

L-アスコルビン酸及びその誘導体による
成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する
増殖促進作用機構に関する研究

茂 木 肇

目次

略語	-----	VI
第1篇 序論	-----	1
第2編 本論	-----	8
第1章 L-アスコルビン酸及びその誘導体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	-----	8
1. 諸言	-----	8
2. 実験材料及び実験方法	-----	12
2-1. 実験動物	-----	12
2-2. 肝実質細胞の単離と培養	-----	12
2-3. 肝実質細胞の DNA 合成能の測定	-----	13
2-4. 核数計測	-----	13
2-5. IGF-I 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定	-----	14
2-6. MAP キナーゼリン酸化活性の測定	-----	15
2-7. 増殖因子及びその受容体に対する中和実験	-----	15
2-8. [¹²⁵ I]-IGF-I の IGF-I 受容体に対する結合実験	-----	16
2-9. IGF-I 受容体への [¹²⁵ I]-IGF-I 結合に対する競合阻害実験	-----	16
2-10. 実験材料	-----	17
2-11. L-アスコルビン酸及びその誘導体の構造式	-----	18
2.12. データの統計処理	-----	18
3. 実験結果	-----	19
3-1. L-アスコルビン酸及びその誘導体の初代培養肝実質細胞に対する効 果	-----	19
3-1-1. L-アスコルビン酸及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作 用の経時的変化	-----	20

3-1-2. L-アスコルビン酸及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係	----- 22
3-2. L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸 2 グルコシドのラット初代培養肝実質細胞の増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討	----- 24
3-2-1. 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	----- 24
3-2-2. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子受容体モノクローナル抗体の効果	----- 26
3-2-3. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する抗 IGF-I 受容体モノクローナル抗体の用量-反応関係	----- 28
3-2-4. 初代培養肝実質細胞における 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 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性及び MAP キナーゼリン酸化活性に対する効果	-- 30
3-2-4-1. 初代培養肝実質細胞における 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 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性及び MAP キナーゼリン酸化活性の経時的変化	----- 30
3-2-4-2. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-IRTK リン酸化活性及び 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	----- 33
3-3. 初代培養肝実質細胞の IGF-I 受容体に対する ^[125I] -IGF-I と L-アスコルビン酸及びその誘導体の結合性に関する検討	----- 36

3-3-1. 初代培養肝実質細胞における ¹²⁵ I-IGF-IのIGF-I受容体に対する結合実験	-----	36
3-3-2. 初代培養肝実質細胞におけるIGF-I受容体へのIGF-I結合に関するL-アスコルビン酸及びその誘導体による競合阻害実験	-----	36
4. 考察	-----	38
4-1. L-アスコルビン酸及びその誘導体の初代培養肝実質細胞増殖促進作用	-----	38
4-2. 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の細胞内シグナル伝達機構	-----	40
4-3. 初代培養肝実質細胞のIGF-I受容体に対するL-アスコルビン酸及びその誘導体の結合性	-----	44
5. 小括	-----	45
第2章 ラット初代培養肝実質細胞における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MAPキナーゼ活性化に対するアドレナリン作動性調節機構の検討	-----	47
1. 諸言	-----	47
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. 肝実質細胞のDNA合成能の測定	-----	50
2-4. 核数計測	-----	50
2-5. IGF-I受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定	-----	50
2-6. MAPキナーゼリン酸化活性の測定	-----	50
2-7. 実験材料	-----	50
2-8. データの統計処理	-----	50

3. 実験結果	-----	51
3-1. L-アスコルビン酸の初代培養肝実質細胞増殖作用に対するアドレナリン作動性調節機構の検討	-----	51
3-2. L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸 2 グルコシドによる初代培養肝細胞増殖作用に対する α_1 アドレナリン作動性調節機構の検討	-----	54
3-2-1. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK1/2 リン酸化活性に対するフェニレフリンの効果の経時的変化	-----	54
3-2-2. フェニレフリン存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 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	-----	56
3-2-3. TPA 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 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	-----	58
3-2-4. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対するフェニレフリンの効果の経時的変化	-----	60
3-2-5. TPA 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK 活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果	-----	60
3-2-6. 初代培養肝実質細胞におけるフェニレフリンまたは TPA による L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び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	-----	63
3-3. L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドによる初代培養肝実質細胞増殖促進作用に対する β_2 アドレナリン作動性機構の検討	-----	66

3-3-1. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK1/2 リン酸化活性に対するメタプロテレノールの効果の経時的変化	----- 66
3-3-2. メタプロテレノール存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 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	----- 68
3-3-3. 8-Bromo cAMP 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 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	----- 70
3-3-4. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対するメタプロテレノールの効果の経時的変化	----- 72
3-3-5. 8-Bromo cAMP 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK 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	----- 72
3-3-6. 初代培養肝実質細胞におけるメタプロテレノール及び 8-bromo cAMP による L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び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	----- 75
4. 考察	----- 78
4-1. 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に対する α_1 アドレナリン作動性調節機構	----- 78
4-2. 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に対する β_2 アドレナリン作動性調節機構	----- 80
4-3. 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機構と PKC 及び PKA との相互作用	----- 82
第 3 編 結論	----- 84
謝辞	----- 87
参考文献	----- 88

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

AsA	L-ascorbic acid	cAMP	cyclic adenosine 3',5'-monophosphate
AsA2G	L-ascorbic acid 2-glucoside	ERK	extracellular signal-regulated kinase
DAsA	dehydroascorbic acid	DG	diacylglycerol
IsoAsA	isoascorbic acid	IP ₃	inositol triphosphate
EGF	epidermal growth factor	MAPK	mitogen-activated protein kinase
HGF	hepatocyte growth factor	MEK	MAPK/ERK kinase
IGF-I	insulin-like growth factor-I	mTOR	mammalian target of rapamycin
IGF-II	insulin-like growth factor-II	p70S6K	70-kDa ribosomal protein S6 kinase
IL-6	interleukin-6	PI3K	phosphoinositide 3-kinase
TGF- α	transforming growth factor alpha	PKA	protein kinase A
TNF- α	tumor necrosis factor alpha	PKC	protein kinase C
TCA	trichloroacetic acid	PLC	phospholipase C
PBS	phosphate-buffered saline	RTK	receptor tyrosine kinase
MEM	minimum essential medium	AC	adenylate cyclase

② 特異的シグナル伝達因子阻害薬及び活性化薬

AG1478 (RTK inhibitor)	N-[3-chlorophenyl]-6,7-dimethoxy-4-quinazolinamine
AG538 (IGF-I RTK inhibitor)	α -cyano-(3-methoxy-4-hydroxy-5-iodocinnamoyl)-(3',4'-dihydroxyphenyl) ketone
GF109203X (PKC inhibitor)	2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)maleimide hydrochloride
H-89 (PKA inhibitor)	N-[2-(<i>p</i> -bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride
LY294002 (PI3K inhibitor)	2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one hydrochloride
PD98059 (MEK inhibitor)	2'-amino-3'-methoxyflavone
TPA (PKC activator)	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
U-73122 (PLC inhibitor)	1-[6-[[[(17 β)-3-methoxyestra-1,3,5(10 β)-trien-17-yl]amino]-hexyl]-1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dione
UK14304 (α_2 receptor agonist)	5-bromo-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinoxalinamine

第1篇 序論

肝臓は、代謝の中心的臓器であり、生体の恒常性の維持（ホメオスタシス）に必要不可欠な役割を果たしている。肝臓の主な機能として、血漿タンパク質の合成・分泌、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、脂質合成、尿酸合成、胆汁酸合成・分泌、解毒など、多種多様な特異機能が挙げられる¹⁾。それらの代謝のほとんどは、肝臓の総細胞数の約70%（湿重量では約90%）を占める「肝実質細胞」で行われている。残りの約30%は「非実質細胞」と呼ばれ、これは、血管内皮細胞、線維芽細胞、星細胞、クッパー細胞などに分類することができ、それぞれ特有の働きをしている。

更に肝臓は、肝再生（liver regeneration）と呼ばれる特殊な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り、四塩化炭素などにより肝障害を誘発した場合、残された正常な肝細胞（残余肝）が、自動的に分裂・増殖を開始する。その後、残余肝が元の容積まで増加したところで、分裂・増殖は自動的に停止する。この現象は、イモリの手足が再生するように、切断面の部分的な細胞のみが増殖を開始するものではなく、残された肝細胞全体が分裂・増殖するため、肝再生は、一般的（生物学的）な再生と全く異なったプロセスで進行するといわれている²⁾。このような特殊な肝再生という現象は、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。

肝再生は、古代ギリシャ神話にも登場する。それは「オリンポス山から火を盗んだプロメテウスが、全能の神ゼウスによって、禿鷹に生きながらにして肝臓をついばまれるという罰を受けた。しかし、翌日には、彼の肝臓は再生したため、再び禿鷹のエサとなり、プロメテウスは永久に苦痛を強いられた。」という話である³⁾。この古くから知られていた現象の解明を目指して、初めて科学的なアプローチを行った研究が Higgins と Anderson である⁴⁾。彼らが発表した70%部分肝切除術（partial hepatectomy：PH）は、*in vivo* 実験系の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いる。その後、ノックアウト動物の登場や遺伝子工学の技術的進歩が加わり、それらの研究の集積から、肝再生時に起こる生理的反応が少しずつ明らかとなってきた。

肝再生の経時的変化を観察すると、PH 施行後から速やかな変化がみられる。PH 施行30分後では、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) などの血漿濃度が上昇する。これらは、クッパー細胞から生産・分泌されるサイトカインであり、肝実質細胞の NF- κ B や STAT-3 のような転写因子を活性化させる²⁾。そのため、TNF- α や IL-6 は、肝再生の開始因子 (priming factor) として考えられている。PH を施行していないラットに対して、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) や形質転換増殖因子 α (transforming growth factor alpha : TGF- α) を単独投与した群と、TNF- α を併用投与した群との比較において、TNF- α 併用群の方が、肝細胞の DNA 合成能が 40% も上昇した⁵⁾。これは、TNF- α が肝細胞の細胞周期を G₀ 期から増殖因子が作用しやすい G₁ 期に移行させたことにより、増殖因子の反応性が高められ、HGF や TGF- α の細胞増殖促進作用が増強したと考えられている⁵⁾。

PH 施行により、TNF- α や IL-6 が分泌されるほぼ同時期に、様々な増殖因子が生産・分泌される。非実質細胞の星細胞からは HGF が、十二指腸のブルナー腺からは上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) が、それぞれ分泌される。また、肝実質細胞自身からオートクリン因子として、インスリン様増殖因子 I (insulin-like growth factor-I : IGF-I) や TGF- α なども分泌される。これらの増殖因子は、TNF- α や IL-6 により G₁ 期に移行した肝細胞の細胞周期を S 期に移行させ、DNA 合成能を高め、更に、G₂ 期、M 期へと移行させることにより、肝細胞が分裂・増殖すると考えられている。その後、分裂・増殖をくり返し、肝臓が元の容積にまで戻ると形質転換増殖因子 β_1 (transforming growth factor beta 1 : TGF- β_1) などの増殖抑制因子が肝細胞から分泌され、それにより、再び肝細胞は G₀ 期に戻り増殖が停止すると考えられている。このように、PH 後の肝臓は、TNF- α や IL-6 のようなサイトカインにより、増殖の準備 (G₀ 期→G₁ 期) がなされ、HGF や TGF- α などの増殖因子により、細胞が分裂・増殖 (G₁ 期→M 期→G₂ 期) し、元の容積に戻ると TGF- β_1 などの増殖抑制因子により、増殖が停止する (G₁ 期→G₀ 期) と考えられている (Fig.1)⁶⁾。

