

肝臓は、人体最大の線臓器であり、生体の恒常性維持に必要な特異機能（血漿タンパク質の合成・分泌や脂質合成など）を有する臓器である。さらに肝臓は、他の臓器には認められない肝再生と呼ばれる自己増殖能を有している。これは、例えば、肝臓を外科的に部分切除した場合、残された正常な残余肝が、自動的に分裂・増殖を開始し、残余肝が元の容積まで増加したところで、分裂・増殖が自動的に停止するという現象である。この現象は、古くから知られていたが、その詳しいメカニズムは現在でも不明な部分が多い。*in vivo* 実験系である 70%部分肝切除術は、肝再生モデルとして、今日でも多くの研究者たちに汎用されており、肝再生時に分泌される増殖因子やサイトカイン、ホルモンなどの液性因子の作用について検討することができる。しかし、この方法では、生体内の多くの因子が介在するため、個々の増殖因子やサイトカインの役割やその細胞内シグナル伝達機構を検討して、一定の結論を導くには困難である。一方、肝細胞の単離・精製の方法論上の進歩や培養技術の発展により、初代培養肝実質細胞実験系（*in vitro* 実験系）が確立した。中でも、Seglen らにより報告された *in situ* コラゲナーゼ還流法は、再現性、収率、生存率とも高い肝実質細胞分離法であり、また、この方法により得られた肝実質細胞は、代謝活性が高く、多くの増殖因子受容体やカテコールアミン受容体なども発現しており、低細胞密度培養において、増殖因子に対する反応性に優れていることから、*in vitro* 実験系の肝再生モデルとして、有用であると考えられている。

本研究は、この *in vitro* 実験系である初代培養肝実質細胞を用いて、肝実質細胞増殖促進因子の候補物質として、ビタミン C の一つである L-アスコルビン酸に着目し、肝実質細胞の増殖に関する作用について詳細に検討を行った。本研究は、第 1 章と第 2 章から構成されており、第 1 章では、L-アスコルビン酸及びその誘導体の肝実質細胞増殖促進作用に対する影響とその細胞内シグナル伝達機構について検討し、明らかにすることを目的とした。その結果、L-アスコルビン酸及びその安定型誘導体である L-アスコルビン酸 2 グルコシドは、肝実質細胞において、単独で、早期に、用量（比較的低用量）及び培養時間に依存して増殖促進作用を示すことを見出した。さらに、各種の特異的シグナル伝達因子阻害薬や増殖因子に対するモノクローナル抗体、いくつかのシグナル伝達因子のリン酸化活性を測定することにより、これら薬物による肝実質細胞増殖促進作用の細胞内シグナル伝達機構について詳しく検討した。その結果、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドは、肝実質細胞膜上に存在するインスリン様増殖因子 I (insulin-like growth factor I : IGF-I) 受容体を直接刺激することにより、受容体チロシンキナーゼ、PI3 キナーゼ、MEK、ERK2(p42 MAP

キナーゼ)、mTOR を順次活性化させ、核に細胞増殖促進性のシグナルを伝達することを、初めて証明した。一方、酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸やアスコルビン酸の光学異性体であるイソアスコルビン酸では、このような作用が認められなかった。さらに、L-アスコルビン酸およびその誘導体である L-アスコルビン酸 2 グルコシドが、肝実質細胞の IGF-I 受容体を直接刺激することは、 $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I と L-アスコルビン酸及びその誘導体との結合特性に関する binding assay を用いた検討結果からも支持された。

第 2 章では、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドの初代培養肝実質細胞増殖促進作用に対してアドレナリン作動性調節機構が関与するかどうかについて、IGF-I 受容体チロシンキナーゼや MAP キナーゼの活性（リン酸化活性）を直接測定することにより、また、各種の特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いることにより詳細に検討した。その結果、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドによる肝実質細胞増殖促進作用は、アドレナリン α_1 受容体シグナル伝達系及びアドレナリン β_2 受容体シグナル伝達系の双方から、それぞれ増強性の調節を受けており、この増強は、それぞれプロテインキナーゼ C 及びプロテインキナーゼ A の活性化を介していることを見出した。さらに、これらのアドレナリン作動薬は、IGF-I 受容体チロシンキナーゼの下流から ERK2 の上流の間でクロストークをしていることを見出した。

本研究により証明した L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドによる肝実質細胞増殖促進作用は、生体肝移植患者の肝再生を促進して、肝機能を早期に回復させる広義の肝庇護薬として臨床応用することが期待できる。また、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドが IGF-I 受容体に結合して効果を示すことから、肝実質細胞だけでなく、IGF-I 受容体が存在する他の細胞に対しても増殖促進作用を示す可能性がある。IGF-I 受容体は様々な細胞に広く分布しているため、例えば、皮膚や皮下組織などの細胞の増殖に応用できれば、熱傷や火傷、褥瘡などの創傷治療の新しい治療薬として利用できるかもしれない。さらに、上記のような L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドによる肝庇護作用や創傷治癒作用は、アドレナリン α_1 及び β_2 受容体作動薬を併用することにより、治療効果を増加させることも期待できる。

このように本研究から得られた実験結果は、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドによる、IGF-I 受容体を介する肝実質細胞増殖促進作用機構及びアドレナリン作動性調節機能の関与の理解に止まらず、L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドが比較的安全性の高い増殖因子療法薬として臨床応用できる可能性も示している。本研究から得られた新規の基礎的データが、様々な研究分野や臨床分野へ応用されることを期待したい。

