下、ERK2 とする) リン酸化活性は、添加後 30 分で最大となることが判明した。そこで、培養時間を 30 分と固定し、肝実質細胞における 5-HT による ERK2 リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果を検討した。尚、本実験で用いたシグナル伝達因子阻害薬は、3-2. と同様である。

5-HT 誘発 ERK2 リン酸化活性は、LY272015 (10^{-7} M)、AG1478 (10^{-6} M)、LY294002 (3×10^{-7} M)、PD98059 (10^{-6} M)、U-73122 (10^{-6} M)、BAPTA/AM (10^{-7} M)、ベラパミル (10^{-6} M) 及びソマトスタチン (10^{-7} M) によって、各々 control レベルまで抑制された。一方、ketanserin (10^{-6} M)、SB242084 (10^{-6} M)、ラパマイシン (10 ng/mL)、U-73343 (10^{-6} M)、H-89 (10^{-6} M)、GF109203X (10^{-6} M) 並びに 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M) は、全て 5-HT による ERK2 リン酸化活性には影響を与えなかった (Fig. 16)。

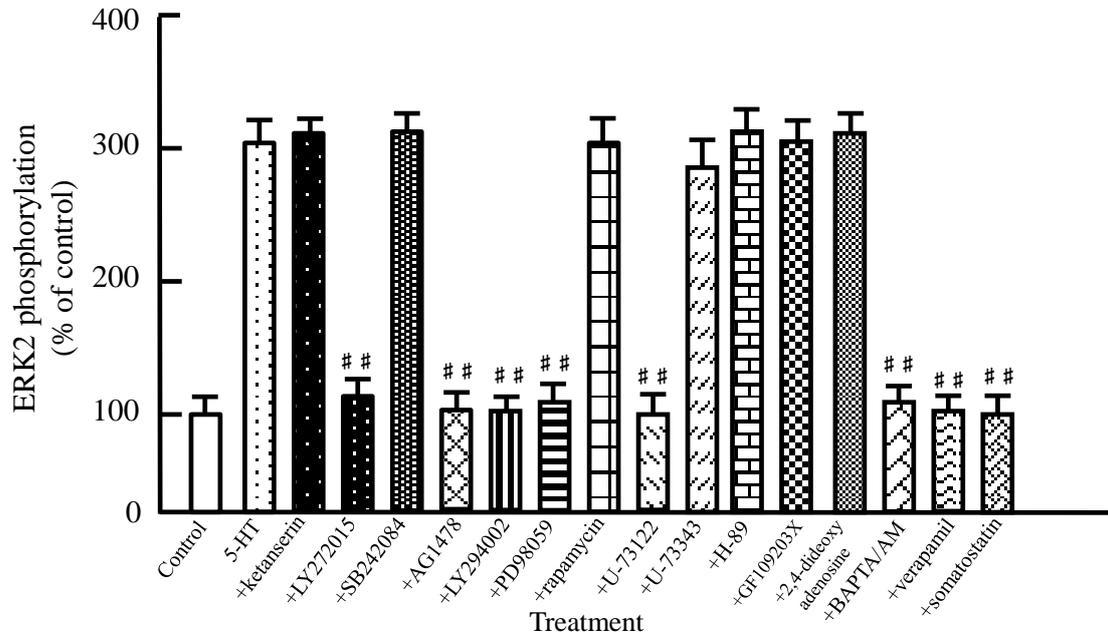
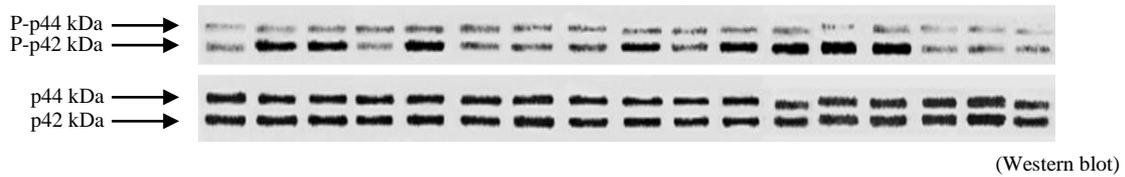


Fig. 16 肝実質細胞におけるセロトニンによる MAP キナーゼリン酸化活性に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間 : 30 分

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), ketanserin (10^{-6} M), LY272015 (10^{-7} M), SB242084 (10^{-6} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (3×10^{-7} M), PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml), U-73122 (10^{-6} M), U-73343 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M), 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M), verapamil (10^{-6} M), somatostatin (10^{-7} M)

値 : 平均値±標準誤差 (n=3)

有意差 : 5-HT 単独添加群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-5. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる p70S6 キナーゼリン酸化活性の検討

次に肝実質細胞における 5-HT による p70S6K リン酸化活性の経時的変化を検討した。その結果を Fig. 17 に示した。

培地を無血清 MEM に交換し、5-HT (10^{-6} M) を添加した時間を培養時間 0 分とし、培養 60 分までの肝実質細胞の p70S6K リン酸化活性を測定した。

5-HT による p70S6K リン酸化活性は、培養 15 分後からみられ、培養 30 分後にピークとなった。この時、5-HT (10^{-6} M) による p70S6K リン酸化活性は、control と比較して約 1.8 倍であった (Fig. 17)。また、培養 30 分以降、5-HT による p70S6K リン酸化活性は、control 付近まで減少した。

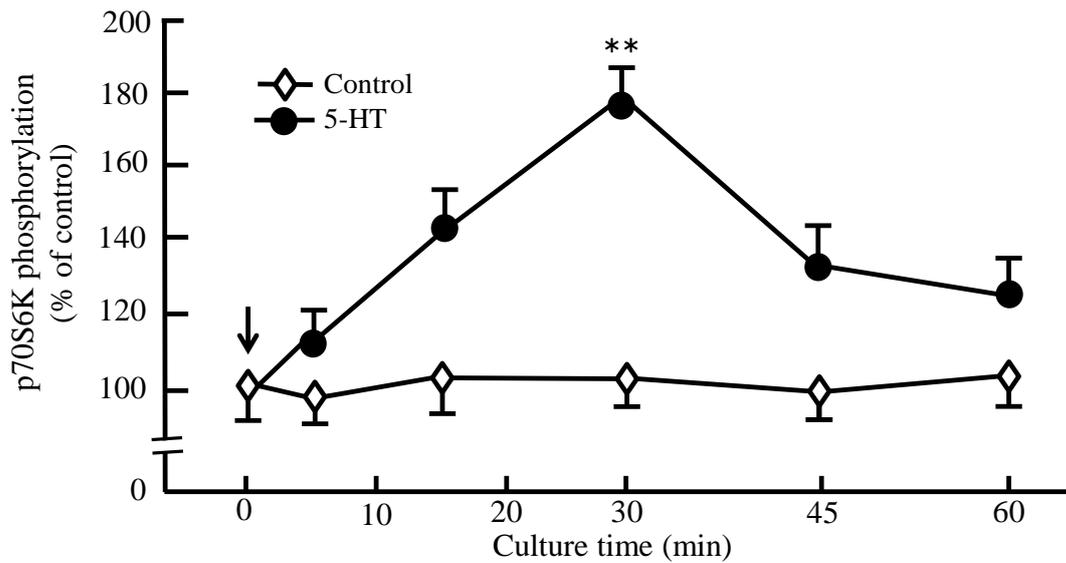
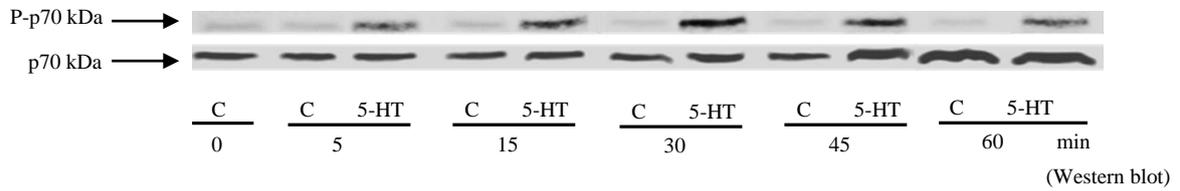


Fig. 17 肝実質細胞におけるセロトニンによる p70S6K リン酸化活性の経時的変化

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理：5-HT (10^{-6} M)

値：平均値±標準誤差 (n=3)

有意差：各々control に対するに対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

矢印：薬物添加

3-6. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンによる p70S6 キナーゼリン酸化促進作用 に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果

Fig. 17 の結果から 5-HT による p70S6K リン酸化活性は、添加後 30 分で最大となることが判明した。そこで培養時間を 30 分と固定し、肝実質細胞における 5-HT による p70S6K リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果を検討した。尚、本実験で用いたシグナル伝達因子阻害薬は、3-2. と同様である。

5-HT 誘発 p70S6K リン酸化活性は、LY272015 (10^{-7} M)、AG1478 (10^{-6} M)、LY294002 (3×10^{-7} M)、PD98059 (10^{-6} M)、ラパマイシン (10 ng/mL)、U-73122 (10^{-6} M)、BAPTA/AM (10^{-7} M)、ベラパミル (10^{-6} M) 及びソマトスタチン (10^{-7} M) によって、各々 control レベルまで抑制された。一方、ketanserin (10^{-6} M)、SB242084 (10^{-6} M)、U-73343 (10^{-6} M)、H-89 (10^{-6} M)、GF109203X (10^{-6} M) 並びに 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M) は、5-HT による p70S6K リン酸化活性には影響を与えなかった (Fig. 18)。

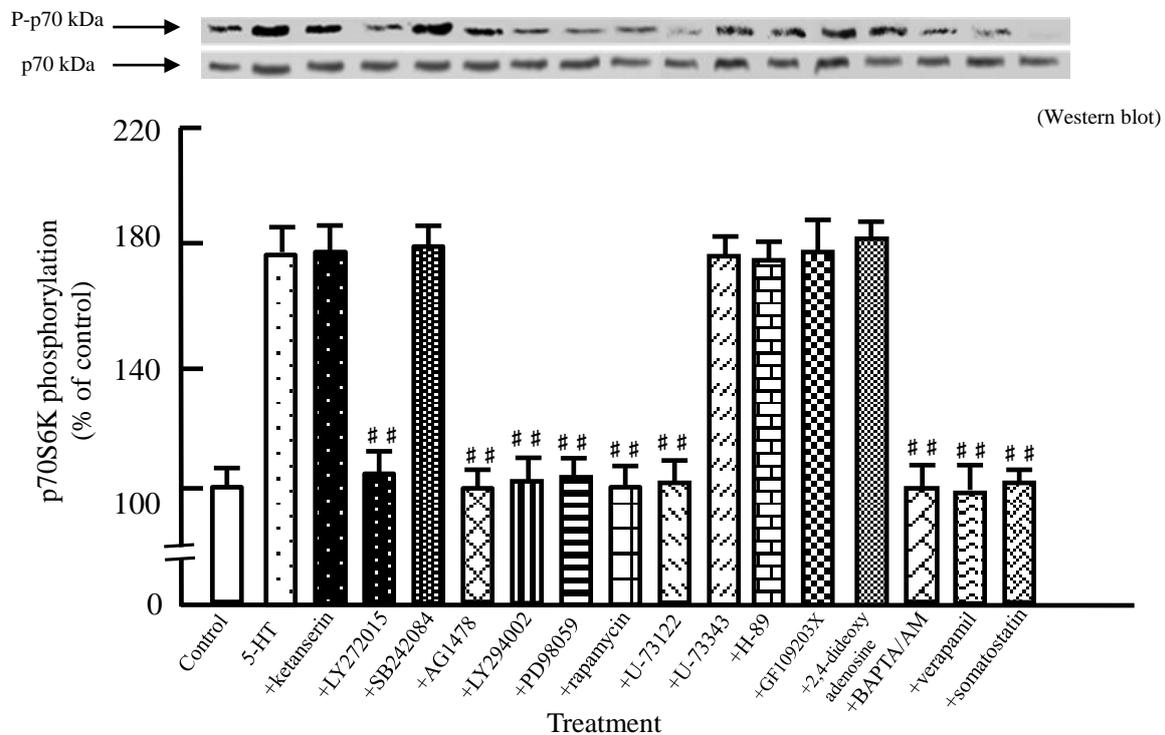


Fig. 18 肝実質細胞におけるセロトニンによる p70S6 キナーゼリン酸化活性に対するシグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間 : 30 分