肝再生時の肝臓は、上記の増殖因子やサイトカインだけでなく、ホルモンの影響も受けている。肝再生に関与するホルモンとして、インスリン、甲状腺ホルモンやカテコールアミン (ノルアドレナリン) などが挙げられる³⁾。

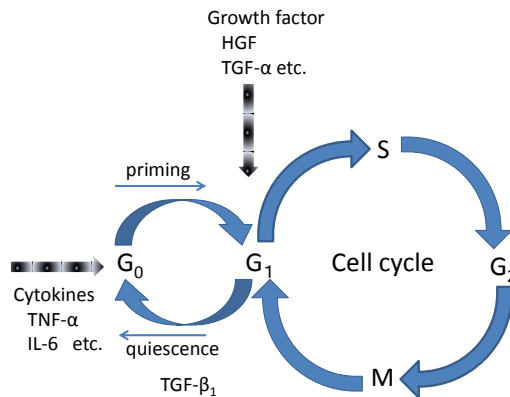


Fig.1 肝再生の多段階モデル 6)

インスリンは、哺乳動物において多くの代謝に関わるアナボリックなホルモンであり、特に血中グルコース濃度のコントロールには欠かせないホルモンである。その他に、インスリンは、肝再生のような細胞増殖にもかかわっていることが最近の研究で分かってきた³⁾。PH 施行動物において、膵臓からのインスリン供給を遮断すると、肝再生の抑制が認められる。しかし、その動物にインスリンを投与することにより、肝再生の抑制が解消され、肝細胞の増殖が回復したとの報告が挙げられている³⁾。また、後の研究で、*in vitro* 実験系において、インスリンは単独で肝細胞増殖促進作用を示し、更に EGF との併用により、インスリンによる肝細胞増殖促進作用を増強したことが証明されている^{1),7)}。

甲状腺から分泌される甲状腺ホルモン (triiodothyronine : T_3 , thyroxine : T_4) もまた、肝再生を促進させる因子として知られている³⁾。PH 施行動物に対して、 T_3 を投与することによって、肝細胞の DNA 合成能は促進し、肝再生を有意に促進したとの報告が挙げられている⁸⁾。また、肝障害患者の血清 T_3 / T_4 濃度は、健康人と比べ上昇していることが報告されており、甲状腺ホルモン (特に T_3) は、肝再生時に大きな役割を果たしているものと考えられる⁹⁾。

副腎髄質から分泌されるアドレナリンは、上記のホルモンのように単独では肝細胞増殖促進作用を示さないが、EGF や HGF などの増殖因子による肝細胞増殖促進作用を更に増強する増殖修飾因子といわれている¹⁰⁾。また、肝再生時に交感神経から分泌されるノルアドレナリンは、十二指腸のブルナー腺に作用し、EGF の分泌を促進しているとの報告も挙げられている³⁾。

更に、PH 後の肝実質細胞は、カテコールアミン受容体 (α_1 、 β_2 受容体) の発現が増加しており、これらの受容体に対する遮断薬 (α_1 受容体遮断薬のプラゾ

シンや β_2 受容体遮断薬のプロプラノロールなど) を、PH 施行動物に投与することにより、肝実質細胞の DNA 合成能の抑制が認められている¹¹⁾。従って、ノルアドレナリンのようなカテコールアミンは、肝再生時の細胞増殖に重要な役割を果たしていることが考えられる。

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.2 のようにまとめている³⁾。このように、肝再生は肝臓という一部の臓器だけで起こる現象ではなく、身体全体の様々な臓器が関与する特殊な現象であると考えられる。

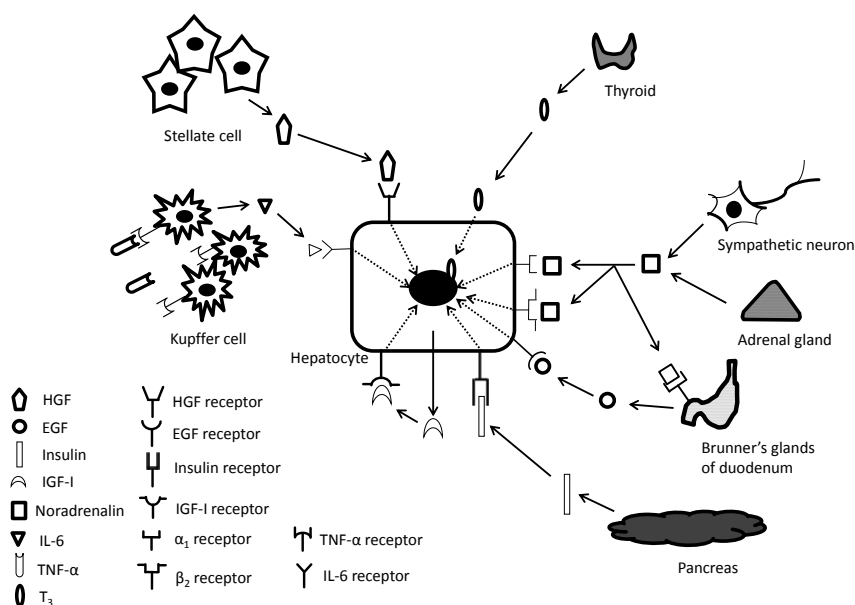


Fig.2 肝再生に関与する生化学的因子(液性因子)

肝再生は多くの液性因子により、調整されているが、細胞密度などの物理的因子の影響も関与している。Nakamura らの *in vitro* 実験系における報告によると、インスリンと EGF による肝実質細胞の DNA 合成能は、細胞密度の増加に依存して低下するが、肝分化機能の指標であるチロシントランスアミナーゼ誘導活性は、逆に細胞密度の増加に依存して上昇することを認めた¹²⁾。この結果から、正常な肝細胞において、高い細胞密度条件下の細胞の増殖は停止しているが、分化機能は発現しており、細胞周期は G_0 期の状態であると考えられる。しかし、肝障害などによる炎症により、肝細胞が壊死し、細胞密度が低下すると、肝細胞の細胞周期は G_0 期から G_1 期に移行するため、増殖因子の感受性が上昇し、増殖が開始すると考えられる。

このように、肝再生は増殖因子だけではなく、サイトカインやホルモン、細胞密度など様々な因子が相互に関与し合って、調節されているものと考えられている^{13),14)}。これら肝再生にかかわる因子は、次のように分類することができる。

- ① 増殖促進因子には、1) 成長因子（増殖因子）、2) ホルモン、3) サイトカインなどがある。
- ② 増殖修飾因子には、カテコールアミンなどがあり、これは単独では増殖促進作用はないが、増殖因子の機能を制御し、間接的に増殖促進または抑制を増強する。
- ③ 増殖抑制因子には、TGF- β_1 などのサイトカインがある。
- ④ 細胞密度などの物理的因子もある。

しかし、肝再生時に分泌される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には、未だに不明の部分が多い。これらの分子機構を *in vivo* 実験系で検討する際には、多くの他因子が介在するため、結論を導くには困難を要する。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。この実験系は、上記のような *in vivo* 実験系で問題となる多くの他因子の介在による複雑さをかなり回避することができるため、個々の増殖因子やサイトカインの作用メカニズムを研究する上で最適な実験方法であると考えられている。中でも、Seglen らにより報告された *in situ* コラゲナーゼ還流法 (*in situ* collagenase perfusion method) は、再現性、収率、生存率とも高い肝実質細胞分離法であり、この方法により、肝実質細胞を安定的に採取することが可能となった¹⁵⁾。この細胞を培養した肝実質細胞は、*in vivo* における肝臓に匹敵する多様な肝機能を長時間維持させることができる¹⁶⁾。また、HGF や EGF など、多くの増殖因子受容体やカテコールアミン受容体などが発現しており、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、この培養肝実質細胞の細胞周期は G₁ 期に移行していると考えられる¹⁾。そのため、この *in situ* コラゲナーゼ還流法により、単離・精製した肝実質細胞を初代培養させた実験系は、*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る。

Kimura らは、この初代培養肝実質細胞実験系を用いて、様々な増殖因子やサイトカイン、ホルモン、オートコイドなどの細胞増殖促進作用あるいは増殖修飾作用について、その作用メカニズムを詳しく研究してきた。その結果、以下の内容が明確となってきた。

無血清培養系において、

- 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 その効果は肝細胞播種時の密度に依存することが多い。
- ③ カテコールアミンによる修飾効果は、増殖因子ごとに異なる。
- ④ 肝細胞の分裂・増殖に関連する細胞内シグナル伝達経路には、かなりの共通性がある。

このように、肝再生機構を *in vitro* 実験系で検討することにより、長らく不明であった肝再生時に分泌される増殖因子やサイトカインの個々の作用メカニズムが少しずつ明らかになってきた。これらの基礎データは、生体肝移植における肝臓の提供者（ドナー）や受容者（レシピエント）において、肝機能の早期回復や創傷治療に用いられる細胞増殖因子療法などの臨床応用に繋げることも可能である。

そして、上記の結果を踏まえ、肝細胞の増殖に影響を与える種々の薬物の探索を行ってきたが、その中で L-アスコルビン酸が、ラット初代培養肝実質細胞の増殖を促進することを見出した。L-アスコルビン酸（L-ascorbic acid）はビタミン C とも呼ばれ、古くから抗酸化物質として知られている。近年、L-アスコルビン酸は、血管新生やコラーゲン合成促進作用による創傷治癒の促進、線維芽細胞や間葉系幹細胞の増殖促進など、間葉系の細胞増殖促進作用も報告されており、その新しい薬理作用が注目されている^{17)~19)}。L-アスコルビン酸による肝細胞増殖促進作用が確立すれば、生体肝移植患者の肝再生を促進し、肝機能を早期に回復させる安価な細胞増殖因子療法剤として臨床応用できるかもしれない。しかし、L-アスコルビン酸による肝実質細胞の増殖促進作用の詳細は、未だ報告されておらず、また、どのようなシグナル伝達経路が関与するのかは解明されていない。更に、カテコールアミンによる L-アスコルビン酸の肝実質細胞

胞の増殖促進作用の調節についても不明である。

このような背景から、本研究では、*in vitro* 実験系のラット初代培養肝実質細胞を用いて、L-アスコルビン酸の肝実質細胞増殖促進作用について、そのシグナル伝達機構を詳しく検討し、明らかにすることを目的とした。なお、本研究は2部構成となっており、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とそのシグナル伝達機構について、第2章では、L-アスコルビン酸の肝実質細胞増殖促進作用に対するカテコールアミンの修飾効果について述べる。

第2編 本論

第1章 L-アスコルビン酸及びその誘導体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

L-アスコルビン酸 (L-ascorbic acid) は、ラクトン構造を持つ、糖質に似た単純な水溶性ビタミンの一種である。L-アスコルビン酸を1か月間、摂取しないと、体内貯蔵量が徐々に失われ、血漿中濃度が $10 \mu\text{mol/L}$ 以下になると壊血病 (scurvy) のような欠乏症が発症するといわれている²⁰⁾。壊血病に対しては、1753年、英国船医 Lind によって、レモンやオレンジが有効であると報告され、以来、抗壊血病因子についての研究が進んだ。1918年にオレンジに抗壊血病因子が存在することがわかり、1920年にそれは「ビタミンC」と命名された。1932年 Szent-Györgyi により、ウシ副腎からビタミンCが分離・抽出され、その後、Haworth らにより、ビタミンCの化学構造が決定され、アスコルビン酸 (否定を表す接頭辞 a+壊血病 scurvy+酸 acid=ascorbic acid) と命名された²¹⁾。