以上

論文審査の結果の要旨

肝臓は、*in vivo*において、通常は細胞増殖応答を停止しているが、外科的部分切除や肝毒性を示す化学物質の投与などによる肝障害により増殖を開始し、臓器を再生する能力を有している。肝再生は、増殖因子だけでなく、サイトカイン、ホルモンなどの因子が複雑に関与し合って調節されている。肝実質細胞の増殖に関与する因子は、次のように分類されている、①増殖促進因子 (**primary mitogen**)、②増殖修飾因子 (**co-mitogen**)、③増殖抑制因子、④物理的因子など。しかし、*in vivo*の実験系は、ある因子や薬物の注目する事象に対する作用機構を検討しようとする、関与する因子 (要素)が多すぎて、実験結果から一定の結論を導き出すことが困難な場合も多い。そこで、本研究では、*in vivo*並みの代謝活性と成長因子やホルモンなどに対する応答性を備えた、より単純な *in vitro* 初代培養肝実質細胞実験系を用いて、肝実質細胞に対する増殖因子の作用、及びそのシグナル伝達機構を検討している。

本博士論文は、第1章と第2章から構成されている。第1章では、近年、ある種の細胞で増殖促進作用を示すとの報告があるL-ascorbic acid 及びその誘導体に焦点を当てて、それらが肝実質細胞増殖促進因子であることを*in vitro* 初代培養肝実質細胞 (以下、肝実質細胞と略す) 実験系を用いて詳細に検討した。そして、そのシグナル伝達機構も明らかにした。すなわち、L-ascorbic acid 及びその安定型誘導体であるL-ascorbic acid 2-glucoside は、肝実質細胞に対して、単独で、早期に、比較的low濃度で、かつ培養時間に依存した増殖促進作用を示すことを見出した。一方、dehydroascorbic acid、isoascorbic acidは、有意な増殖促進作用を示さなかった。さらに、これらの薬物による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ところ、L-ascorbic acid及びL-ascorbic acid 2-glucosideが、インスリン様増殖因子insulin-like growth factor (IGF)-I 受容体を直接刺激して、IGF-I receptor tyrosine kinase、phosphoinositide 3 (PI3) kinase、mitogen-activated protein (MAP) kinase/ERK kinase (MEK)、mammalian target of rapamycinを逐次的に活性化させ、核に細胞増殖促進性のシグナルを伝達していることを、いくつかのシグナル伝達因子のリン酸化活性を測定することにより、また各伝達因子の特異的な阻害薬や抗IGF-I 受容体抗体を用いることにより初めて証明した。一方で、L-ascorbic acid及びL-ascorbic acid 2-glucosideが、細胞内に取り込まれて、何らかのオートクリン因子の分泌を促進して、間接的に肝実質細胞の増殖を促進するという可能性も考えられたが、肝実質細胞の主要なオートクリン因子であるIGF-I や形質転換因子 α を中和するモノクローナル抗体の存在下でも、これらの薬物による肝実質細胞増殖促進作用に影響がなかった

ことから、この経路の関与は否定された。さらに、L-ascorbic acid 及びL-ascorbic acid 2-glucoside が、肝実質細胞のIGF-I 受容体を直接刺激することは、 $[^{125}\text{I}]$ -IGF-IとL-ascorbic acid及びその誘導体との結合特性に関する binding assay 法を用いた検討結果からも支持された。

第2章では、L-ascorbic acid 及びL-ascorbic acid 2-glucosideの肝実質細胞増殖促進作用に対するアドレナリン作動性調節機構を、IGF-I receptor tyrosine kinase やMAP kinaseの活性（リン酸化反応）を直接測定することにより、また各伝達因子の特異的な阻害薬を用いることにより詳細に検討した。その結果、フェニレフリン（アドレナリン α_1 受容体作動薬）、メタプロテレノール（アドレナリン β_2 受容体作動薬）は、単独では、肝実質細胞増殖促進作用は示さないが、それぞれL-ascorbic acid、又はL-ascorbic acid 2-glucosideと併用することにより、L-ascorbic acid 及びL-ascorbic acid 2-glucosideによる肝実質細胞増殖促進作用を増強することを見出した。これらのアドレナリン作動薬の作用機構を検討した結果、それぞれホスホリパーゼC及びアデニル酸シクラーゼの活性化が関与していること、また、その下流の protein kinase C及び protein kinase Aの活性化が関与していることを見出した。さらに、L-ascorbic acid又はL-ascorbic acid 2-glucosideのシグナル伝達経路とアドレナリン α_1 受容体シグナル伝達系及びアドレナリン β_2 受容体シグナル伝達系とのクロストーク（cross-talk）の部位について検討したところ、アドレナリン作動薬による増殖促進シグナルは、IGF-I 受容体receptor tyrosine kinaseの下流とERK2 の上流の間でcross-talkしていることを見出した。

このようにして得られた研究結果は、L-ascorbic acid及びL-ascorbic acid 2-glucosideによる、IGF-I 受容体を介する肝実質細胞増殖促進作用機構及びそれらに対するアドレナリン作動性調節機構の関与の理解に止まらず、L-ascorbic acid及びL-ascorbic acid 2-glucosideが、比較的安全性の高い「肝再生療法薬」として臨床応用できる可能性をも示している。

以上述べたように、本論文の内容は、全体として高度でかつ独創的であることから、課程によらない博士（薬学）論文として十分価値のあるものと判断した。