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), ketanserin (10^{-6} M), LY272015 (10^{-7} M), SB242084 (10^{-6} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (3×10^{-7} M), PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml), U-73122 (10^{-6} M), U-73343 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M), 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M), verapamil (10^{-6} M), somatostatin (10^{-7} M)

値 : 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差 : 5-HT 単独添加群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

4. 考察

4-1. 肝実質細胞におけるセロトニンの EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼ、MAP キナーゼ及び p70S6 キナーゼリン酸化作用の基礎的検討

3-1.、3-3.、3-5. では、初代培養肝実質細胞における 5-HT による EGF/TGF- α -RTK、MAPK 及び p70S6K リン酸化活性の基礎的な検討を行った。

5-HT 誘発 EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性の経時的変化を検討したところ、5-HT 添加 10 分後でピークとなる一過性の上昇を示した。同様の実験系において、EGF や TGF- α を初代培養肝実質細胞に添加した場合、EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性は、添加後 3~5 分程度で一過性のピークとなる^{87,90}。即ち、5-HT は、EGF や TGF- α と比較して EGF/TGF- α -RTK のリン酸化が最大活性となるまでに数分のタイムラグが生じていることになる。また、5-HT 誘発 MAPK リン酸化活性は、5-HT 添加 30 分後でピークとなる一過性の上昇を示した。初代培養肝実質細胞に対して通常、増殖因子を添加した場合、5 分と短い時間で MAPK リン酸化活性が最大となる^{87,90}。即ち、肝実質細胞において、増殖因子の刺激により RTK が活性化してから MAPK を活性化させるまでに 5 分程度でシグナルの伝達が行われていることになる。EGF 等の増殖因子は直接受容体を刺激するため、RTK のリン酸化活性は、非常に素早く行われると考えられる。これに対し、5-HT による EGF/TGF- α -RTK 及び MAPK リン酸化活性にタイムラグが生じたことは 5-HT/5-HT_{2B} 受容体刺激は、間接的に EGF/TGF- α -RTK/MAPK 経路を刺激したと推測される。

また、5-HT による肝実質細胞の MAPK リン酸化活性は、ERK2 にのみ認められ、ERK1 では有意なリン酸化活性の上昇を確認されなかった。ERK1 と ERK2 はアミノ酸配列の相同性が約 85%と高いとされているが、その働きには若干の違いがあるとされている。ERK1 は、主にアポトース等による細胞の生存に関与しており、ERK2 は細胞増殖を調

節していると考えられており、部分肝切除動物においても ERK2 の活性化が認められている^{92, 93)}。

増殖因子等による肝実質細胞の増殖には、p70S6K の活性化が必要であると考えられているが、実際にその活性を検討した例は少ない。そこで、本研究では、p70S6K リン酸化活性にも着目し、5-HT による p70S6K のリン酸化活性促進作用を検討した。5-HT による肝実質細胞の p70S6K リン酸化活性の経時的変化を検討したところ、5-HT 添加 30 分後に一過性のピークを示した。5-HT を添加してから各タンパク質のリン酸化活性が最大となる時間を比較することで、リン酸化カスケードの順序関係を予想することができ、少なくとも、ERK2 や p70S6K の上流に EGF/TGF- α -RTK が存在すると推測された。

4-2. 肝実質細胞におけるセロトニン誘発 EGF/TGF- α 受容体チロシンキナーゼ、MAP キナーゼ及び p70S6 キナーゼリン酸化促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構

3-2.、3-4.、3-6. では、5-HT による EGF/TGF- α -RTK、ERK2 及び p70S6K リン酸化活性に対する選択的 5-HT₂ 受容体サブタイプ遮断薬及び特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果を検討した。

選択的 5-HT_{2B} 受容体遮断薬 (LY272015)、PLC 阻害薬 (U-73122)、細胞膜透過性 Ca²⁺ キレート剤 (BAPTA/AM)、L 型 Ca²⁺ チャンネル阻害薬 (ベラパミル)、分泌顆粒分泌阻害薬 (ソマトスタチン)、RTK 阻害薬 (AG1478) は、5-HT 誘発 EGF/TGF- α -RTK、ERK2 及び p70S6K リン酸化活性を control レベルまで抑制させた。即ち、5-HT による EGF/TGF- α -RTK、ERK2 及び p70S6K リン酸化活性には、5-HT_{2B} 受容体/PLC/Ca²⁺ 経路が深く関与しているということが明らかとなった。また、これらの阻害薬に加え、PI3K 阻害薬 (LY294002)、MEK 阻害薬 (PD98059) は、5-HT 誘発 ERK2 及び p70S6K リン酸化活性を抑制した。さらに、mTOR 阻害薬 (ラパマイシン) は、p70S6K リン酸化活性のみを抑制

した。これらの事から、5-HT は、EGF/TGF- α -RTK、ERK2、p70S6K の順にリン酸化活性を促進させたということが判明した。以上の結果より、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用のシグナル伝達経路には、少なくとも 5-HT_{2B} 受容体/PLC/Ca²⁺経路に加えて、EGF/TGF- α -RTK/ERK2/p70S6K 経路を介していることが明らかとなった。

5. 小括

第2章では、肝実質細胞における5-HTのEGF/TGF- α -RTK、MAPK及びp70S6Kリン酸化作用を生化学的に検討することで、5-HTによる肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達経路をより詳細に推測した。その結果、5-HTによるEGF/TGF- α -RTK、MAPK及びp70S6Kのリン酸化活性促進作用は、5-HT添加後それぞれ10分、20~30分、30分で一過性のピークを認めるリン酸化活性を示した。また、5-HTは、ERK1とERK2のアイソフォームを持つMAPKのうち、ERK2のリン酸化のみが促進させた。さらに、5-HTによって誘発されたEGF/TGF- α -RTK、MAPK及びp70S6Kのリン酸化活性の上流に、5-HT_{2B}受容体/PLC/Ca²⁺経路の存在が強く示唆された。加えて、ERK2のリン酸化活性には、EGF/TGF- α -RTK、PI3K、MEKが関与しており、ERK2の下流にはmTORやp70S6Kといったシグナル伝達因子が存在することも明らかになった。さらに、顆粒分泌を阻害するソマトスタチンにより5-HTによるEGF/TGF- α -RTK、MAPK及びp70S6Kのリン酸化活性が完全に抑制されたことから、5-HTの刺激によって何らかのオートクリン機構が働いている可能性が示唆された。

これらの結果から、Fig. 19に示すようなシグナル伝達機構が推測された。即ち、5-HTは、5-HT_{2B}受容体/PLC/Ca²⁺経路を活性化させることで、何らかのオートクリン因子の分泌を促進する。そして、分泌したオートクリン因子がEGF/TGF- α -RTK/ERK2/p70S6K経路を介し、細胞増殖を引き起こした。

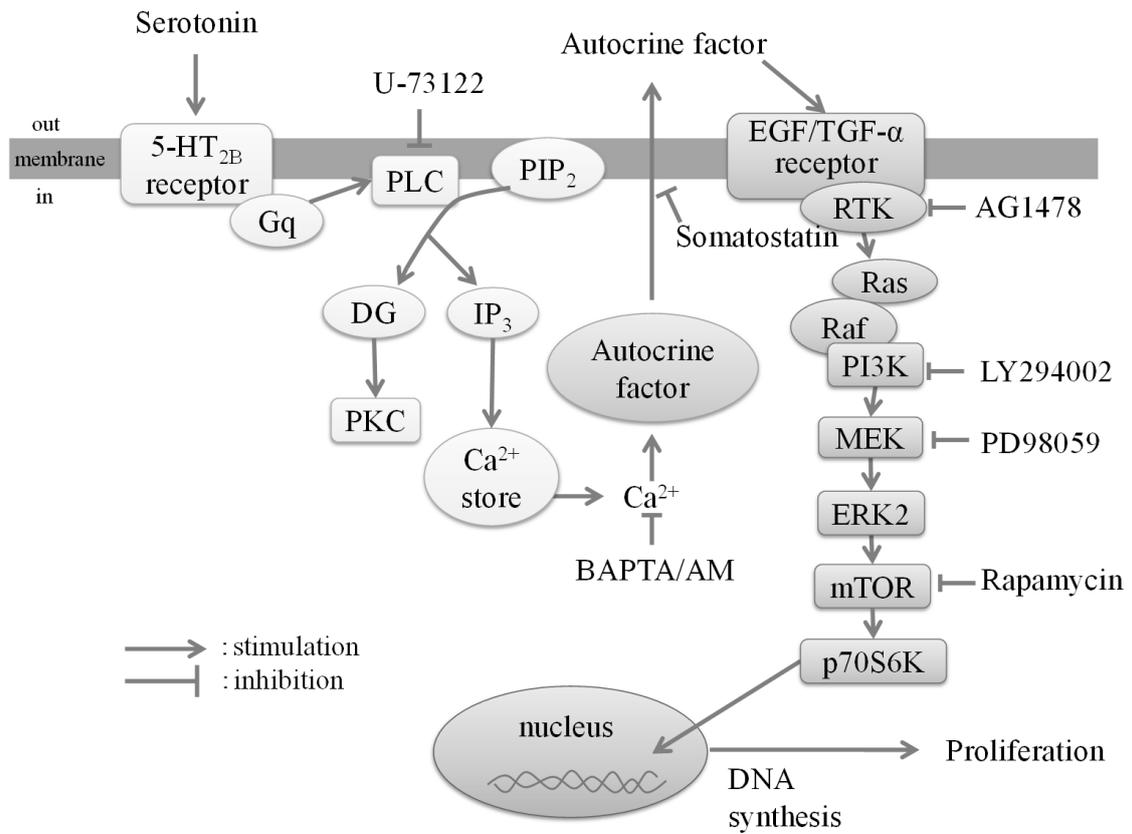


Fig. 19 セロトニンによる初代培養肝实质細胞増殖促進作用機構のモデル (2)