ほとんどの動物は、D-グルクロン酸/L-グルロン酸経路が機能しているため、L-アスコルビン酸を生合成することができるが、ヒトや霊長類、一部の鳥類では、L-グルノ-1,4-ラクトンから L-アスコルビン酸に変換する D-グルノ-1,4-ラクトン酸化酵素が存在しないため、生合成することができない^{22),23)}。従って、これらの動物は L-アスコルビン酸を体外から摂取する必要がある。食餌などから摂取した L-アスコルビン酸は、細胞膜に存在するトランスポーターによって細胞内に取り込まれる。このアスコルビン酸輸送に関するトランスポーターには、グルコーストランスポーター (glucose transporter : GLUT) とナトリウム依存性ビタミンCトランスポーター (sodium-dependent Vitamin C transporter : SVCT) の2種類が知られている^{24),25)}。GLUTは、酸化型アスコルビン酸であるデヒドロアスコルビン酸のみを通過させる。細胞内に取り込まれたデヒドロアスコルビン酸は細胞内で還元され、再びアスコルビン酸に戻る。この輸送は、デヒドロアスコルビン酸の濃度勾配に従う受動輸送により、取り込まれる (Fig.3)

25)。一方、SVCTは、L-アスコルビン酸を直接、ナトリウム電気化学的勾配により細胞内へ取り込む。この輸送は、L-アスコルビン酸の濃度勾配に従わない能動輸送である (Fig.3) 25)。更に、SVCTは、SVCT1とSVCT2の2つのアイソフォームが知られている。SVCT1は、主に腸、腎臓、肝臓の上皮細胞に発現しており、L-アスコルビン酸の吸収をコントロールしているといわれている。それに対し、SVCT2は、脳や胎盤などの主に酸化ストレスに弱い臓器に多く分布している 25)。

L-アスコルビン酸の主な薬理作用として、抗酸化作用が挙げられる。トランスポーターにより取り込まれたL-アスコルビン酸は、体内に発生した活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS)を消去することにより、酸化ストレスから細胞を保護している 26)。この酸化還元反応により、L-アスコルビン酸は、デヒドロアスコルビン酸に酸化されるが、グルタチオンやニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate : NAD(P)H)による酸化還元反応により、再びL-アスコルビン酸に戻り、再利用することができる (Fig.3) 20),27),28)。

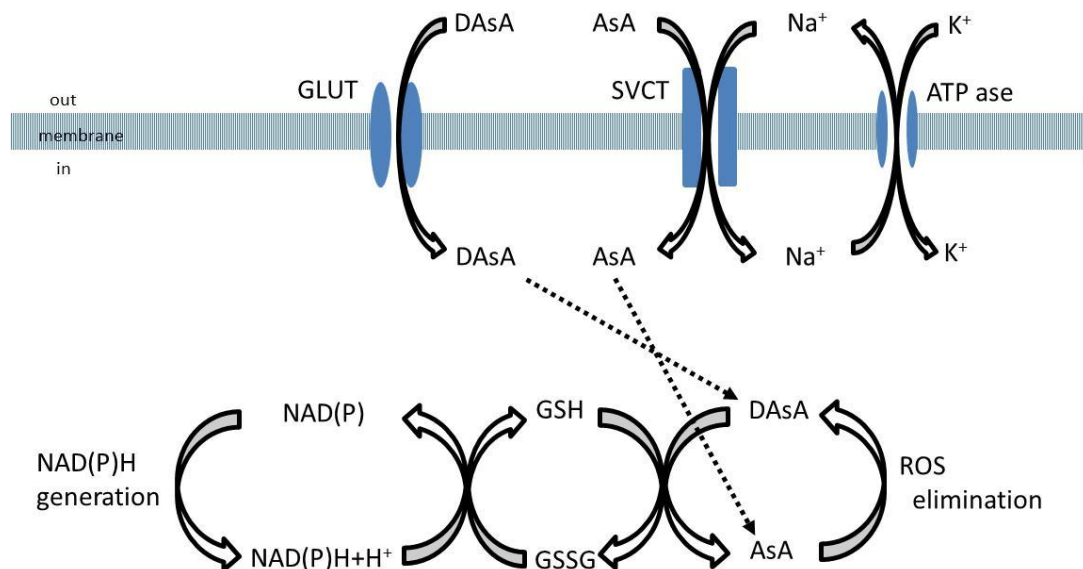


Fig.3 ビタミン C の細胞内輸送と酸化還元反応

GLUT: glucose transporter
 SVCT: sodium-dependent Vitamin C transporter
 NAD(P)H: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 GSH: glutathione
 GSSG: glutathione disulfide
 AsA: Ascorbic acid
 DAsA: Dehydroascorbic acid
 ROS: reactive oxygen species

また、L-アスコルビン酸は様々なヒドロキシル化酵素の補因子として作用することが知られており、その一つにコラーゲン合成が挙げられる。コラーゲンはいくつかのタンパク繊維（プロコラーゲン）が重合した構造を構築している。重合反応には、プロコラーゲン中のプロリン及びリシンのヒドロキシル化が不可欠であり、ヒドロキシル化したプロリン及びリシン（ヒドロキシプロリン、ヒドロキシリシン）により、プロコラーゲン同士が水素結合し、コラーゲンへと重合する。L-アスコルビン酸は、プロリン及びリシンをヒドロキシル化する酵素（プロリル-4-ヒドロキシラーゼ、リシルヒドロキシラーゼ）の補因子として作用し、コラーゲン合成に関与しているといわれている (Fig.4 A) ^{26),27)}。更に、L-アスコルビン酸は、L-カルニチンやノルアドレナリンの生合成に必要な ϵ -N-トリメチルリシンヒドロキシラーゼ、 γ -ブチロバチンヒドロキシラーゼ、ドパミン β -ヒドロキシラーゼの補因子として作用し、上記の生理活性物質の生合成に深く関与しているといわれている (Fig.4 B,C)^{25),27),29),30)}。

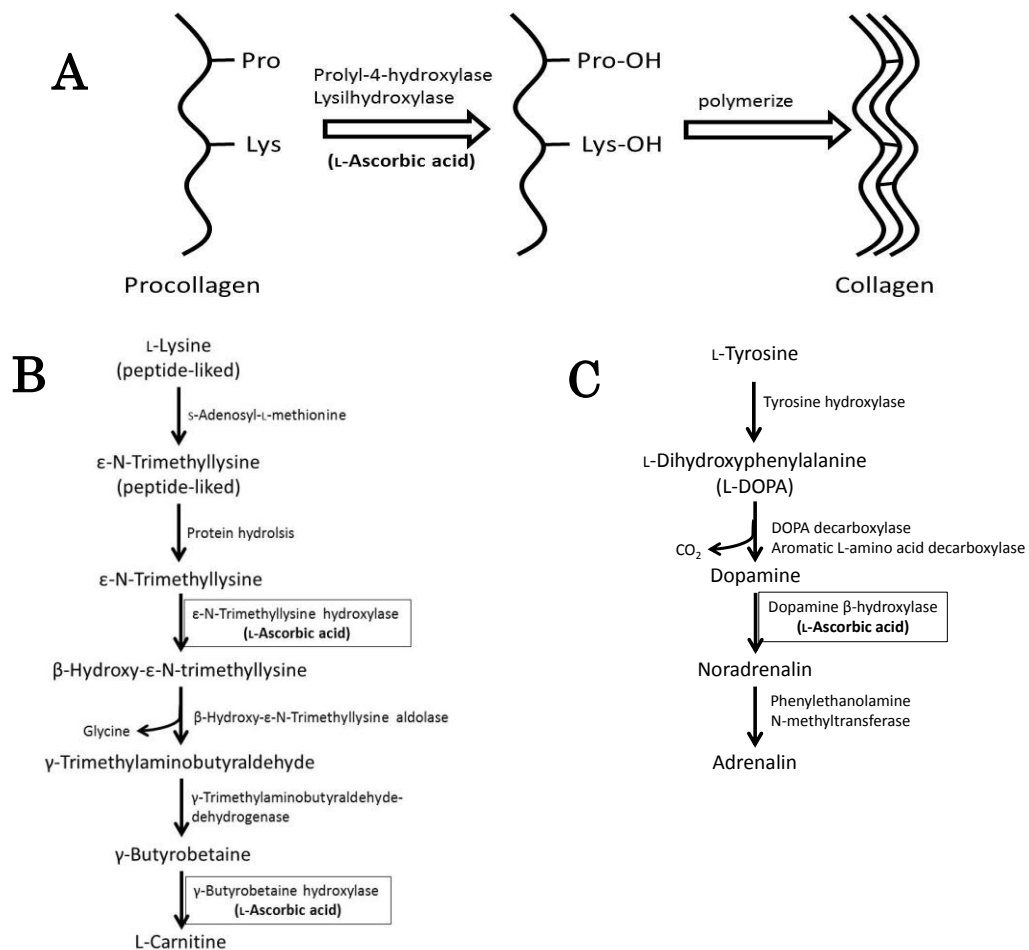


Fig.4 コラーゲン、L-カルニチン、ノルアドレナリンの生合成経路

A: Collagen B: L-Carnitine C: Noradrenalin and Adrenalin

最近、いくつかの研究で、L-アスコルビン酸やその誘導体は、様々なタイプの細胞の成長促進や抑制に大きな影響を与えていることが分かってきた。Shibayama らによると、ヒトの皮膚の線維芽細胞（normal human skin fibroblasts : NHSF）において、L-アスコルビン酸や sodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate : VCP-IS-Na（L-アスコルビン酸を安定化させた誘導体）が、用量依存的に細胞増殖を増加させたと報告している³¹⁾。また、Yang らは、L-アスコルビン酸が、ラットの眼房水中に高濃度含まれ、それが網膜前駆細胞に対して増殖促進作用を示すことを報告した³²⁾。

このように L-アスコルビン酸は、正常細胞において、細胞増殖促進作用を有すると報告されているのに対し、その対象が腫瘍細胞になると、細胞増殖の「促進作用」と「抑制作用」の相反する事象が報告されている³³⁾。

Fukushima らによると、膀胱がんを発生させる *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine を前処理した F344 ラット（膀胱がんモデル動物）に L-アスコルビン酸および NaHCO₃ を含む飲料水を 32 週間与えたところ、膀胱がんの発生率および細胞数が有意に増加したと報告している³⁴⁾。一方、HT29 細胞（結腸腺がん細胞）を用いた検討では、L-アスコルビン酸の用量に依存して HT29 細胞のネクロシスが促進し、細胞死を誘導させたと報告されている³⁵⁾。Alacín と Burón は、正常細胞や腫瘍細胞における L-アスコルビン酸の細胞増殖の促進作用及び抑制作用についてまとめており、それによると、HEP2 細胞（咽頭がん細胞）や KB 細胞（ヒト口腔がん細胞）、骨髄細胞などに対しては、L-アスコルビン酸は細胞増殖の抑制作用を示し、膀胱がんのような上皮細胞や白血病細胞には、細胞増殖促進作用を示したとしている³³⁾。

このように、L-アスコルビン酸の作用に関する生理学的、薬理学的見解は、新しい薬物治療やがん治療への応用に役立てることのできる情報ではあるが、L-アスコルビン酸による細胞増殖促進作用や抑制作用の細胞内メカニズムは、現在も判明していることは少ない。そこで、第 1 章では、成熟ラット初代培養肝実質細胞を用いて、L-アスコルビン酸及びその誘導体が肝実質細胞の増殖に対してどのような影響を与えるのか、また、その作用は、どのような細胞内メカニズムによるものかを検討し、明らかにすることを目的とした。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験動物

本実験では、Wistar 系雄性ラット（体重 200-220 g）を用いた。実験動物は実験前に最低 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。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