第 3 章 セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用におけるオートクリン因子分泌機構に関する検討

1. 諸言

第 1 章及び第 2 章の結果から、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT_{2B} 受容体/PLC/Ca²⁺経路と EGF/TGF- α RTK/ERK2/p70S6K 経路が関与することを明らかにした。さらに、分泌顆粒からの分泌を抑制するソマトスタチンと、その分泌の引き金となる細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制する BAPTA/AM によって、5-HT による EGF/TGF- α -RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化活性が阻害されたことから、5-HT_{2B} 受容体を介した 5-HT の刺激は肝実質細胞から何らかのオートクリン因子の分泌を介した作用が関与していると推測できる。

肝実質細胞が産生・貯蔵する増殖に関連したオートクリン因子の候補としては、TGF- α や IGF-I が挙げられる。実際に、初代培養肝実質細胞実験系において、TGF- α の分泌を促進する薬物がいくつか見出されている。TGF- α は、癌化した線維化細胞の培養液中で発見された物質である⁹⁴⁾。膜貫通型前駆体から切り出された TGF- α は 50 個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、EGF との相同性は約 40%である⁹⁵⁾。そして、TGF- α は、EGF 受容体に結合して刺激を細胞内へと伝え、MAPK 経路や PI3K 経路を活性化する。癌化した細胞の培養液中から発見された TGF- α ではあるが、正常細胞に対しても多くの生理作用を有する。TGF- α は、強力な細胞分裂促進因子であり、例えば、血管新生作用では EGF よりも強く作用するとされている⁹⁶⁾。その他にもマクロファージの活性化や細胞遊走にも関与する^{97, 98)}。

肝再生においても TGF- α は、EGF よりも強力な増殖因子として働く⁹⁹⁾。In vivo 肝再生モデル動物において、部分肝切除後では、切除後 4 時間と 18 時間において EGFR の

mRNA 量が、24 時間と 72 時間で TGF- α の mRNA 量が上昇する。また、TGF- α の遺伝子をノックダウンさせた場合、肝再生は不完全な状態で終了することからも TGF- α は直接的な肝細胞分裂促進因子であると考えられる。さらに、部分肝切除後の肝実質細胞を培養したところ TGF- α の分泌能が亢進する。また、近年では、プロスタグランジン E₂ や IL-1 β のようなサイトカインなどによっても肝実質細胞からの TGF- α の分泌が促進されるという報告がある^{79,80)}。

そこで、第 3 章では、5-HT による肝実質細胞からのオートクリン因子を決定し、その自己分泌の細胞内シグナル伝達経路を明らかとすることを目的とし、5-HT による肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子モノクローナル抗体の効果及び培養液中へのオートクリン因子の分泌並びにその分泌機構の解明を試みた。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験動物

第 1 章の「動物実験」の項目に準じた。

2-2. 肝実質細胞の単離と培養

第 1 章の「肝実質細胞の単離と培養」の項目に準じた。

2-3. 肝実質細胞の DNA 合成能の測定

第 1 章の「肝実質細胞の DNA 合成能の測定」の項目に準じた。

2-4. 肝実質細胞の核数計測

第 1 章の「核数計測」の項目に準じた。

2-5. 増殖因子に対する中和実験

培養液中の増殖因子に対する中和実験は、増殖因子に対するモノクローナル抗体(抗 IGF-I 抗体及び抗 TGF- α 抗体)を用いて行った。肝実質細胞を単離し、接着させた後、無血清 MEM に交換し、5-HT 及び各種増殖因子に対するモノクローナル抗体を添加し、培養した。一定時間培養後、2-3.、2-4. に準じて肝実質細胞の DNA 合成能及び核数を

測定した。

2-6. 培養液中の TGF- α 濃度の測定

肝実質細胞の培養液中の TGF- α 濃度は、TGF- α ELISA kit を用いて測定した。MEM には、ELISA の妨げになる成分が多く含まれているため、培地には PBS/Ca²⁺/glucose を用いた。2-2.の方法により、肝実質細胞を単離し、接着後、PBS (+) (1.0 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose and 0.1 μ g/ml aprotinin 含有) で 2 回洗浄し、交換した。この PBS (+) 中に 5-HT や選択的 5-HT_{2B} 受容体遮断薬、特異的シグナル伝達因子阻害薬などを添加した。一定時間培養後、培地を 50 μ l 回収し、ELISA のサンプルとした。特異的 TGF- α ポリクローナル抗体が接着しているマイクロプレートへ回収したサンプルを加え、さらにビオチン標識された TGF- α 抗体を加え、室温で 3 時間静置した。その後、ウェルを洗浄し、ストレプトアビシン結合ホースラディッシュペルオキシダーゼを加え、室温で 30 分間静置した。次にペルオキシダーゼの基質となる *o*-フェニレンジアミンを加え、室温で 30 分間静置した。*o*-フェニレンジアミンは、ホースラディッシュペルオキシダーゼにより、酸化が触媒され、2,3-ジアミノフェナジンを生成する。この 2,3-ジアミノフェナジンは 490 nm 付近に吸収極大を持つ。そこで、測定波長 490 nm での吸光度を測定し、TGF- α を定量した。

2-7. 肝実質細胞内 TGF- α の蛍光免疫染色

蛍光免疫細胞染色により肝実質細胞内の TGF- α を検出した。肝実質細胞を単離し、コラーゲンコートされたカバーガラス上に接着させた後、無血清 MEM に交換し、5-HT などを添加し、培養した。一定時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン液中に 15 分間静置し、細胞を固定した。その後、0.1% Triton X-100 含有 PBS により、

浸透化処理を行った後、3% bovine serum albumin (BSA) 含有 PBS を用い、ブロッッキングを行った。次に、抗 TGF- α マウスモノクローナル抗体 (一次抗体) を肝実質細胞内の TGF- α と反応させ、蛍光標識された抗マウス抗体 (二次抗体) を反応させることで、TGF- α を標識した。また、肝実質細胞の核をヨウ化プロピジウムにより二重蛍光標識した。蛍光顕微鏡 (Leica, DMI8) により、二次抗体の蛍光を検出した。尚、蛍光強度は、一視野中の輝度を一視野中の細胞数で標準化した。

2-8. 実験材料

第 2 章の「実験材料」の項目に準じた。

2-9. データの統計処理

第 1 章の「データの統計処理」の項目に準じた。

3. 実験結果

3-1. セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子抗体の効果に関する検討

5-HT による肝実質細胞増殖促進作用は、5-HT_{2B} 受容体/PLC/Ca²⁺を介したオートクリン因子分泌機構が働いていると示唆された。一方、肝実質細胞が貯蔵する増殖に関連したオートクリン因子としては、TGF- α や IGF-I が知られている。そこで、本実験では、抗 TGF- α モノクローナル抗体 (mAb TGF- α) 及び抗 IGF-I モノクローナル抗体 (mAb IGF-I) を用いて、これらの抗体による 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用への影響を検討した。Fig. 20A には DNA 合成能、Fig. 20B には核数計測の結果を示した。

無血清 MEM に交換後、mAb TGF- α (0.1-100 ng/ml) または mAb IGF-I (0.1-100 ng/ml) を添加し、5-HT (10⁻⁶ M) により肝実質細胞を刺激し、4 時間培養した。その結果、5-HT (10⁻⁶ M) によって誘発された DNA 合成能と肝実質細胞増殖促進作用は、mAb TGF- α により用量依存的に阻害され、mAb TGF- α による 5-HT 誘発肝実質細胞増殖促進作用に対する IC₅₀ は、それぞれ、29 ng/ml (DNA 合成能) 及び 25 ng/ml (細胞増殖促進作用)であった (Fig. 20)。一方、mAb IGF-I は、0.1-100 ng/ml の範囲において、5-HT (10⁻⁶ M) による肝実質細胞の DNA 合成能および細胞増殖促進作用に対して有意な影響を及ぼさなかった。したがって、5-HT の 5-HT_{2B} 受容体を介する肝実質細胞増殖促進作用は、TGF- α の肝実質細胞からのオートクリン分泌を促進させ、その結果、培養液中に分泌された TGF- α が肝実質細胞の増殖を促進したと考えられた。

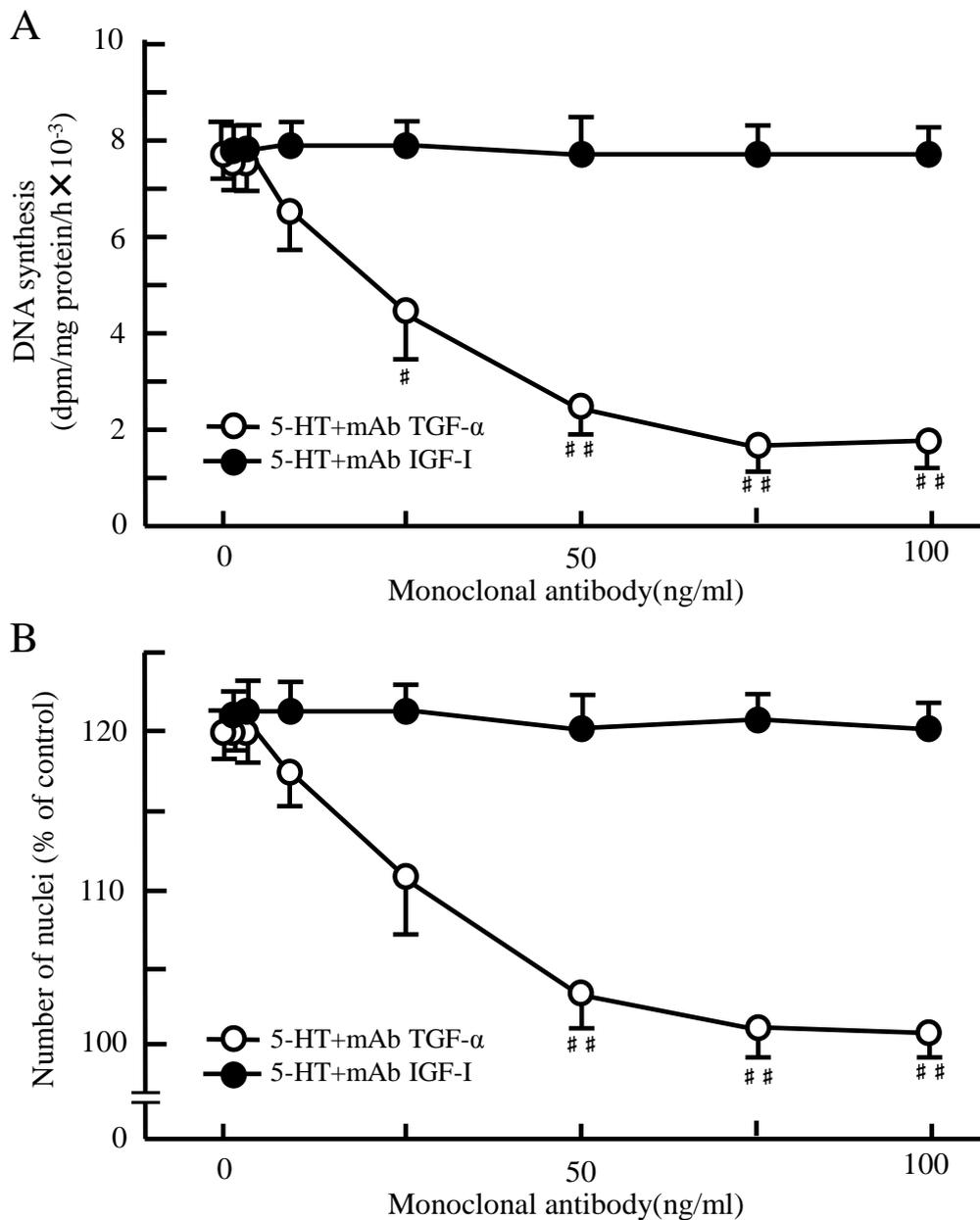


Fig. 20 セロトニンの肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子抗体の効果に関する検討

A : DNA 合成能

B : 核数 (細胞増殖)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間 : 4 時間

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), mAb TGF- α (0.1-100 ng/ml), mAb IGF-I (0.1-100 ng/ml)

値 : 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差 : 5-HT 単独添加群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-2. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの TGF- α 分泌促進作用に関する検討

Fig. 20 の結果から、5-HT (10^{-6} M) による肝実質細胞促進作用は、TGF- α の分泌を介している可能性が示唆された。そこで、本実験では培養液中の TGF- α の濃度を ELISA 法により定量した。

3-2-1. セロトニンの肝実質細胞における TGF- α 分泌促進作用の経時的変化

Fig. 21 には、5-HT (10^{-6} M) 添加後、0-30 分培養したときの培養液中へ分泌される TGF- α 濃度の経時的変化を示した。5-HT 添加 (刺激) 5 分後には、TGF- α 濃度の有意な増加がみられ、10 分後には TGF- α 濃度が約 30 pg/ml と最大となった。また、この 5-HT による TGF- α 分泌促進作用は、LY272015 (10^{-6} M) によって control レベルまで完全に抑制された。

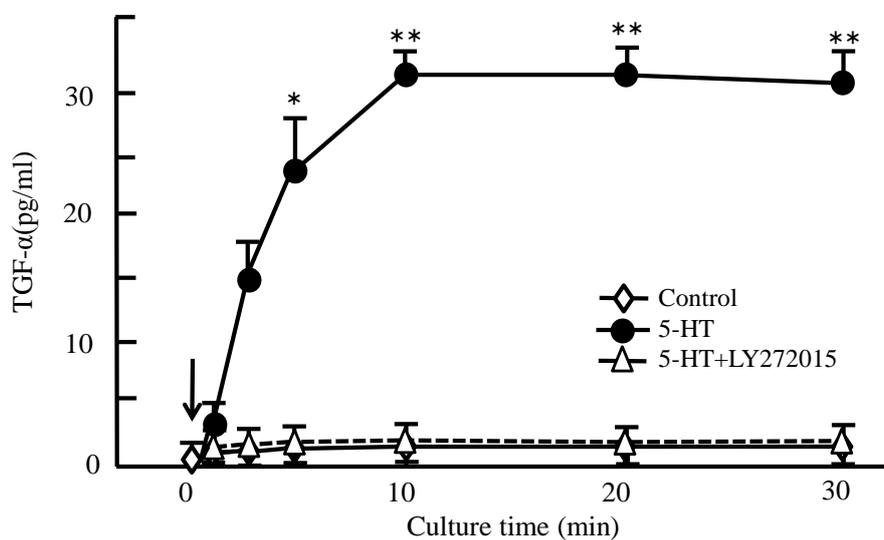


Fig. 21 セロトニンの肝実質細胞における TGF- α 分泌促進作用の経時的変化

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理：5-HT (10^{-6} M), LY272015 (10^{-6} M)

値：平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差：各々control に対する有意差(*P<0.05, **P<0.01)

矢印：薬物添加

3-2-2. セロトニンの肝実質細胞における TGF- α 分泌促進作用の用量-反応関係

Fig. 22 には、種々濃度 (10^{-10} - 10^{-5} M) の 5-HT を添加し、その後 10 分間培養した時の培養液中への TGF- α の分泌量を示した。TGF- α の分泌量 (培養液中の濃度) は、5-HT の用量に依存して増加し、5-HT が 10^{-6} M の時に最大反応に達した。この時の培養液中の TGF- α 濃度は、約 30 pg/ml であり、5-HT による肝実質細胞に対する TGF- α 分泌促進作用の EC₅₀ は 7.2×10^{-8} M であった。また、5-HT による TGF- α 分泌促進作用は、U-73122 (10^{-6} M) とソマトスタチン (10^{-7} M) によってそれぞれ完全に抑制された。

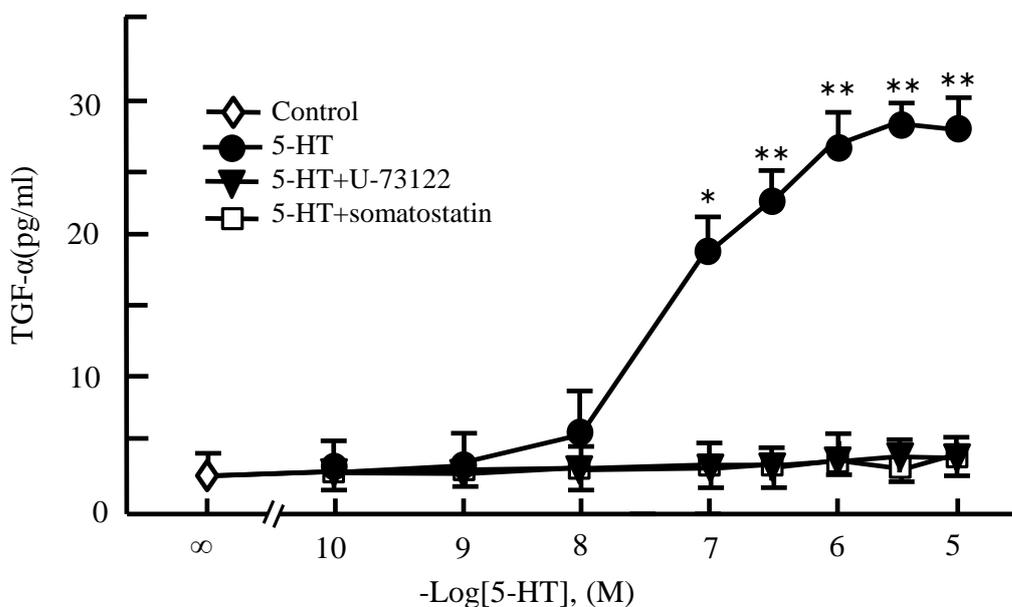


Fig. 22 セロトニンの肝実質細胞における TGF- α 分泌促進作用の用量-反応関係

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間 : 10 分

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), U-73122 (10^{-6} M), somatostatin (10^{-7} M)

値 : 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差 : Control に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-3. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンの TGF- α 分泌促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構の検討

Fig. 23 には、5-HT と特異的シグナル伝達因子阻害薬を併用した時の培養液中への TGF- α 分泌量を示した。5-HT (10^{-6} M) による TGF- α 分泌促進作用は、選択的 5-HT_{2B} 受容体阻害薬である LY272015 (10^{-7} M) により完全に抑制された。また、PLC 阻害薬である U-73122 (10^{-6} M)、細胞膜透過性 Ca²⁺キレート剤である BAPTA/AM (10^{-7} M)、L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬であるベラパミル (10^{-6} M) 及び分泌顆粒分泌阻害薬であるソマトスタチン (10^{-7} M) によって、それぞれ 5-HT による TGF- α 分泌促進作用を、control レベルにまで抑制させた。一方、AC 阻害薬である 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M)、PKA 阻害薬である H-89 (10^{-6} M)、PKC 阻害薬である GF109203X (10^{-6} M)、RTK 阻害薬である AG1478 (10^{-6} M)、PI3K 阻害薬である LY294002 (3×10^{-7} M)、MEK 阻害薬である PD98059 (10^{-6} M) 並びに mTOR 阻害薬であるラパマイシン (10 ng/ml) は、それぞれ全て 5-HT による TGF- α 分泌促進作用に対して影響を与えなかった。

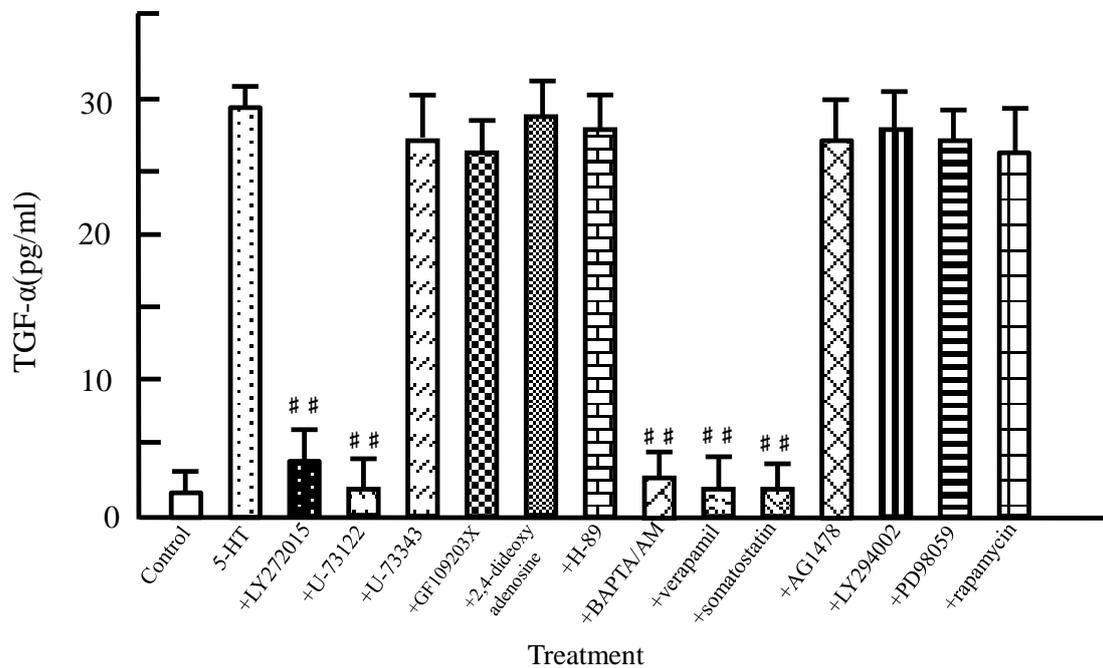


Fig. 23 肝実質細胞におけるセロトニンの TGF- α 分泌促進作用に関するシグナル伝達機構の検討

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間 : 10 分

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M), LY272015 (10^{-7} M), U-73122 (10^{-6} M), U-73343 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M), 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M), verapamil (10^{-6} M), somatostatin (10^{-7} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (3×10^{-7} M), PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml),