In situ コラゲナーゼ還流法(*in situ* collagenase perfusion)により、ラット肝実質細胞の単離を行った^{15),36)}。Wistar 系雄性ラットをペントバルビタール (45 mg/kg, i.p.) 麻酔下で開腹し、門脈と下大静脈にカニューレーションを行い、前還流液、コラゲナーゼ液を、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 Ca^{2+} -free-Hanks 液に十分に肝細胞を分散させ、遠心分離(600 rpm, 1 min × 2)した。更に、それを 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、遠心分離(600 rpm, 1 min × 2)し、肝実質細胞を単離した。単離した肝実質細胞は、トリパンプルー排除試験により細胞の生死を判別し、生存率 96%以上のものを以下の実験に用いた。

単離した肝実質細胞を、5% NBS と 10^{-10} M デキサメタゾン含有 MEM に播種密度が 3.3×10^4 cells/cm²になるよう調整し、それを 6-well collagen-coated plastic culture dish(35 mmφ)に播種した。続いて 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せた³⁷⁾。細胞接着後、培地を無血清 MEM に交換し、L-アスコルビン酸やその誘導体、特異的シグナル伝達因子阻害薬、増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体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 の取り込み量を用いて評価した^{38),39)}。培養終了 2 時間前に、 ^3H -thymidine(0.5 $\mu\text{Ci/ml}$)を各 well に添加し、培養終了後、phosphate-buffered saline (以下、PBS と略す) で肝実質細胞を 2 回洗浄した。5% Trichloroacetic acid (以下、TCA と略す) で、4°C で 30 分間静置し、細胞を沈殿させた後、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 を計測した。

DNA 合成能としては単位時間、単位タンパク質あたりの ^3H -thymidine 量 (dpm/mg protein/h) で表した。なお、肝実質細胞のタンパク質量は、SDS-Lowry 法により定量し、補正を行った⁴⁰⁾。また、特異的 ^3H -thymidine 取り込み量は、10 μM aphidicolin 共存在下の計数量を非特異的取り込み量として、各薬物群からの結果から差し引いて求めた。

2-4. 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³⁶⁾。肝実質細胞を種々の薬物で刺激し、一定時間培養した後、PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 含有 0.1 M クエン酸を 0.25 ml 加え、37°C、30 分間細胞膜を溶解し、裸核を得た。この液に同量の 0.1% トリパンプルー含有 PBS を加え、核を染色し、血球計算盤で核数を計測した。

今回、核細胞増殖促進作用の指標にして、細胞数ではなく、核数を計測した。その理由として、初代培養肝実質細胞は、一度、ディッシュに細胞を接着させると通常のトリプシンなどの酵素処理では、容易に剥がれなくなり、肝実質細胞数の計測が困難になるためである。

2-5. IGF-I 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定

IGF-I 受容体チロシンキナーゼ (insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinase : IGF-I-RTK、p95-kDa) のリン酸化活性は、抗リン酸化 IGF-I-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⁴⁾。この抗体は、IGF-I 受容体に存在するリン酸化された tyrosine 1161 残基に対して特異的に結合するものであり、他のリン酸化された tyrosine とは交差・結合しない。2-2.の方法により、肝実質細胞を単離し、接着させた後、無血清 MEM 培地に交換し、L-アスコルビン酸やその誘導体を添加して、培養した。一定時間、それらで培養した肝実質細胞を、氷冷 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 EDTA, 1 mM EGTA, 2.5 mM sodium 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。それを 3 分間超音波にかけ、遠心分離 (3,000 \times g, 3 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 (30 μ g/lane) を sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)により分離し、PVDF membrane に転写させた。なお、SDS-PAGE では 7.5% polyacrylamide resolving gel を用いた。その後、一次抗体 (抗リン酸化 IGF-I-RTK モノクローナル抗体)、二次抗体 (horseradish peroxidase (HRP)標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体) をそれぞれ反応させ、ECL kit を用いて抗リン酸化 IGF-I-RTK を発光標識させた。発光強度は化学発光解析装置 (KURABO, ChemiStage CC-16) にて測定・解析を行った。リン酸化された IGF-I-RTK (P-p95-kDa) は、非リン酸化 IGF-I-RTK ポリクローナル抗体 (total p95-kDa) を用いて基準化補正を行った。

2-6. MAP キナーゼリン酸化活性の測定

MAP キナーゼリン酸化活性は、抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体を用い、ERK1(p44-kDa)及び ERK2(p42-kDa)のリン酸化活性を各々 Western blot 解析法により測定した^{42),43)}。2-2.の方法により、肝実質細胞を単離・接着させ、無血清 MEM 培地に交換後、L-アスコルビン酸やその誘導体を添加し、培養した。一定時間、それらで培養した肝実質細胞を、氷冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 ml の Lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 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。それを 1 分間超音波にかけ、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 (30 µg/lane) を SDS-PAGE により分離し、PVDF membrane に転写させた。なお、SDS-PAGE は 10% polyacrylamide resolving gel を用いた。その後、一次抗体 (抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体)、二次抗体 (HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体) をそれぞれ反応させ、ECL kit を用いて抗リン酸化 MAPK を発光標識させた。発光強度は化学発光解析装置 (KURABO, ChemiStage CC-16) にて測定・解析を行った。リン酸化された ERK1 及び ERK2(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/p44-kDa)を用いて基準化補正を行った。

2-7. 増殖因子及びその受容体に対する中和実験

増殖因子及びその受容体に対する中和実験は、増殖因子やその受容体に対するモノクローナル中和抗体 (抗 IGF-I、TGF- α 、HGF 受容体、EGF 受容体、インスリン受容体、IGF-I 受容体、IGF-II 受容体、TNF 受容体-1 抗体) を用いた。2-2.で得た肝実質細胞に L-アスコルビン酸及びその誘導体存在下で様々な増殖因子やその受容体に対するモノクローナル中和抗体を添加し、培養した。一定時間培養後、DNA 合成能及び核数の計測を行った。なお、DNA 合成能及び核数計測は、各々2-3.、2-4.に準じて行った。

2-8. [¹²⁵I]-IGF-I の IGF-I 受容体に対する結合実験

[¹²⁵I]-IGF-I の IGF-I 受容体に対する結合試験は、Caro らの方法に従って行った⁴⁴⁾。2-2.の方法により、単離、接着させた肝実質細胞を Hanks-10 mM Hepes buffer, pH7.4 (8 mM glucose、10 mg/ml BSA 含有) で 3 回洗浄した。その後、100 nM 非標識 IGF-I 存在、非存在下において [¹²⁵I]-IGF-I (1-150 pM) を添加し、20°C 条件下で 2 時間、インキュベーションした。インキュベーション後、結合しなかったフリーの [¹²⁵I]-IGF-I を 4°C のインキュベーションバッファーで 2 回洗浄した後、0.2 M NaOH 0.5 ml で細胞を溶解し、ガンマカウンター (アロカ 7001) で [¹²⁵I]-IGF-I から放出される γ 線を計測した。非特異的な結合は 100 nM 非標識 IGF-I 存在下でインキュベーションしたもの、特異的な結合は total binding から非特異的な結合を差し引いたものとした。なお、以下の実験では、特異的な結合が total binding の 80% 以上のものを使用した。

2-9. IGF-I 受容体への [¹²⁵I]-IGF-I 結合に対する競合阻害実験

[¹²⁵I]-IGF-I と IGF-I 受容体との親和性を利用して、L-アスコルビン酸及びその誘導体と IGF-I 受容体との親和性を競合阻害試験により検討した。2-2.の方法により、単離し、接着した肝実質細胞を Hanks-10 mM Hepes buffer, pH7.4 (8 mM glucose, 10 mg/ml BSA 含有) で 3 回洗浄した。その後、50 pM [¹²⁵I]-IGF-I 存在下において種々の濃度の L-アスコルビン酸及びその誘導体を各々添加し、20°C 条件下で 2 時間、インキュベーションした。その後の操作は 2-8.の方法に準じて行った。

2-10. 実験材料

- Wistar系雄性ラットは（株）埼玉実験動物供給所（Saitama, Japan）から購入した。
 - AG1478, AG538, D-(-)-イソアスコルビン酸, デキサメタゾン は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.)から購入した。
 - ラパマイシン、PD98059は、R & D Systems (Minneapolis, MN, 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。
 - L-アスコルビン酸、L-アスコルビン酸2グルコシド、デヒドロアスコルビン酸は、（株）和光純薬工業（Osaka, Japan）から購入した。
 - 抗IGF-Iモノクローナル抗体、抗IGF-I受容体モノクローナル抗体(cat. no. GR11)は、Oncogene Research Products (Cambridge, MA, U.S.A.)から購入した。
 - 抗IGF-I受容体ポリクローナル抗体(phospho-Tyr 1161) は、Applied Biochemical Materials Inc. (Richmond, BC, Canada)から購入した。
 - 抗TNF受容体-1モノクローナル抗体、TGF- α モノクローナル抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, U.S.A.)から購入した。
 - 抗HGF受容体(c-Met)モノクローナル抗体は、Cell Signaling Technology, (Beverly, MA, U.S.A.)から購入した。
 - 抗EGF受容体モノクローナル抗体は、New England Biolabs (Beverly, MA, U.S.A.)から購入した。
 - 抗インスリン受容体(α -subunit)モノクローナル抗体は、Novus Biologicals, LLC (Littleton, CO, U.S.A.)から購入した。
 - 抗IGF-II受容体モノクローナル抗体は、Epitomics, Inc. (Burlingame, CA, U.S.A.)から購入した。
 - [Methyl ^3H] -thymidine (20 Ci/mmol)、[^{125}I]-IGF-I (2705 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。

2-11. L-アスコルビン酸及びその誘導体の構造式

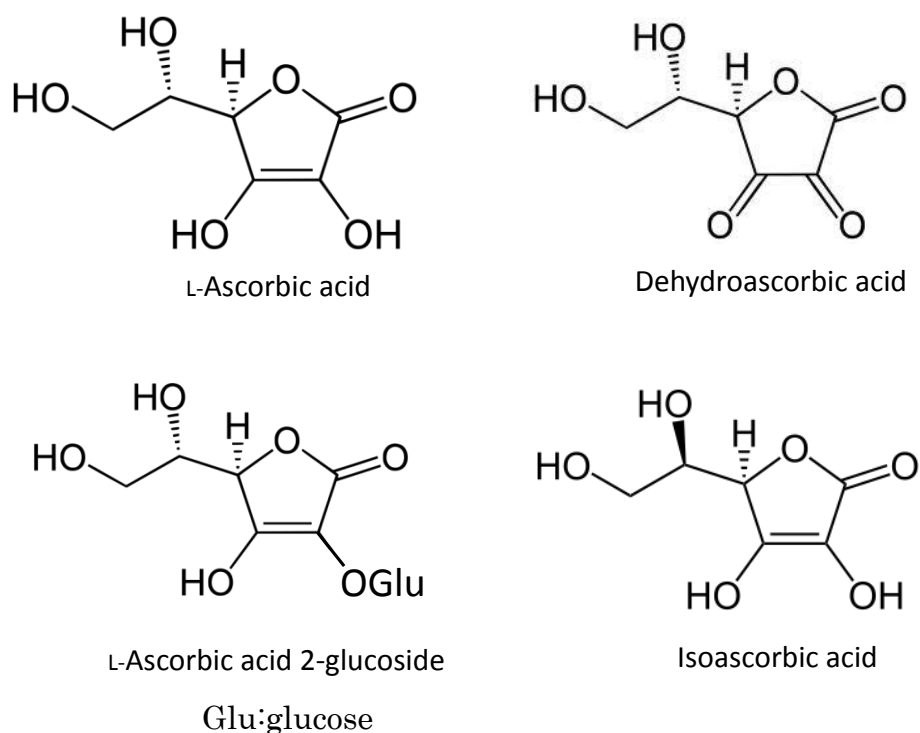


Fig.5 L-アスコルビン酸及びその誘導体の構造式

2-12. 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、一元配置の分散分析 (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。なお、危険率0.05未満 ($P < 0.05$) を統計上有意とみなした。

3. 実験結果

3-1. L-アスコルビン酸及びその誘導体の初代培養肝実質細胞に対する効果

In vitro の成熟ラット初代培養肝実質細胞において、L-アスコルビン酸(以下、AsA と略す) 及びその誘導体が肝実質細胞に対して増殖を促進するか否かを検討した。Fig.6 には、AsA(3×10^{-6} M)添加 4 時間後の肝実質細胞の位相差顕微鏡像を示した。顕微鏡像から、AsA(3×10^{-6} M)添加した肝実質細胞(Fig.6 B)は、control(medium ; Fig.6 A)と比べて肝実質細胞数を増加させることを見出した。この結果は、AsA が、肝実質細胞に対し、細胞増殖にかかわる何らかの作用により、肝実質細胞の増殖を促進させたと考えられる。そこで、この AsA による肝実質細胞増殖促進作用のより詳細な検討を行うため、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を検討した。なお、DNA 合成能は ^3H -thymidine の取り込み量を、細胞増殖は核数を指標として検討を行った。

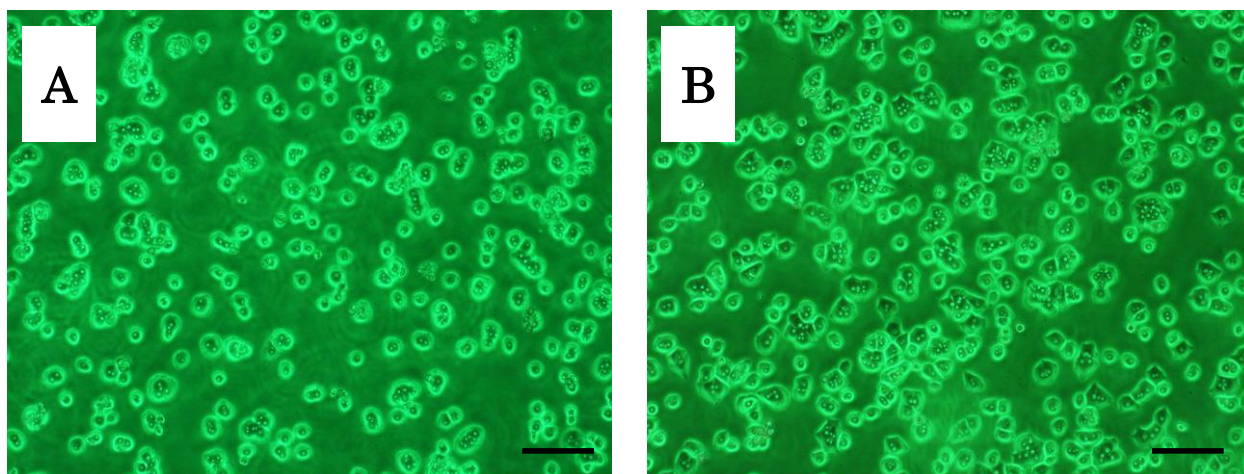


Fig.6 L-アスコルビン酸及びその誘導体の初代培養肝実質細胞に対する効果
(位相差顕微鏡像)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 4 時間
薬物処理 : A : control(medium), B : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M)
スケールバー : 100 μm

3-1-1. L-アスコルビン酸及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化

無血清培地に交換した肝実質細胞を、AsA 及びその誘導体で刺激したときの肝実質細胞の DNA 合成能及び核数の経時的変化について検討した。各々、結果を Fig.7 A (DNA 合成能)、Fig.7 B (核数計測) に示した。

AsA と AsA の安定型誘導体の L-アスコルビン酸 2 グルコシド (以下、AsA2G と略す) は、培養 2 時間から肝実質細胞の DNA 合成能を上昇させ始め、培養 2.5 時間で有意な増加を示し、その後も DNA 合成能は上昇し、培養 4 時間で最大となった。この反応は培養 21 時間後まで持続した。AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の DNA 合成能の最大反応は、control(medium)と比較して各々約 6 倍であった。一方、酸化型 AsA のデヒドロアスコルビン酸 (以下、DAsA と略す) は、若干の DNA 合成能を上昇させたが、有意な増加を得られるまでには至らなかった。また、AsA の光学異性体のイソアスコルビン酸 (以下、IsoAsA と略す) は DNA 合成能を上昇させる効果はほとんど認められなかった (Fig.7 A)。

核数計測の結果は、AsA 及び AsA2G は、DNA 合成能から遅れて、培養 2.5 時間から核数の増加が始まり、培養 3 時間で有意な増加が認められた。核数は培養 4 時間で最大となり、以後、培養 21 時間まで持続した。この AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の核数増加の最大反応は、control と比較して各々約 1.2 倍だった。DAsA は若干、核数を増加させたが、有意差を得るまでには至らなかった。また、IsoAsA は核数の増加はほとんど認められなかった (Fig.7 B)。

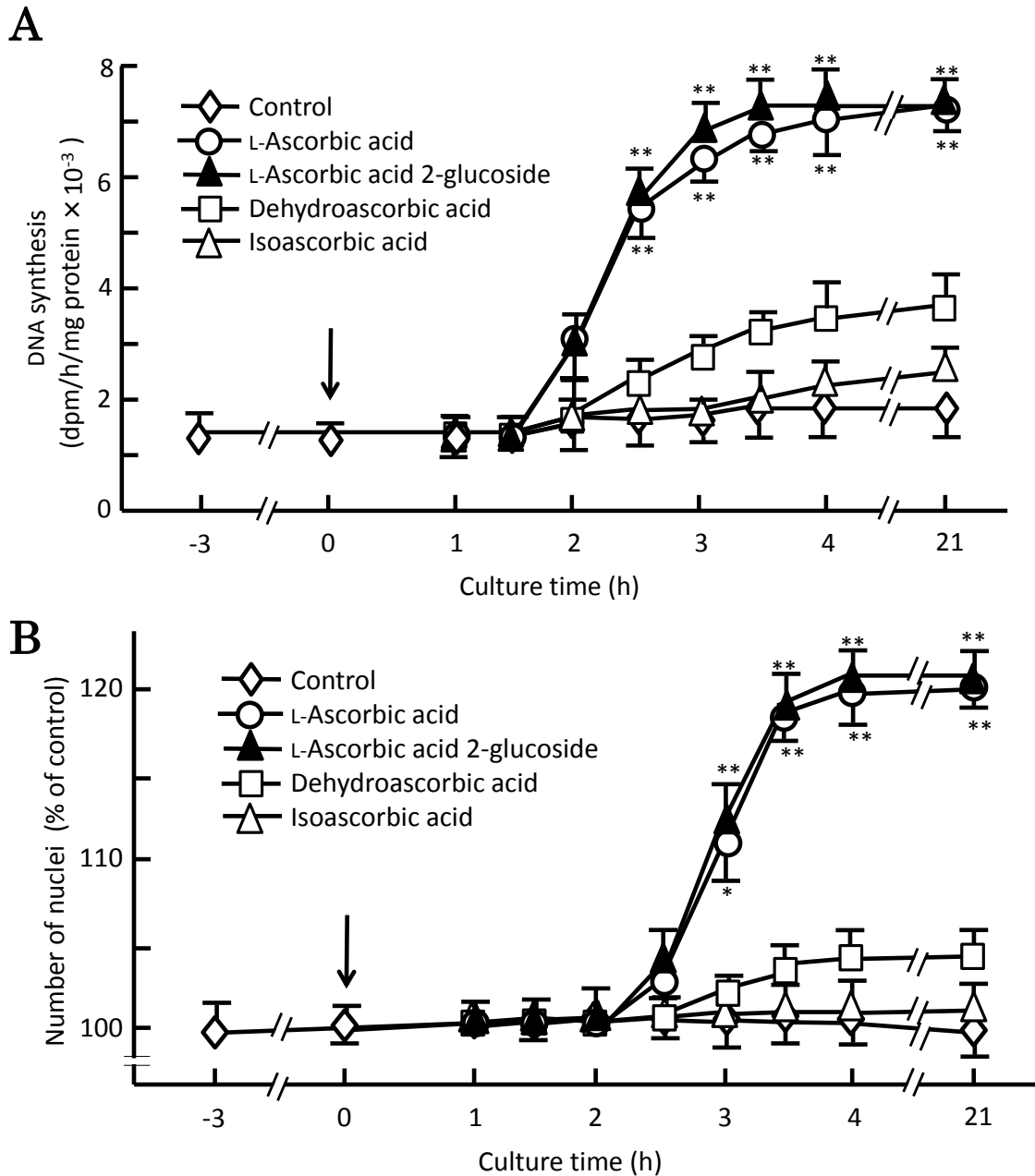


Fig.7 L-アスコルビン酸及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化

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 : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M),
Dehydroascorbic acid (3×10^{-6} M), Isoascorbic acid (3×10^{-6} M)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
有意差 : 各々 control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-1-2. L-アスコルビン酸及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係

次に AsA 及びその誘導体の肝実質細胞の DNA 合成能及び核数に対する用量-反応関係について検討を行った。Fig.7 の結果より、培養時間を最大反応が得られた 4 時間に設定し、AsA 及びその誘導体の様々な用量における DNA 合成能と核数の計測を行った。各々の結果を Fig.8 (A : DNA 合成能、B : 核数計測) に示した。

結果は、AsA(10^{-10} - 10^{-5} M)及び AsA2G(10^{-10} - 10^{-5} M)の添加群において、用量依存的に肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加が認められた。DNA 合成能の場合、AsA は 10^{-7} M で有意な上昇が認められ、 3×10^{-6} M で最大反応を得た。一方、AsA2G は、AsA よりも低用量で DNA 合成能を示し、最大反応を示した濃度は 10^{-6} M であった。AsA、AsA2G の 50%有効濃度(EC_{50})は、それぞれ 6.46×10^{-8} M と 3.34×10^{-8} M であり、AsA2G の効力は、AsA の約 2 倍であった(Fig.8 A)。核数計測の結果もほぼ同様な傾向が見受けられた(Fig.8 B)。

一方、DAsA は 10^{-6} M から 10^{-5} M において、弱い肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加が認められたが、有意差を得るには至らなかった。また、IsoAsA は 10^{-10} - 10^{-5} M において、ほとんど control レベルで効果は認められなかった(Fig.8)。