値 : 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差 : 5-HT 単独添加群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-4. 肝実質細胞内 TGF- α に対するセロトニンによる自己分泌の検討

これまでの結果から、5-HT は、5-HT_{2B} 受容体/PLC/Ca²⁺経路を介して、肝実質細胞から TGF- α の分泌を促進させることを明らかにした。そこで、これらの結果をさらに確認するために肝実質細胞内の TGF- α を蛍光標識することで、5-HT 刺激によって実際に細胞外へ分泌されるのかを確認した。その結果を Fig. 24 に示した。Fig. 24 に示した顕微鏡像では、TGF- α を緑色で指標し、核を赤色で表している。5-HT による刺激がない場合、ほぼ全ての細胞で TGF- α の細胞内における存在が確認できた (0min; Fig. 24A)。5-HT (10⁻⁶ M) 刺激後は、刺激時間に依存して、肝実質細胞内の TGF- α の減少が認められ、刺激 10 分後以降では、多くの細胞で TGF- α の枯渇を確認した (10min, 20 min; Fig. 24C, D)。

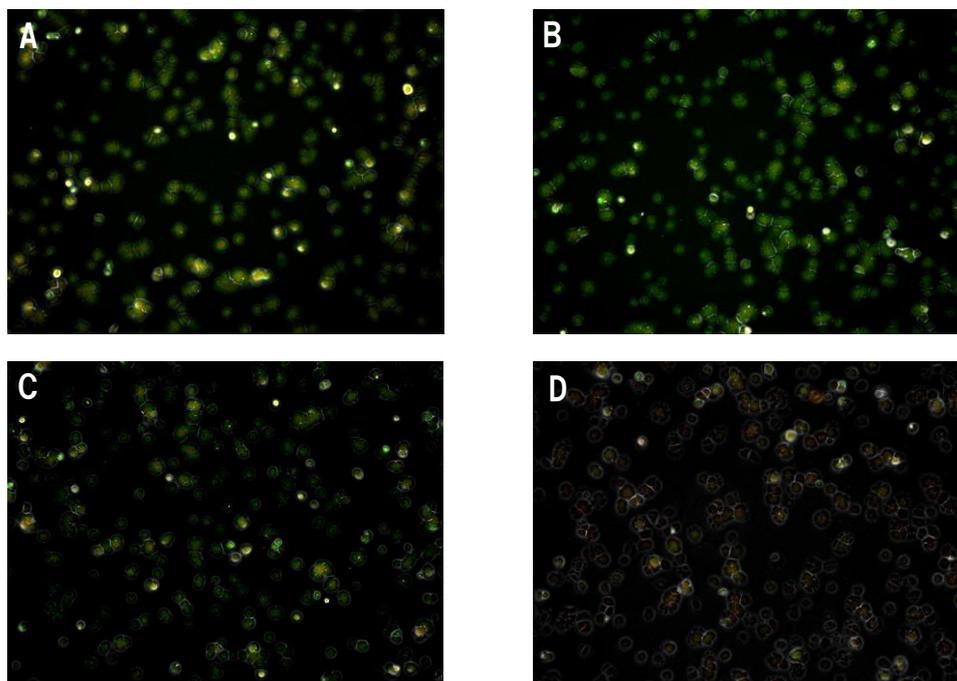


Fig. 24 肝実質細胞内 TGF- α に対するセロトニンによる自己分泌の検討

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養時間 : A, 0 分, B, 3 分, C, 10 分, D, 20 分

薬物処理 : 5-HT (10⁻⁶ M)

倍率 : 100 倍

3-5. 肝実質細胞内 TGF- α に対するセロトニンによる分泌作用の経時的変化

蛍光免疫染色により得られた蛍光強度を基に、肝実質細胞内に存在する TGF- α 含量の経時的変化を検討した。その結果を Fig. 25 に示した。5-HT 添加 1 分後には、細胞内の蛍光強度の減少が確認され、添加 10 分後には有意な減少がみられた。その後、5-HT (10^{-6} M) 添加 30 分後まで蛍光強度の減少が認められた (Fig. 25)。

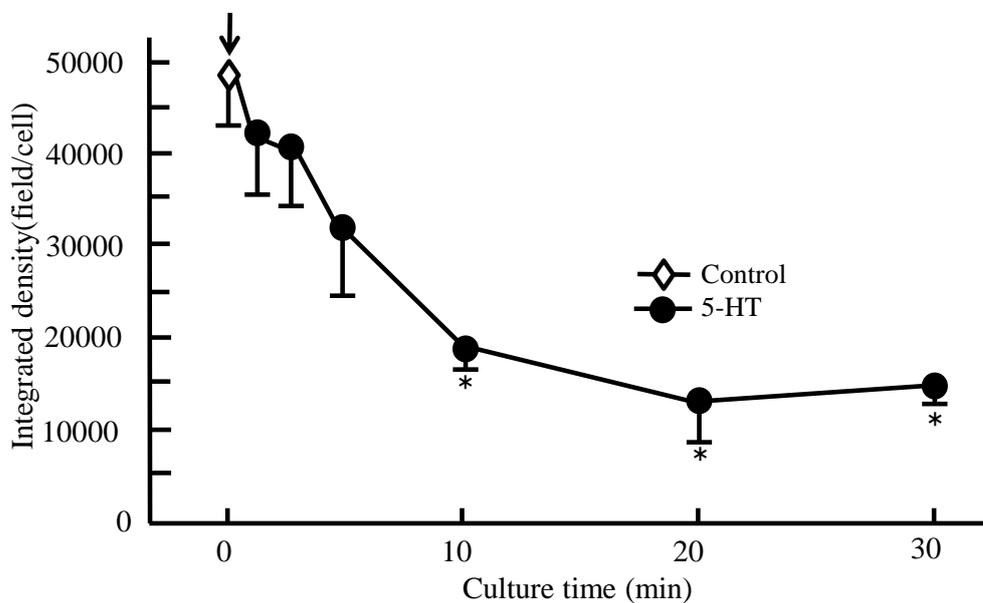


Fig. 25 肝実質細胞内 TGF- α に対するセロトニンによる分泌作用の経時的変化

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理 : 5-HT (10^{-6} M)

値 : 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

有意差 : 各々 control に対する有意差(*P<0.05, **P<0.01)

矢印 : 薬物添加

4. 考察

4-1. 初代培養肝実質細胞におけるセロトニンのオートクリン因子分泌促進作用に関する検討

5-HT による肝実質細胞増殖促進作用が何らかの増殖因子の自己分泌を誘発したことによるものであるという仮説の基に、肝実質細胞が既に保有しているオートクリン因子としての候補を TGF- α と IGF-I とし、抗 TGF- α モノクローナル抗体及び抗 IGF-I モノクローナル抗体の効果を検討した。

Fig. 20 の結果より、5-HT (10^{-6} M) による肝実質細胞の DNA 合成促進作用及び細胞増殖促進作用は、mAb TGF- α の用量に依存して阻害されたが、mAb IGF-I では 0.1-100 ng/ml の範囲において 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用に対して影響を与えなかった。これらのことから、5-HT が肝実質細胞に対して TGF- α の分泌を促進されたことが示唆された。5-HT_{2B} 受容体の活性化は、PLC を介して細胞内の diacylglycerol (DG) と inositol triphosphate (IP₃) 量を増加させる。そして、これらの下流において PKC の活性化や細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が引き起こる。細胞からのエキソサイトーシス機構には、カルシウム依存性エキソサイトーシスがあり、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇は、膵臓の β 細胞からのインスリン分泌や神経細胞での神経伝達物質の分泌、メラノサイトからのメラニンの分泌などに関わる^{100, 101)}。そのため、肝実質細胞からの TGF- α の自己分泌は、5-HT による 5-HT_{2B} 受容体の活性化を介した細胞内 Ca²⁺の上昇が深く関与していると考えられた。

次に 5-HT の肝実質細胞に対する TGF- α 分泌促進作用の経時的変化及び用量-反応関係を検討した。その結果、5-HT 添加後 10 分で培養液中への TGF- α 分泌量は最大(約 30 pg/ml)となり、この最大反応は、 10^{-6} M の 5-HT で認められた。これは、EGF/TGF- α -RTK リン酸化活性が 10 分で最大活性を得たことや細胞増殖促進作用が 10^{-6} M の 5-HT で最

大となったことと相関しているといえる。さらに、蛍光標識された TGF- α は、5-HT の刺激により肝実質細胞内から放出されたことが蛍光顕微鏡による観察からも確認され、ELISA 法による培養液中の TGF- α の上昇と共に蛍光標識 TGF- α の蛍光強度の減少が認められた。また、5-HT による肝実質細胞からの TGF- α の分泌は、選択的 5-HT_{2B} 受容体遮断薬や PLC 阻害薬などで control レベルまで抑制されたことも 5-HT により TGF- α の自己分泌が惹起された事を裏付けた。TGF- α の培養液中の濃度は、約 30 pg/ml と微量であった。通常、培養肝実質細胞において外から加える TGF- α による DNA 合成促進作用や細胞増殖促進作用は 5-20 ng/ml 程度と確認される。自己分泌であることから、5-HT の刺激によって分泌された TGF- α は肝実質細胞近傍において高濃度で存在することが予想される。実際、肝切除を行った患者では肝組織中の TGF- α 発現量は、上昇するが、血清中 TGF- α 濃度の上昇は、ほとんど認められない¹⁰²⁾。

4-2. セロトニンの肝実質細胞に対する TGF- α 分泌促進作用のシグナル伝達機構の検討

5-HT による肝実質細胞の TGF- α 分泌促進作用機構を明らかにするために特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いて、TGF- α 分泌能に対する効果を検討した。

Fig.21 に示した通り、5-HT による肝実質細胞に対する TGF- α 分泌促進作用は、5-HT_{2B} 受容体遮断薬と PLC 阻害薬のほか、BAPTA/AM(細胞内 Ca²⁺キレート剤)、ベラパミル(L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬) 及びソマトスタチン (分泌顆粒分泌阻害薬) によっても完全に抑制された。即ち、肝実質細胞に貯蔵されていた TGF- α は、5-HT の 5-HT_{2B} 受容体刺激により上昇した細胞内 Ca²⁺を引き金として、分泌されたといえる。これまでに、ある種のアミノ酸やサイトカインが肝実質細胞からの TGF- α の分泌を促進することにより、肝細胞増殖を促進するという報告がいくつかある^{83, 103)}。本実験で得た結果もこれらのアミノ酸やサイトカインと同様の結果を示した。

5. 小括

第3章では、肝実質細胞における5-HTのTGF- α 分泌促進作用機構を検討した。その結果をまとめると下記のようなになる。また、5-HTによるTGF- α 分泌促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構もFig. 26に示した。

- ①肝実質細胞に対して5-HTを添加するとTGF- α の分泌が始まり、その分泌活性は、10分で最大となる。そして、この時の培養液中のTGF- α 濃度は、約30 pg/mlである。
- ②5-HTのTGF- α 分泌促進作用は、用量依存的であり、 10^{-6} Mで最大反応を得た。尚、 10^{-6} M 5-HTはDNA合成促進作用及び細胞増殖促進作用においても最大反応を示した濃度である。
- ③5-HTによるTGF- α 分泌促進作用は、5-HT_{2B}受容体/PLC/Ca²⁺経路が関与しており、細胞内Ca²⁺濃度の上昇による小胞からのTGF- α の分泌に起因する。