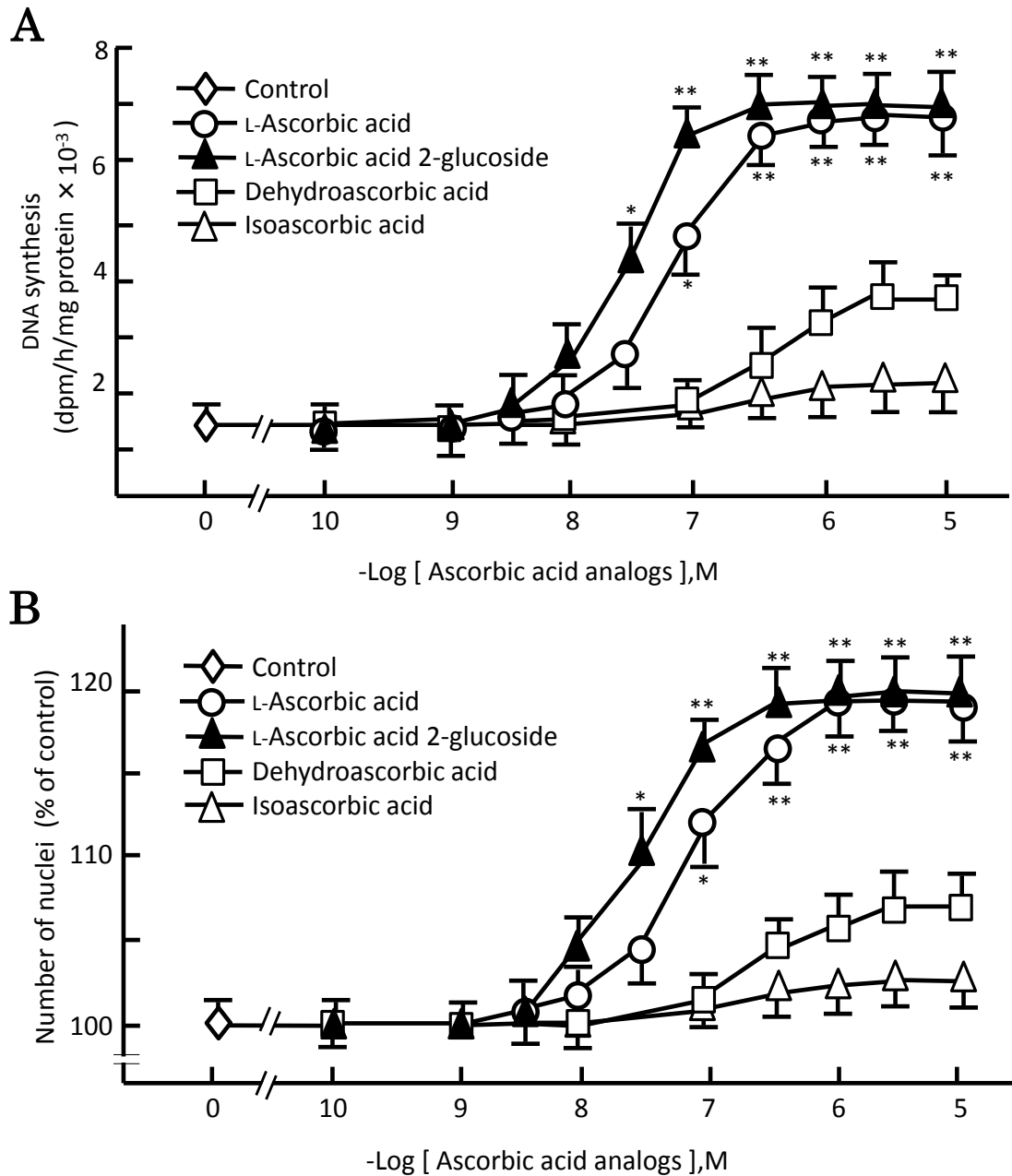


Fig.8 L-アスコルビン酸及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係

A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 4 時間
薬物処理 : L-Ascorbic acid(10^{-10} - 10^{-5} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-10} - 10^{-5} M),
Dehydroascorbic acid(10^{-10} - 10^{-5} M), Isoascorbic acid(10^{-10} - 10^{-5} M)
EC₅₀ 値 : L-Ascorbic acid(6.46×10^{-8} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(3.34×10^{-8} M)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
有意差 : 各々 control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2. L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドのラット初代培養肝実質細胞の増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討

Fig.7,8の結果より、AsA及びAsA2Gは、肝実質細胞に対して培養時間や用量に依存してDNA合成能及び細胞増殖を促進していることを見出した。次にAsA及びAsA2Gがどのような作用メカニズムによって、肝実質細胞の増殖を促進しているかを明確にするため、特異的シグナル伝達因子阻害薬や増殖因子受容体を中和するモノクローナル抗体などを併用し、より詳細な検討を行った。

3-2-1. 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

Fig.7の結果から、肝実質細胞のDNA合成能及び核数の上昇ピークがAsA($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)及びAsA2G(10^{-6} M)添加4時間後に認められた。そこで、培養(刺激)時間を4時間に固定し、特異的シグナル伝達因子阻害薬が、AsA及びAsA2Gにより誘発された肝実質細胞のDNA合成能及び核数にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

本実験では、受容体チロシンキナーゼ阻害薬のAG1478($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)⁴⁵⁾、PI3K阻害薬のLY294002(10^{-7} M)⁴⁶⁾、MAPキナーゼキナーゼ(MEK)阻害薬のPD98059(10^{-6} M)⁴⁷⁾、mTOR阻害薬のラパマイシン(10 ng/ml)^{48),49)}をそれぞれ使用した。これら特異的シグナル伝達因子阻害薬は、AsA($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)により誘発されたDNA合成能の上昇(Fig.9 A)及び核数の増加(Fig.9 B)を、ほぼcontrolレベルにまで抑制させた。AsA2G(10^{-6} M)も同様の傾向が認められた。なお、これら特異的シグナル伝達因子阻害薬単独では、肝実質細胞のDNA合成能及び細胞増殖に影響を示さなかった(Fig.9)。

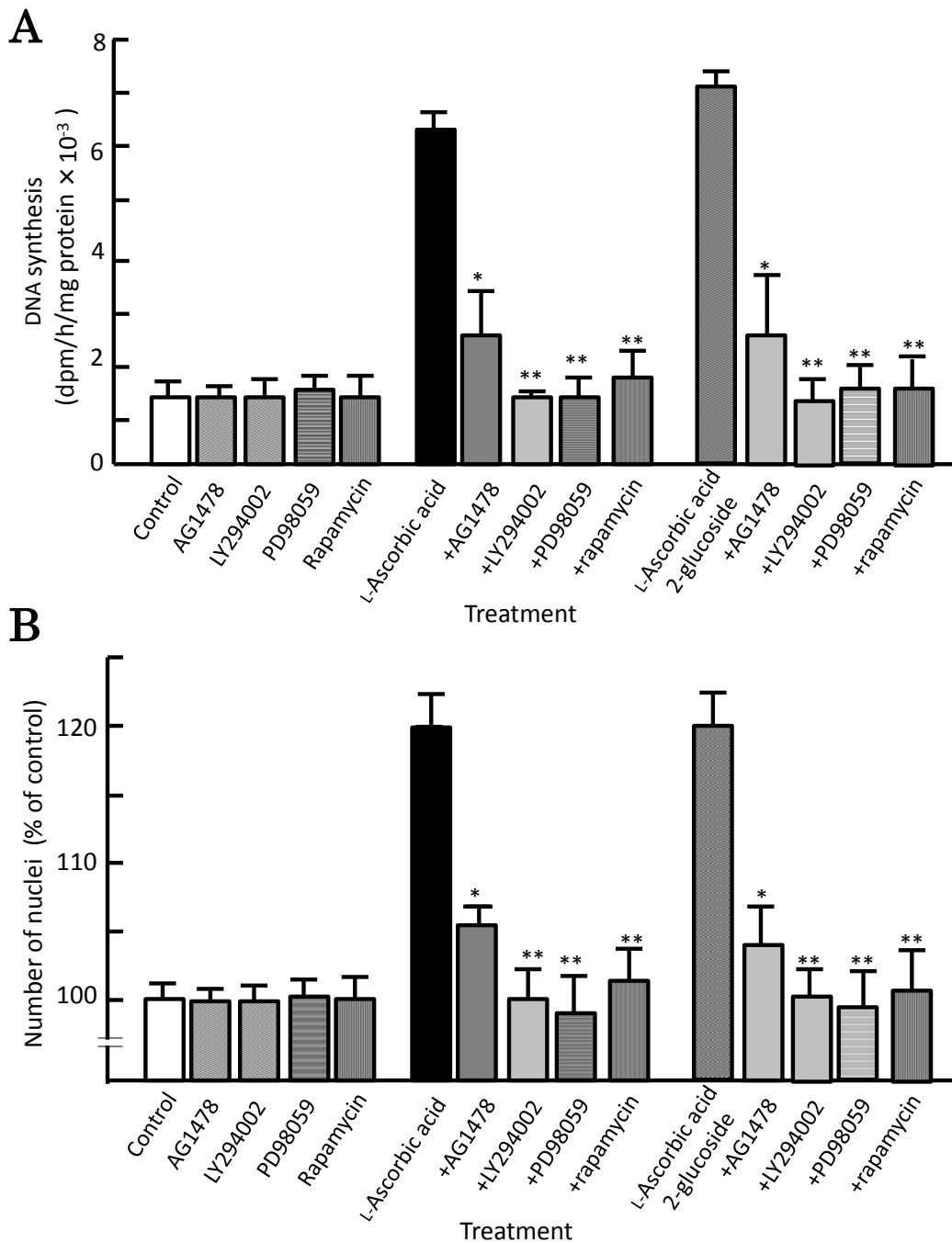


Fig.9 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸 2 グルコシドの肝実質細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : DNA 合成能

B : 核数 (細胞増殖)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

培養 (刺激) 時間 : 4 時間

薬物処理 : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M),
AG1478 (3×10^{-6} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M),
Rapamycin(10 ng/ml)

値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくはL-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2-2. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子 受容体モノクローナル抗体の効果

Fig.9 で示したように、AsA 及び AsA2G は、細胞増殖にかかわるいくつかの細胞内シグナル伝達因子を経由して、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を促進していることが分かった。しかしながら、AsA 及び AsA2G がどのような増殖因子受容体あるいは、サイトカイン受容体を刺激するのかは未知のままである。そこで、その可能性を探索するために、増殖因子受容体やサイトカイン受容体に対するモノクローナル抗体(以下、mAb と略す)を用いて、AsA 及び AsA2G がどの受容体を介して肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を促しているのかを検討した。本実験で用いたモノクローナル抗体は、mAb HGFR(100 ng/ml)、mAb EGFR(100 ng/ml)、mAb insulin R(100 ng/ml)、mAb IGF-I R(100 ng/ml)、mAb IGF-II R(100 ng/ml)、mAb TNFR1(100 ng/ml)である。

結果を Fig.10 に示した。mAb IGF-I R は、唯一、AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G (10^{-6} M)により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能の上昇(Fig.10 A)及び核数の増加(Fig.10 B)を、control レベルにまで抑制することを見出した。一方、mAb IGF-II R、mAb HGFR、mAb EGFR、mAb insulin R、mAb TNFR 1 は、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加に影響を及ぼさなかった。なお、これらモノクローナル抗体単独では、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖に影響を及ぼさなかった (Fig.10)。

〈各種モノクローナル抗体の略称〉

mAb HGFR: monoclonal antibody to HGF receptor

mAb EGFR: monoclonal antibody to EGF receptor

mAb insulin R: monoclonal antibody to insulin receptor

mAb IGF-I R: monoclonal antibody to IGF-I receptor

mAb IGF-II R: monoclonal antibody to IGF-II receptor

mAb TNFR1: monoclonal antibody to TNF receptor 1

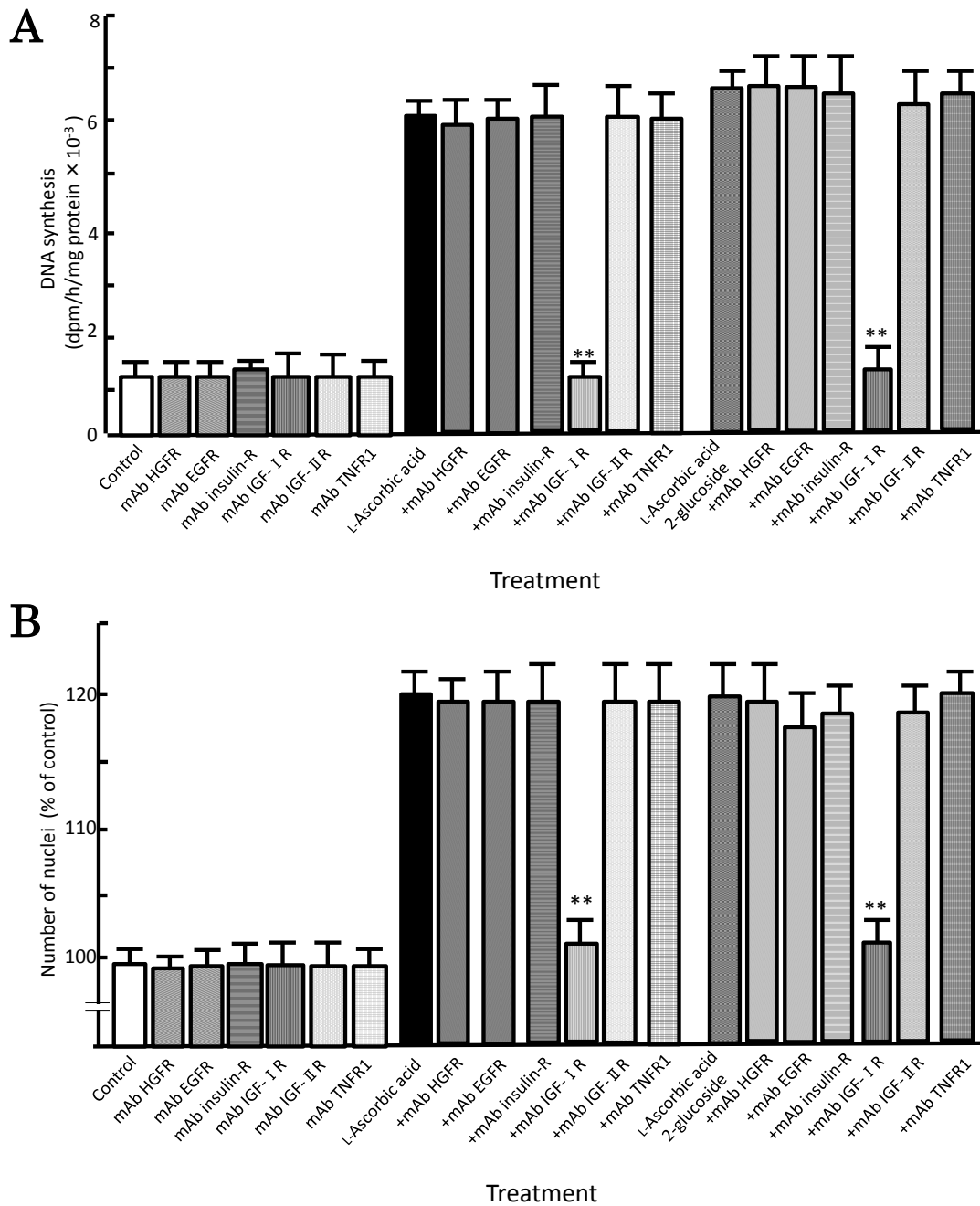


Fig.10 初代培養肝实质細胞におけるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子受容体モノクローナル抗体の効果

A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 4 時間
薬物処理 : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M),
mAb HGFR (100 ng/ml), mAb EGFR (100 ng/ml), mAb insulin-R (100 ng/ml),
mAb IGF-I R (100 ng/ml), mAb IGF-II R (100 ng/ml), mAb TNFR1 (100 ng/ml)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくはL-アスコルビン酸2グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2-3. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する抗 IGF-I 受容体モノクローナル抗体の用量-反応関係

次に初代培養肝実質細胞における AsA 及び AsA2G 誘発 DNA 合成能、細胞増殖促進作用に対する IGF-I 受容体モノクローナル抗体(1-100 ng/ml)の用量-反応関係を検討した。

結果を Fig.11 に示した。AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用は、mAb IGF-I 受容体の用量に依存して抑制された。このときの mAb IGF-I 受容体による 50%阻害濃度 (IC_{50}) は、AsA に対しては 25 ng/ml で、AsA2G に対しては 35 ng/ml だった。

一方、AsA 及び AsA2G が肝実質細胞中の IGF-I や TGF- α などのオートクリン因子の分泌を促進して DNA 合成能及び細胞増殖作用を促進している可能性も考えられた。そこで、同様の方法を用いて、IGF-I(1-100 ng/ml)や TGF- α (1-100 ng/ml)を中和するモノクローナル抗体(mAb IGF-I、mAb TGF- α)の用量-反応関係を検討した。

結果は、mAb IGF-I または mAb TGF- α は、共在下において、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能(Fig.11 A)、細胞増殖(Fig.11 B)に影響を及ぼさなかった。また、これらの抗体は、単独では、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖に影響を及ぼさなかった (Fig.11)。

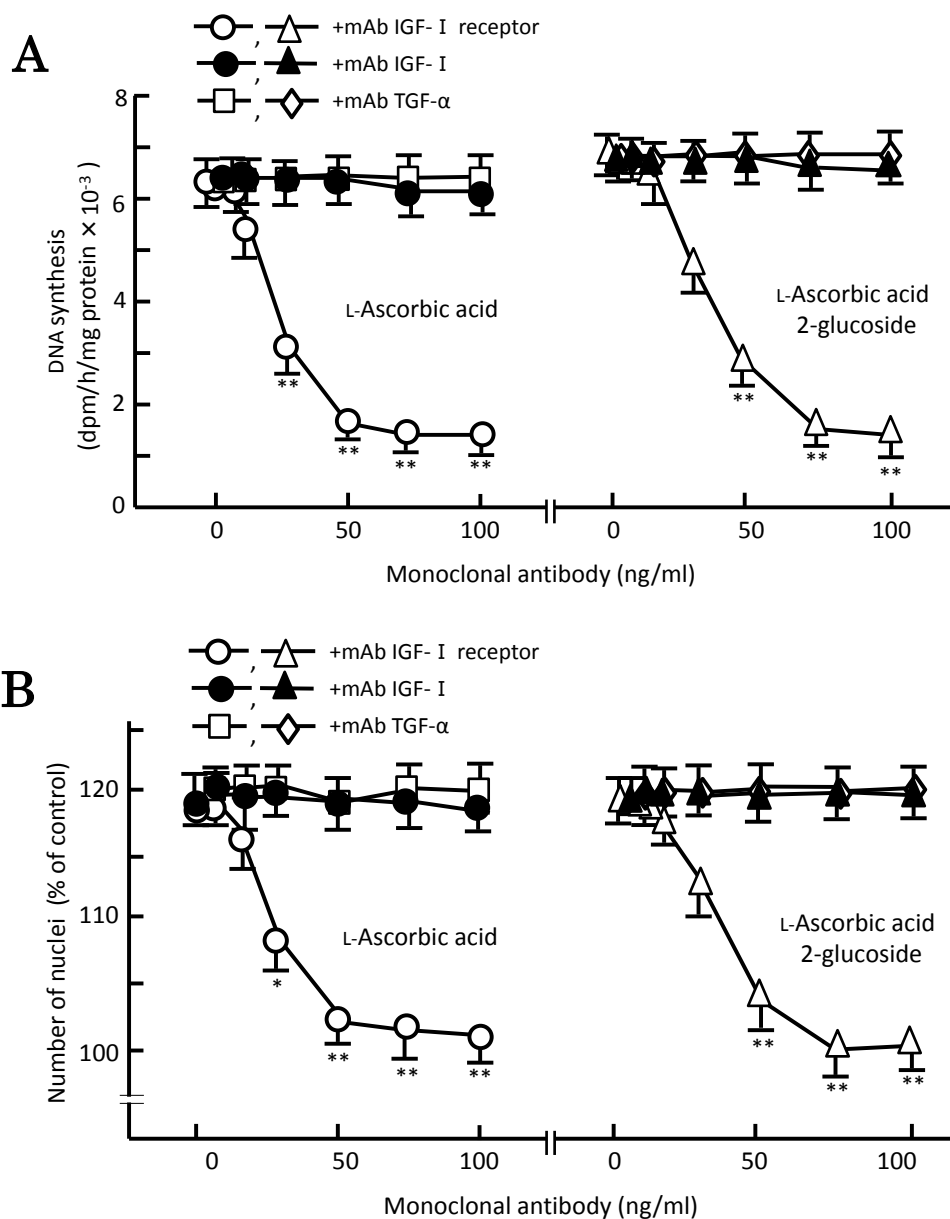


Fig.11 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する抗 IGF-I 受容体モノクローナル抗体の用量-反応関係

A : DNA 合成能 B : 核数 (細胞増殖)
 細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 4 時間
 薬物処理 : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M),
 mAb IGF-I R (0-100 ng/ml), mAb IGF-I (0-100 ng/ml), mAb TGF- α (0-100 ng/ml)
 IC₅₀ 値 : L-Ascorbic acid (25 ng/ml), L-Ascorbic acid 2-glucoside (35 ng/ml)
 値 : 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)
 有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群
 に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2-4. 初代培養肝実質細胞における 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 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性及び MAP キナーゼリン酸化活性に対する効果

Fig.10,11 の結果から、AsA 及び AsA2G は IGF-I 受容体を刺激し、受容体チロシンキナーゼ/MAP キナーゼ経路を介して、DNA 合成能を高め、肝実質細胞の増殖作用を促進していると考えられた。この結果をさらに検証するため、肝実質細胞の IGF-I 受容体チロシンキナーゼ (以下、IGF-I-RTK と略す) と MAP キナーゼ (以下、MAPK と略す) のリン酸化活性に対する AsA と AsA2G の効果を Western blot 解析法を用いて直接測定した。

3-2-4-1. 初代培養肝実質細胞における 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 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性及び MAP キナーゼリン酸化活性の経時的変化

肝実質細胞を無血清培地に交換後、AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加し、一定時間培養し、肝実質細胞の IGF-I-RTK リン酸化活性及び MAPK リン酸化活性を測定した。IGF-I-RTK(P-p95-kDa)リン酸化活性は、AsA(3×10^{-6} M)や AsA2G(10^{-6} M)添加 3 分後(培養 3 分)に一過性の上昇ピークが認められ、その活性比は、control と比較して、各々約 3 倍だった(Fig.12)。

一方、MAPK の場合、ERK1(p44 kDa)と ERK2(p42 kDa)の 2 つのアイソフォームが知られているが、AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)刺激により、肝実質細胞において ERK2 のみにリン酸化が認められ、ERK1 のリン酸化は認められなかった。その活性のピークは、IGF-I-RTK のリン酸化から少し遅れて、AsA 及び AsA2G 添加 5 分後(培養 5 分)に認められ、その活性比は control と比較して各々約 3 倍だった(Fig.13)。