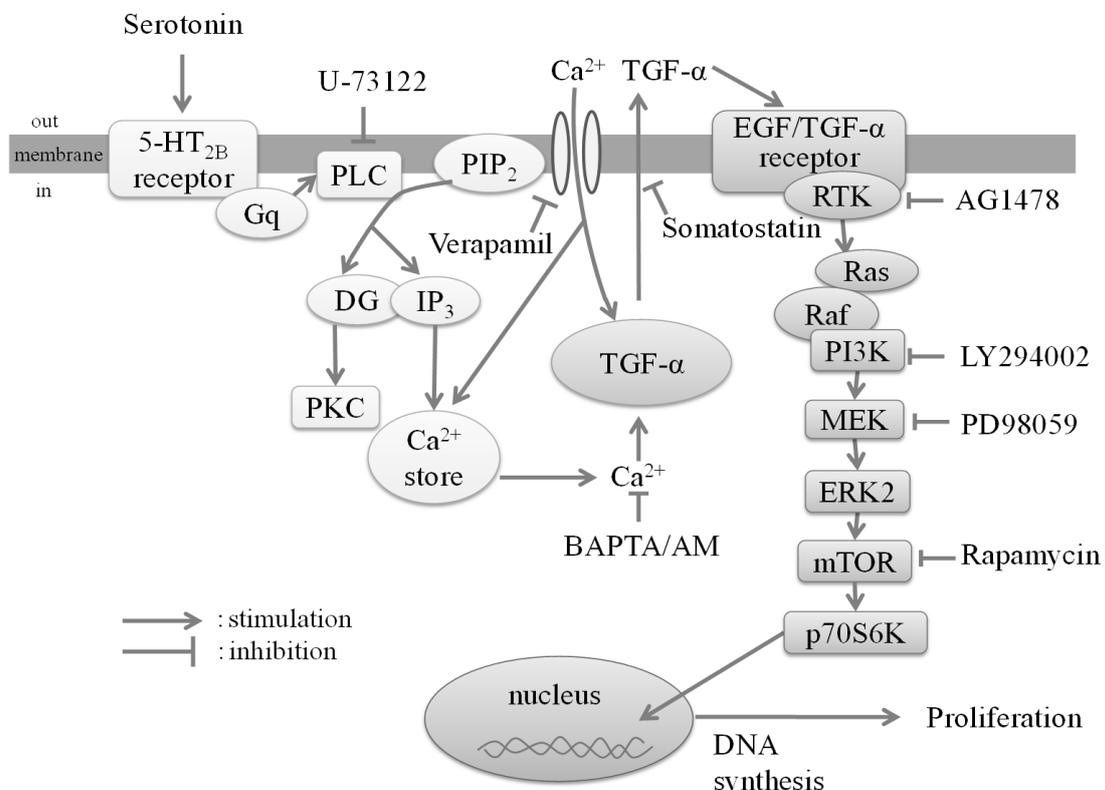


Fig. 26 セロトニンによる初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構のモデル (3)

第3編 結論

本研究において、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用を詳細に検討し、さらに細胞増殖促進作用機構を解明することを目的としてきた。これまでの結果を総合的に解釈し、5-HT の肝実質細胞増殖促進作用機構を考察すると Fig. 27 のようなシグナル伝達機構の模式図を新たに見出した。まず、5-HT が肝実質細胞の細胞膜上に存在する 5-HT_{2B} 受容体に結合することで、肝実質細胞に対する細胞増殖シグナルが開始される。Gq タンパク質と共役している 5-HT_{2B} 受容体は、5-HT の刺激により、PLC を活性化する。活性化した PLC は、PIP₂ から DG と IP₃ を細胞内に産生する。IP₃ は、細胞内の Ca²⁺濃度を上昇させると考えられる。この細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を引き金として、肝実質細胞自身の細胞内に貯蔵されていた TGF- α が自己分泌する。細胞外へと分泌された TGF- α は、EGF/TGF- α 受容体に結合し、EGF/TGF- α -RTK を活性化する。活性化した EGF/TGF- α -RTK は、シグナルを Ras→Raf→PI3K→ERK2→mTOR→p70S6K と伝達して、細胞増殖を引き起こす。

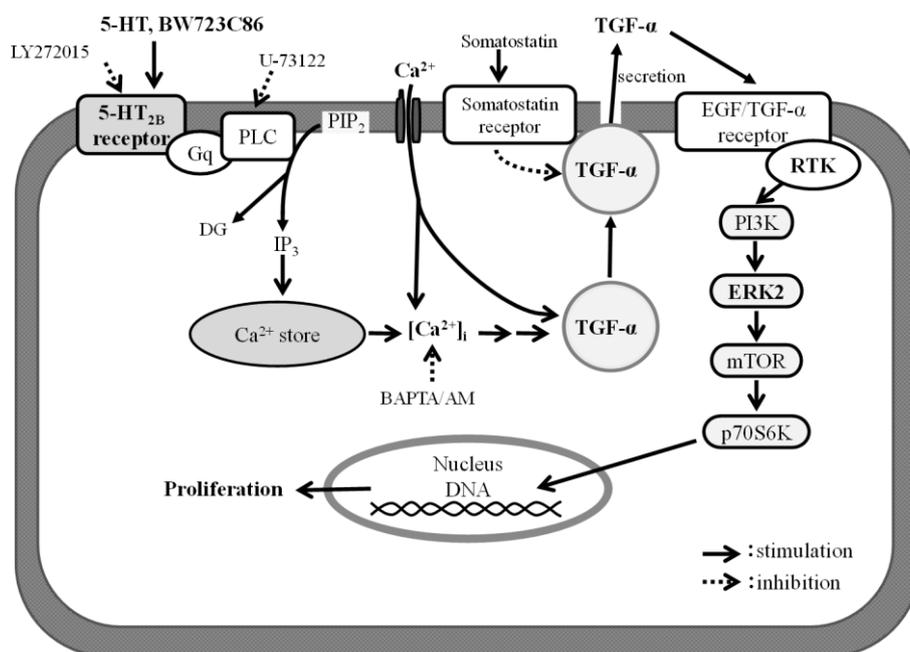


Fig. 27 セロトニンのラット初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構モデル

5-HT は、古くから研究されてきた生理活性物質の 1 つであり、生体内における役割は多岐にわたる。例えば、腸管運動の調節、血小板凝集、血管の拡張と収縮や精神機能などに関与することがよく知られており、うつ病や偏頭痛といった疾患との関連性が強い。そのため、5-HT やその受容体、トランスポーターは医薬品開発のターゲットとなり、これまでに多くの医薬品が市場で流通するようになった。近年では、5-HT による細胞増殖促進作用が様々な細胞で報告されている。そのような報告のなかでも、特に平滑筋細胞や神経細胞、そして肝実質細胞に対する 5-HT による細胞増殖促進作用が数多く研究報告されている。*In vivo* 実験系における肝再生モデルでの 5-HT による肝再生促進作用及びその重要性が報告される一方で、どの受容体サブタイプが肝実質細胞の増殖に関与し、どういった細胞内シグナル伝達経路を介しているのかということは、これまで明らかにされていなかった。本研究では、肝実質細胞に対する 5-HT の細胞増殖促進作用に着目し、その詳細な増殖シグナル機構を検討した。その結果、5-HT が 5-HT_{2B} 受容体と結合し、その下流のシグナル伝達因子によって、オートクリン因子でありかつ増殖因子である TGF- α の自己分泌を促進するという新たな知見を得た。5-HT によって自己分泌が促進された TGF- α は、肝実質細胞内に貯蔵されていることや 5-HT 以外の増殖促進因子 (プロスタグランジン I₂、TNF- α 、IL-1 β 等) によっても自己分泌が促進されることから肝再生を完遂するために非常に重要な増殖因子であると考えられている。肝再生のメカニズムを解明し、新たな「肝再生促進薬」の研究・開発を進めるという意味でも、本研究により、一定の成果を得ることが出来た。

しかし、肝疾患別にみると 5-HT は万能な「肝再生促進薬」ではないように思える。Lesurtel らは 5-HT の肝臓に対する作用は”double-edged sword”だと記している¹⁰⁴⁾。つまり、ある肝疾患に対しては改善を促進させるが、別の肝疾患では増悪させる可能性があるということである。これまで述べてきた通り、肝切除による肝再生では、5-HT は肝再生を促進させることが期待されている。他にも虚血/再灌流障害や過小グラフト症候群、アセトアミノフェンによる肝障害などにおいても 5-HT により改善が期待されている^{105, 106)}。非アルコール性

脂肪性肝炎、ウイルス性肝炎では 5-HT により肝疾患が悪化するかもしれない。また、肝細胞癌患者のおよそ 30%で 5-HT_{2B} 受容体の過剰発現がみられ、肝細胞癌の増殖と関連している。Soll らによると肝細胞癌において、5-HT は 5-HT_{2B} 受容体を介して、オートファジーを抑制することで、癌細胞の生存に繋がっているとしている¹⁰⁷⁾。これまでの報告から 5-HT は、肝疾患に対して様々な影響を与えていることが明らかとなってきた。そのために、1 つ 1 つの疾患に対し、5-HT の作用を理解し、「適材適所」での利用が求められる。本研究の成果がそれらの一端として役立つことを期待したい。

最後に、本研究で得られた知見の臨床的意義を考察する。現在、肝疾患における終末像である肝硬変及び肝癌に対して肝移植が適応となっている。特に、術式の改良や肝臓自身の再生能力が高いこともあり、生体肝移植が行われる件数が近年増加している。しかし、移植が必要な患者全てに肝移植を行うことは容易ではない。そこで「肝再生促進薬」の役割として考えられることとして、1 つはドナー及びレシピエント双方の術後の回復を早期に進めていくために使用されるケースである。5-HT の利用に関していえば、血小板中の 5-HT 濃度の違いにより、肝再生の能力に差があるという臨床的な報告がある。そこで、効率良く 5-HT を血小板へ取り込ませて、血小板中 5-HT 濃度を制御することで、肝再生を促進することが出来る可能性がある。これは、血小板という患者自身の細胞を利用した新規のドラッグデリバリーシステム (drug delivery system) と言える。また、5-HT_{2B} 受容体を選択的に刺激する薬物を肝臓特異的 (特に肝実質細胞) に送達するといったシステムが実現することで、より効率的に肝再生を進めることが可能となるであろう。さらに、移植までの繋ぎの医療として、ハイブリット型人工肝臓の利用が考えられている。ここでも「肝再生促進薬」が力を発揮することが出来る。人工肝臓では、大量のヒトの肝実質細胞が必要となるが、その細胞数が少ないという問題点がある。そこで、人工的に細胞増殖を促すために、肝実質細胞増殖促進作用を有す薬物を用いる。この問題点の解決においても、本研究で得られた 5-HT の肝実質細胞増殖促進作用やその増殖シグナル伝達機構の結果が貢献すると思われる。また、今後、5-

HTによる細胞増殖促進作用機構がより詳細に解明されることで、癌化の仕組み及び癌治療薬の開発、肝再生をはじめとした組織修復への利用といった研究も発展し、臨床応用へと進むことが期待できる。

謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科臨床薬理学講座教授 荻原 政彦 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に際して、終始御指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座教授 夏目 秀視 先生、城西大学大学院薬学研究科医薬品安全性学講座教授 金本 郁男 先生、城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎 真理 先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御見守り頂き、御指導並びに有益な御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科臨床薬理学講座准教授 木村 光利 先生及び城西大学薬学部臨床薬理学研究室助教 茂木 肇 先生に深く感謝の意を表します。

本論文の作成、学位論文審査にあたり、御教示と御校閲を頂きました城西大学大学院薬学研究科生理学講座教授 加園 恵三 先生、城西大学大学院薬学研究科臨床栄養学講座教授 小林 順 先生、城西大学大学院薬学研究科生化学講座教授 畑中 朋美 先生に心より感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を頂きました城西大学大学院薬学研究科臨床薬理学講座 栗原 一樹 氏並びに城西大学薬学部臨床薬理学研究室諸氏に心より感謝致します。

最後に、本研究のために尊い命をいただきました動物たちに深く感謝し、追悼の意を表します。

参考文献

- 1) 中村 敏一、初代培養肝細胞実験法 (1989)、p. 1、学会出版センター
- 2) Katz, S. C., Pillarisetty, V. G., Bleier, J. I., Shah, A. B., DeMatteo, R. P., 2004. Liver sinusoidal endothelial cells are insufficient to activate T cells. *J. Immunol.*, **173**, 230–235.
- 3) Hu, S., Yin, S., Jiang, X., Huang, D., Shen, G., 2009. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, **616**, 287–292.
- 4) Oben, J. A., Yang, S., Lin, H., Ono, M., Diehl, A. M., 2003. Acetylcholine promotes the proliferation and collagen gene expression of myofibroblastic hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 172–177.
- 5) Fausto, N., Campbell, J. S., Riehle, K. J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology*, **43**, 45–53.
- 6) 日本肝移植研究会、2016. 肝移植症例登録報告、移植、**51**, 145-159.
- 7) 日本移植研究会、ドナー調査委員会、2005. 生体肝移植ドナーに関する調査報告書<概要版>
- 8) Michalopoulos, G. K., DeFrances, M., 1997. Liver regeneration. *Science*, **276**, 60–66.
- 9) Higgins, G. M., Anderson, R. M., 1931. Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.*, **12**, 186–202.
- 10) Zheng, Z. Y., Weng, S. Y., Yu, Y., 2009. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J. Gastroenterol.*, **15**, 5776–5783.
- 11) Böhm, F., Köhler, U. A., Speicher, T., Werner, S., 2010. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol. Med.*, **2**, 294–305.
- 12) Moolten, F. L., Bucher, N. L., 1967. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science*, **158**, 272–274.

- 13) Backes, A. N., Tannuri, A. C. A., Backes, F. N., Queiroz, A. J. R., Coelho, M. C. M., Silva, E. L., Mello, E. S., Tannuri, U., 2014. Effects of tacrolimus and insulin in a liver regeneration model in growing animals with portal vein stenosis: immunohistochemical and molecular studies. *Pediatr. Surg. Int.*, **30**, 423–429.
- 14) Malik, R., Mellor, N., Selden, C., Hodgson, H., 2003. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology*, **37**, 79–86.
- 15) Alisi, A., Demori, I., Spagnuolo, S., Pierantozzi, E., Fugassa E., Leoni, S., 2005. Thyroid status affects rat liver regeneration after partial hepatectomy by regulating cell cycle and apoptosis proteins. *Cell. Physiol. Biochem.*, **15**, 69–76.
- 16) Alvarado, T. F., Puliga, E., Preziosi, M., Poddar, M., Singh, S., Columbano, A., Nejak-Bowen, K., Monga, S. P. S., 2016. Thyroid hormone receptor β agonist induces β -catenin-dependent hepatocyte proliferation in mice: implications in hepatic regeneration. *Gene. Expr.*, **17**, 19–34.
- 17) Michalopoulos, G. K., 2007. Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.*, **213**, 286–300.
- 18) Braun, L., Mead, J. E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G. I., Fausto, N., 1988. Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 1539–1543.
- 19) Yasuda, H., Mine, T., Shibata, H., Eto, Y., Hasegawa, Y., Takeuchi, T., Asano, S., Kojima, I., 1993. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. *J. Clin. Invest.*, **92**, 1491–1496.
- 20) Seglen, P. D., 1975. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.*, **13**, 29–83.
- 21) Kimura, M., Ogihara, M., 1997. Proliferation of adult rat hepatocytes in primary culture induced by insulin is potentiated by cAMP-elevating agents. *Eur. J. Pharmacol.*, **327**, 87–95.
- 22) Michalopoulos, G. K., 1990. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.*, **4**, 176–187.
- 23) Kajiyama, Y., Ui, M., 1998. Differential mitogenic actions of α_1 - and β -adrenergic agonists on rat hepatocytes. *Cell. Signal.*, **10**, 241–251.

- 24) Nakamura, T., Yoshimoto, K., Nakayama, Y., Tomita, Y., Ichihara, A., 1983. Reciprocal modulation of growth and differentiated functions of mature rat hepatocytes in primary culture by cell--cell contact and cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 7229–7233.
- 25) Tsujii, H., Okamoto, Y., Kikuchi, E., Matsumoto, M., Nakano, H., 1993. Prostaglandin E₂ and rat liver regeneration. *Gastroenterology*, **105**, 495–499.
- 26) Yayama, K., Miyagi, R., Sugiyama, K., Sugaya, T., Fukamizu, A., Okamoto, H., 2008. Angiotensin II regulates liver regeneration *via* type 1 receptor following partial hepatectomy in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1356–1361.
- 27) Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D. J., Tian, Y., Jochum, W., Gachet, C., Bader, M., Clavien, P. A., 2006. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, **312**, 104–107.
- 28) Balasubramanian, S., Paulose, C. S., 1998. Induction of DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes by serotonin: possible involvement of serotonin S₂ receptor. *Hepatology*, **27**, 62–66.
- 29) Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hörtnagl, H., Mechthild V., Fink, H., Bader, M., 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, **299**, 76.
- 30) Matondo, R. B., Punt, C., Homberg, J., Toussaint, M. J. M., Kisjes, R., Korporaal, S. J. A., Akkerman, J. W. N., Cuppen, E., Bruin, A., 2009. Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **296**, G963–G968.
- 31) 田中 千賀子、加藤 隆一、成宮 周、NEW 薬理学 (2017)、p. 140、南江堂
- 32) Miyamoto, H., Nakamaru-Ogiso, E., Hamada, K., Hensch, T. K., 2012. Serotonergic integration of circadian clock and ultradian sleep-wake cycles. *J. Neurosci.*, **32**, 14794–14803.
- 33) Nakamaru-Ogiso, E., Miyamoto, H., Hamada, K., Tsukada, K., Takai, K., 2012. Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. *Eur. J. Neurosci.*, **35**, 1762–1770.

- 34) 山内 兄人、2014. 生殖神経内分泌Ⅱ：神経制御機構とセロトニン神経の役割、人間科学研究、27, 149–176
- 35) Barnes, N. M., Sharp, T., 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, **38**, 1083–1152.
- 36) Han, X., Chen, C., Cheng, G., Liang, L., Yao, X., Yang, G., You, P., Shou, X., 2015. Peroxisome proliferator-activated receptor γ attenuates serotonin-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis inhibition involving ERK1/2 pathway. *Microvasc. Res.*, **100**, 17–24.
- 37) Oufkir, T., Vaillancourt, C., 2011. Phosphorylation of JAK2 by serotonin 5-HT_{2A} receptor activates both STAT3 and ERK1/2 pathways and increases growth of JEG-3 human placental choriocarcinoma cell. *Placenta*, **32**, 1033–1040.
- 38) Dai, S. Q., Yu, L. P., Shi, X., Wu, H., Shao, P., Yin, G. Y., Wei, Y. Z., 2014. Serotonin regulates osteoblast proliferation and function *in vitro*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **47**, 759–765.
- 39) Liu, Y., Zhang, Z. Y., 2009. Serotonin receptor agonist quipazine promotes proliferation and apoptosis of human hepatocyte strain of L-02 strain. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, **8**, 278–281.
- 40) Murata, S., Ohkohchi, N., Matsuo, R., Ikeda, O., Myronovych, A., Hoshi, R., 2007. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J. Surg.*, **31**, 808–816.
- 41) Myronovych, A., Murata, S., Chiba, M., Matsuo, R., Ikeda, O., Watanabe, M., Hisakura, K., Nakano, Y., Kohno, K., Kawasaki, T., Hashimoto, I., Shibasaki, Y., Yasue, H., Ohkohchi, N., 2008. Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *J. Hepatol.*, **49**, 363–372.
- 42) Maruyama, T. Murata, S., Takahashi, K., Tamura, T., Nozaki, R., Ikeda, N., Fukunaga, K., Oda, T., Sasaki, R., Ohkohchi, N., 2013. Platelet transfusion improves liver function in patients with chronic liver disease and cirrhosis. *Tohoku J. Exp. Med.*, **229**, 213–220.
- 43) 日本赤十字社、濃厚血小板-LR「日赤」、添付文書.

- 44) Kimura, M., Ogihara, M., 1997. Density-dependent proliferation of adult rat hepatocytes in primary culture by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents. *Eur. J. Pharmacol.*, **324**, 267–276.
- 45) Morley, C. G. D., Kingdon, H. S., 1971, Use of ³H-thymidine for measurement of DNA synthesis in rat liver—a warning. *Anal. Biochem.*, **45**, 298–305.
- 46) Lees, M. B., Paxman, S., 1972. Modification of the lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. *Anal. Biochem.*, **47**, 184–192.
- 47) Nakamura, T., Tomita, Y., Ichihara, A., 1983. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.*, **94**, 1029–1035.
- 48) Bonhaus, D. W., Bach, C., DeSouza, A., Salazar, F. H. R., Matsuoka, B. D., Zuppan, P., Chan, H. W., Eglen, R. M., 1995. The pharmacology and distribution of human 5-hydroxytryptamin_{2B} (5-HT_{2B}) receptor gene products: comparison with 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 622–628.
- 49) Audia, J. E., Evrard, D. A., Murdoch, G. R., Droste, J. J., Nissen, J. S., Schenck, K. W., Fludzinski, P., Lucaites, V. L., Nelson, D. L., Cohen, M. L., 1996. Potent, selective tetrahydro-β-carboline antagonists of the serotonin 2B (5HT_{2B}) contractile receptor in the rat stomach fundus. *J. Med. Chem.*, **39**, 2773–2780.
- 50) Bromidge, S. M., Duckworth, M., Forbes, I. T., Ham, P., King, F. D., Thewlis, K. M., Blamey, F. E., Naylor, C. B., Blackburn, T. P., Kennett, G. A., Wood, M. D., Clarke, S. E., 1997. 6-Chloro-5-methyl-1-[[2-[(2-methyl-3-pyridyl)oxy]-5-pyridyl]carbonyl]-indoline (SB-242084): the first selective and brain penetrant 5-HT_{2C} receptor antagonist. *J. Med. Chem.*, **40**, 3494–3496.
- 51) McLean, T. H., Parrish, J. C., Braden, M. R., Marona-Lewicka, D., Gallardo-Godoy, A., Nichols, D. E., 2006. 1-Aminomethylbenzocycloalkanes: conformationally restricted hallucinogenic phenethylamine analogues as functionally selective 5-HT_{2A} receptor agonists. *J. Med. Chem.*, **49**, 5794–5803.

- 52) Kennett, G. A., Bright, F., Trail, B., Baxter, G. S., Blackburn, T. P., 1996. Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety. *Br. J. Pharmacol.*, **117**, 1443–1448.
- 53) Kalgutkar, A. S., Dalvie, D. K., Aubrecht, J., Smith, E. B., Coffing, S. L., Cheung, J. R., Vage, C., Lame, M. E., Chiang, P., McClure, K. F., Maurer, T. S., Coelho, R. V., Soliman, V. F., Schildknecht, K., 2007. Genotoxicity of 2-(3-Chlorobenzyloxy)-6-(piperazinyl)pyrazine, a novel 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor agonist for the treatment of obesity: role of metabolic activation. *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 848–858.
- 54) Levitzki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, **267**, 1782–1788.
- 55) Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., Brown, R. F., 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.
- 56) Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., Saltiel, A. R., 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489–27494.
- 57) Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R., Blenis, J., 1992. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*, **69**, 1227–1236.
- 58) Price, D. J., Grove, J. R., Calvo, V., Avruch, J., Bierer, B. E., 1992. Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science*, **257**, 973–977.
- 59) Holgate, S. T., Lewis, R. A., Austen, K. F., 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.
- 60) Thompson, A. K., Mostafapour, S. P., Denlinger, L. C., Bleasdalell, J. E., Fisher, S. K., 1991. The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23856–23862.

- 61) Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., Duhamel, L., Charon, D., Kirilovsky, J., 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15771–15781.
- 62) Billmen, G. E., 1993. Intracellular calcium chelator, BAPTA-AM, prevents cocaine-induced ventricular fibrillation. *Am. J. Physiol.*, **265**, H1529-H1535.
- 63) Kimura, M., Ogihara, M., 1997. Proliferation of adult rat hepatocytes by hepatocyte growth factor is potentiated by both phenylephrine and metaproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 11446-1154.
- 64) Miyazaki, K., Eguchi, S., Tomonaga, T., Inokuma, T., Hamasaki, K., Yamanouchi, K., Takatsuki, M., Kamohara, Y., Tajima, Y., Kanematsu, T., 2011. The impact of the intra-abdominal space on liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *J. Surg. Res.*, **171**, 259–265.
- 65) Nakamura, T., Ichihara, A., 1985. Control of growth and expression of differentiated functions of mature hepatocytes in primary culture. *Cell Struct. Funct.*, **10**, 1–16.
- 66) Kimura, M., Moteki, H., Ogihara, M., 2011. Inhibitory effects of dexamethasone on hepatocyte growth factor-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Sci.*, **115**, 390–398.
- 67) Kimura, M., Moteki, H., Ogihara, M., 2011. Inhibitory effects of dexamethasone on epidermal growth factor-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 682–687.
- 68) Loyer, P., Cariou, S., Glaise, D., Bilodeau, M., Baffet, G., Guguen-guillouzo, C., 1996. Growth factor dependence of Progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11484–11492.
- 69) Kimura, M., Ogihara, M., 1999. Stimulation by transforming growth factor- α of DNA synthesis and proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures: modulation by α - and β -adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 171–180.

- 70) Kimura, M., Ogihara, M., 1998. 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.
- 71) Watts, S. W., Cohen, M. L., 1992. Further evidence that the guinea pig tracheal contractile serotonergic receptor is a 5-hydroxytryptamine₂ receptor: use of 5-methyltryptamine and dipropyl-5-carboxamidotryptamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 271–275.
- 72) Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Meur, M. L., Messaddeq, N., Launay, J. M., Maroteaux, L., 2000. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 9508–9513.
- 73) De Lucchini, S., Ori, M., Cremisi, F., Nardini, M., Nardi, I., 2005. 5-HT_{2B}-mediated serotonin signaling is required for eye morphogenesis in *Xenopus*. *Mol. Cell. Neurosci.*, **29**, 299–312.
- 74) Collet, C., Schiltz, C., Geoffroy V., Maroteaux, L., Launay, J. M., Vernejoul, M. C., 2008. The serotonin 5-HT_{2B} receptor controls bone mass *via* osteoblast recruitment and proliferation. *FASEB J.*, **22**, 418–427.
- 75) Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F. C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Yang, K., Honig, G., Hart, M., Kishimoto, N., Wang, J., Yagihashi, S., Tecott, L. H., Watada, H., German, M. S., 2010. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.*, **16**, 804–808.
- 76) Wouters, M. M., Roeder, J. L., Tharayil, V. S., Stanich, J. E., Stregge P. R., Lei, S., Bardsley M. R., Ordog, T., Gibbons, S. J., Farrugia, G., 2009. Protein kinase C γ mediates regulation of proliferation by the serotonin 5-hydroxytryptamine receptor 2B. *J. Biol. Chem.*, **284**, 21177–21184.
- 77) Nebigil, C. G., Launay, J. M., Hickel, P., Tournois, C., Maroteaux, L., 2000. 5-Hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 2591–2596.
- 78) Wee, P., Wang, Z., 2017. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers*, **9**, 1–45.

- 79) Kimura, M., Osumi, S., Ogihara, M., 2011. Prostaglandin E₂ (EP₁) receptor agonist-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes: the involvement of TGF- α . *Endocrinology*, **142**, 4428–4440.
- 80) Kimura, M., Moteki, H., Ogihara, M., 2014. Involvement of endogenous transforming growth factor- α in signal transduction pathway for interleukin-1 β -induced hepatocyte proliferation. *Eur. J. Pharmacol.*, **745**, 223–233.
- 81) Roskoski, R., 2014. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.*, **79**, 34–74.
- 82) Scaltriti, M., Baselga, J., 2006. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 5268–5272.
- 83) Machida, T., Ohta, M., Onoguchi, A., Iizuka, K., Sakai, M., Minami, M., Hirafuji, M., 2011. 5-Hydroxytryptamine induces cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells: Mechanisms involving Src, PKC and MAPK activation. *Eur. J. Pharmacol.*, **656**, 19–26.
- 84) Watts, S. W., Yang, P., Banes, A. K., Baez, M., 2001. Activation of Erk mitogen-activated protein kinase proteins by vascular serotonin receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **38**, 539–551.
- 85) Gurbuz, N. Asoglu, M. R., Ashour A. A., Salama, S., Kilic, G. S., Ozpolat, B., 2016. A selective serotonin 5-HT_{1B} receptor inhibition suppresses cells proliferation and induces apoptosis in human uterine leiomyoma cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **206**, 114–119.
- 86) Okamoto, H., Kimura, M., Watanabe, N., Ogihara, M., 2009. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-2-mediated DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes: The involvement of endogenous transforming growth factor- α . *Eur. J. Pharmacol.*, **604**, 12–19.
- 87) Moteki, H., Kimura, M., Ogihara, M., 2011. Activation of extracellular-signal regulated kinase by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1542–1552.

- 88) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4350–4354.
- 89) Hoyer, D., Bell, G. I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P. P. A., ÓCarroll, A. M., Patel, Y. C., Schonbrunn, A., Taylor, J. E., Rwisine, T., 1995. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci.*, **16**, 86–88.
- 90) 岡本 浩、2008. 腫瘍壊死因子 α 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、城西大学大学院博士論文。
- 91) Moteki, H., Kimura, M., Ogihara, M., 2011. Activation of extracellular-signal regulated kinase by platelet-derived growth factor is potentiated by phenylephrine in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 980–986.
- 92) Frémin, C., Ezan, F., Guegan, J., Gailhouste L., Trotard, M., Seyec, J. L., Ragul, J., Theret, N., Langouët, S., Baffet, G., 2012. The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses. *J. Cell. Physiol.*, **227**, 59–69.
- 93) Frémin, C., Ezan, F., Boisselier, P., Bessard A., Pagès, G., Pouysségur, J., Baffet, G., 2007. ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: An RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology*, **45**, 1035–1045.
- 94) De Larco, J. E., Todaro, G. J., 1978. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 4001–4005.
- 95) 原田賢一、汐田剛史、1999. 慢性肝疾患における血清 Transforming Growth Factor- α (TGF- α) 及び肝組織中 TGF- α と Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) の発現、米子医誌、**50**, 67–77.
- 96) Schreiber, A. B., Winkler, M. E., Derynck, R., 1986. Transforming growth factor- α : A more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science*, **232**, 1250–1253.
- 97) Madtes, D. K., Raines, E. W., Sakariassen, K. S., Assoian, R. K., Sporn, M. B., Bell, G. I., Ross, R., 1988. Induction of transforming growth factor- α in activated human alveolar macrophages. *Cell*, **53**, 285–293.

- 98) Barrandon, Y., Green, H., 1987. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor- α and epidermal growth factor. *Cell*, **50**, 1131–1137.
- 99) Mead, J. E., Fausto, N., 1989. Transforming growth factor α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 1558–1562.
- 100) Amino, S. Itakura, M., Ohnishi, H., Tsujimura, J., Koizumi, S., Takei, N., Takahashi, M., 2002. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca^{2+} -responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biochem.*, **131**, 887–894.
- 101) Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Ellis-Davies, G. C. R., Miyashita, Y., Kasai, H., 1999. Post-priming actions of ATP on Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 760–765.
- 102) Lukomska, B., Dluzniewska, J., Polanski, J., Zajac, L., 2004. Expression of growth factors in colorectal carcinoma liver metastatic patients after partial hepatectomy: implications for a functional role in cell proliferation during liver regeneration. *Comp. Hepatol.*, **3**, S52.
- 103) 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.
- 104) Lesurtel, M., Soll, C., Humar, B., Clavien, P. A., 2012. Serotonin: A double-edged sword for the liver? *Surgeon*, **10**, 107–113.
- 105) Tian, Y., Graf, R., El-Badry, A. M., Lesurtel, M., Furrer, K., Moritz, W., Clavien, P. A., 2011. Activation of serotonin receptor-2B rescues small-for-size liver graft failure in mice. *Hepatology*, **53**, 253–262.
- 106) Zhang, J., Song, S., Pang, Q., Zhang, R., Zhou, L., Liu, S., Meng, F., Wu, Q., Liu, C., 2015. Serotonin deficiency exacerbates acetaminophen-induced liver toxicity in mice. *Sci. Rep.*, **5**, 8098.

107)Soll, C., Jang, J. H., Riener, M. O., Moritz, W., Wild, P. J., Clavien, P. A., 2010. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology*, **51**, 1244–1254.