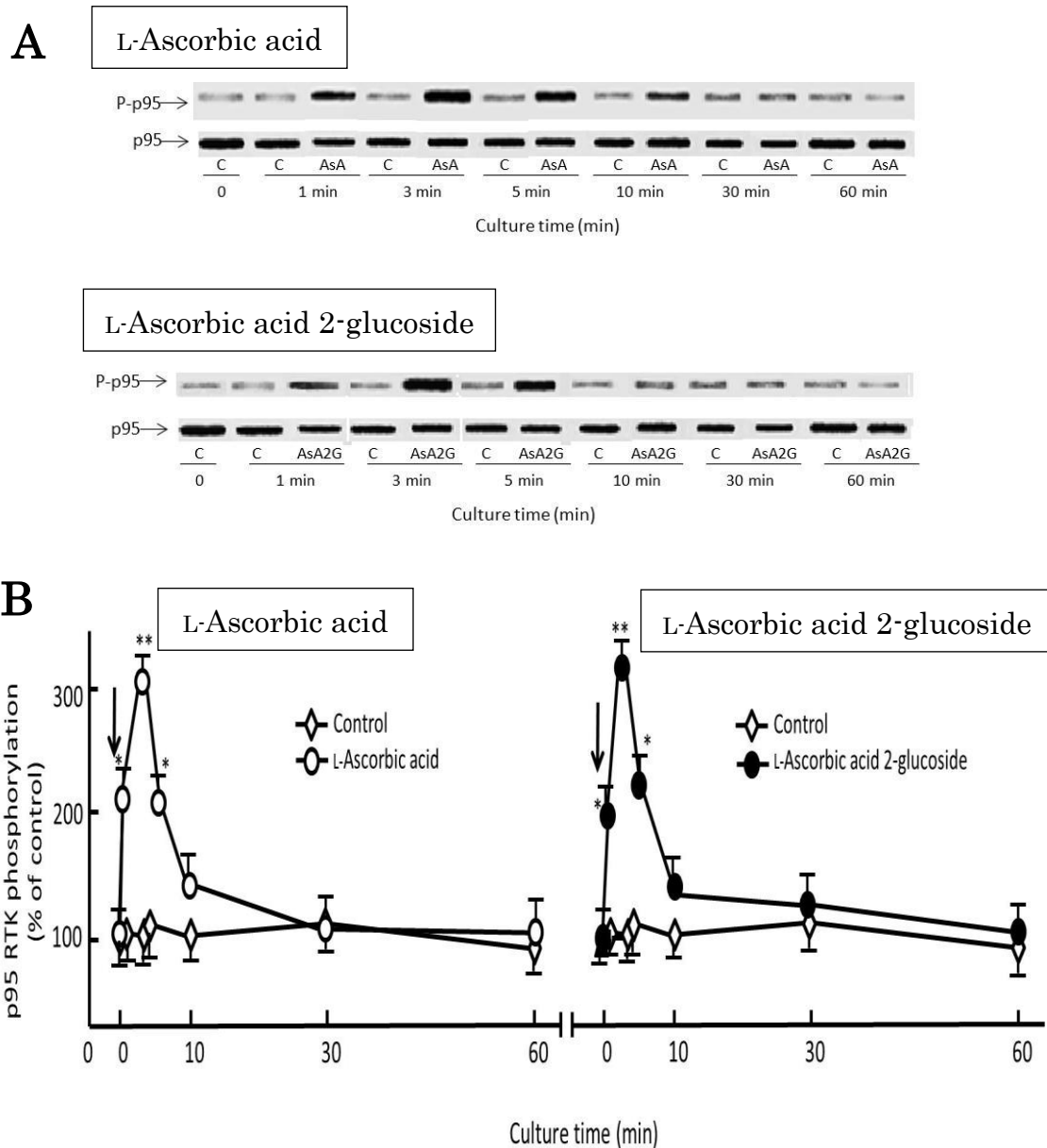


Fig.12 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシドによる IGF-I 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性に対する経時的変化

A : Western blotting band B : p95 IGF-I-RTK リン酸化活性
 細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
 薬物処理 : C : Control(medium), AsA : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M),
 AsA2G : L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M)
 値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
 有意差 : 各々control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

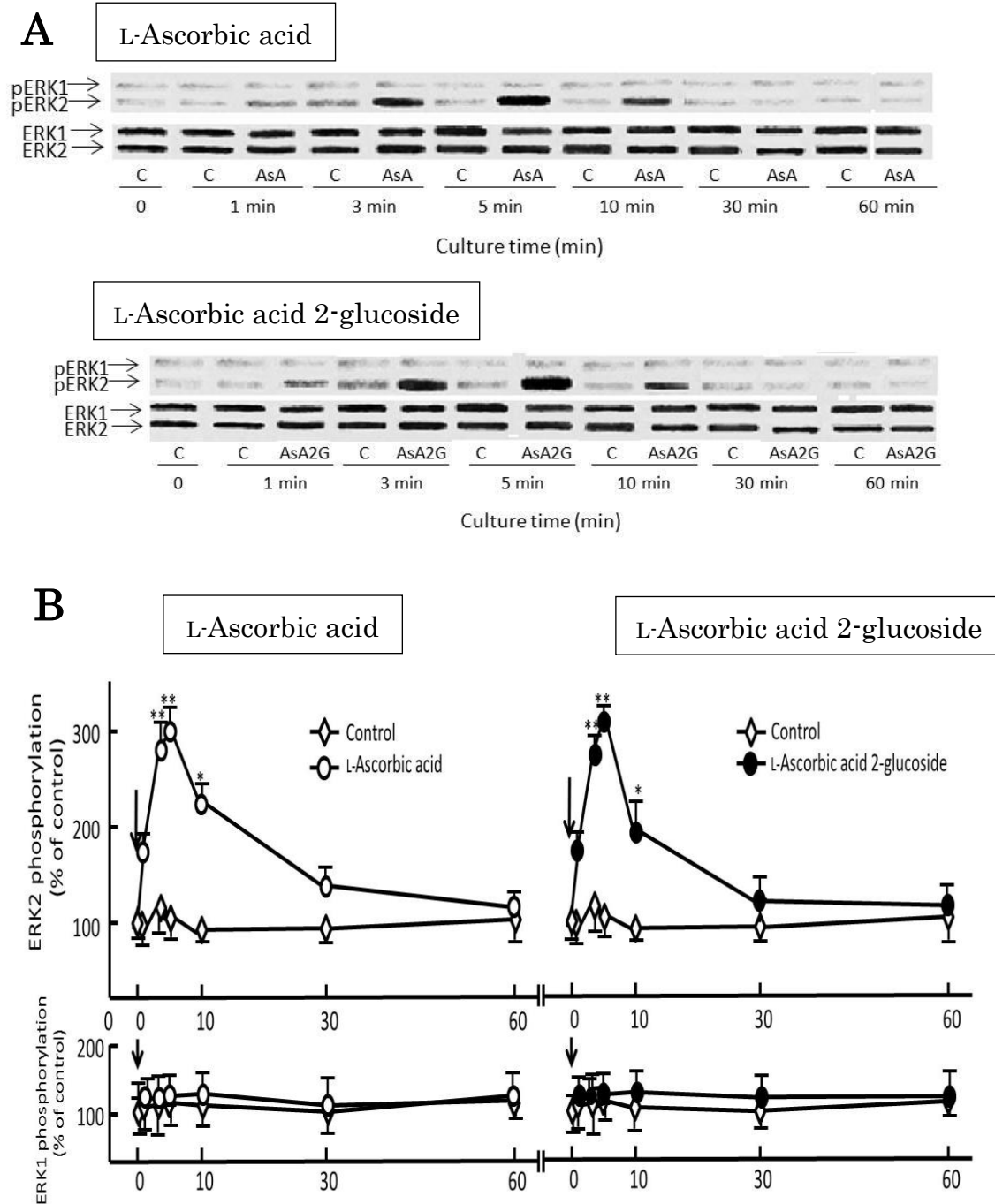


Fig.13 初代培養肝実質細胞におけるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸 2 グルコシドによる MAP キナーゼリン酸化活性の経時的変化

A : Western blotting band B : MAP キナーゼ(ERK1/2)リン酸化活性
 細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
 薬物処理 : C : Control(medium), AsA : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M),
 AsA2G : L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M)
 値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
 有意差 : 各々control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2-4-2. 初代培養肝実質細胞におけるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性及び 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

Fig.12 の結果から、肝実質細胞において、IGF-I-RTK リン酸化活性は、AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M) 添加 3 分後に最大反応が認められた。そこで、培養時間（刺激時間）を 3 分に固定し、特異的シグナル伝達因子阻害薬が、AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

その結果を Fig.14 に示した。AG1478 (3×10^{-6} M) や特異的 IGF-I RTK 阻害薬の AG538(10^{-7} M)⁵⁰⁾は、それぞれ AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の IGF-I-RTK リン酸化活性を、control レベルにまで抑制した。一方、LY294002(10^{-7} M) 、PD98059(10^{-6} M)及びラパマイシン(10 ng/ml)は、それぞれ AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった (Fig.14)。

一方、MAPK リン酸化活性の場合、最大反応が AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)添加 5 分後に認められ、そのリン酸化は ERK2 のみに認められた。そこで、培養時間（刺激時間）を 5 分に固定し、特異的シグナル伝達因子阻害薬が、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性にどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果を Fig.15 に示した。AG1478 (3×10^{-6} M)、LY294002(10^{-7} M) 、AG538(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M) は、それぞれ AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性を、control レベルにまで抑制した。一方、ラパマイシン(10 ng/ml)は、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性に影響を及ぼさなかった (Fig.15)。

なお、これら特異的シグナル伝達因子単独では、RTK や MAPK (ERK1、ERK2) のリン酸化には影響を及ぼさなかった(Fig.14,15)。

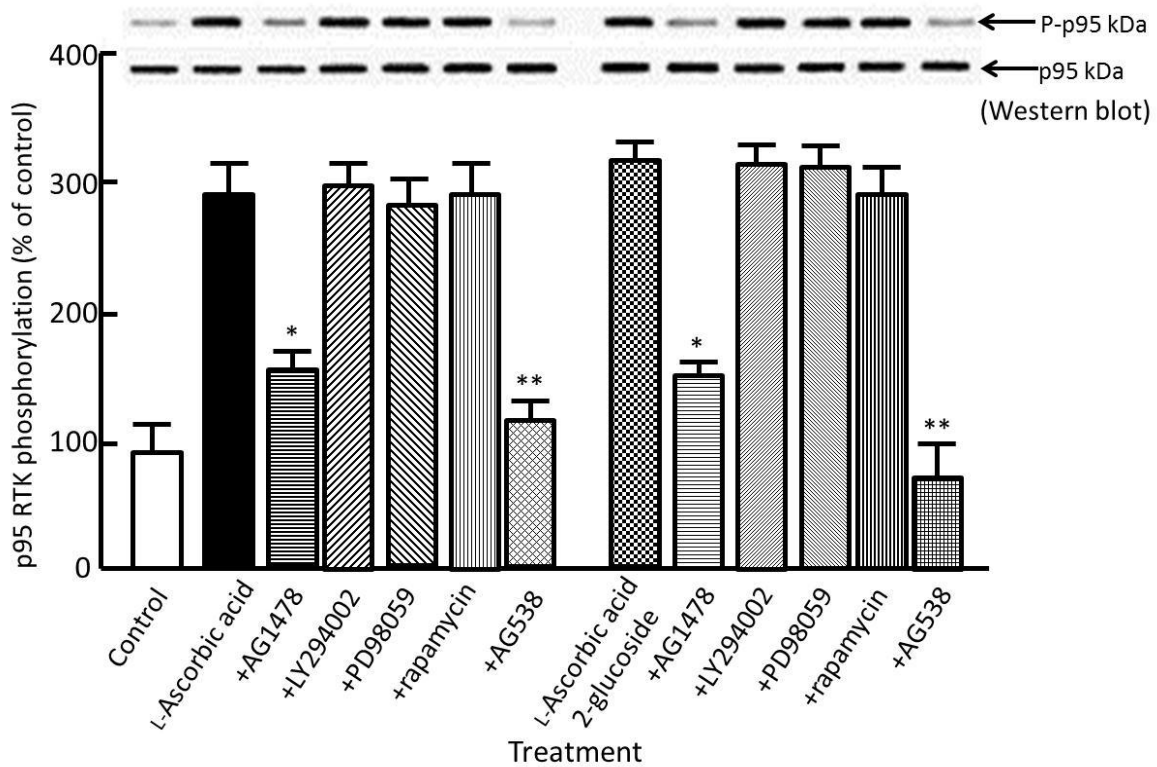


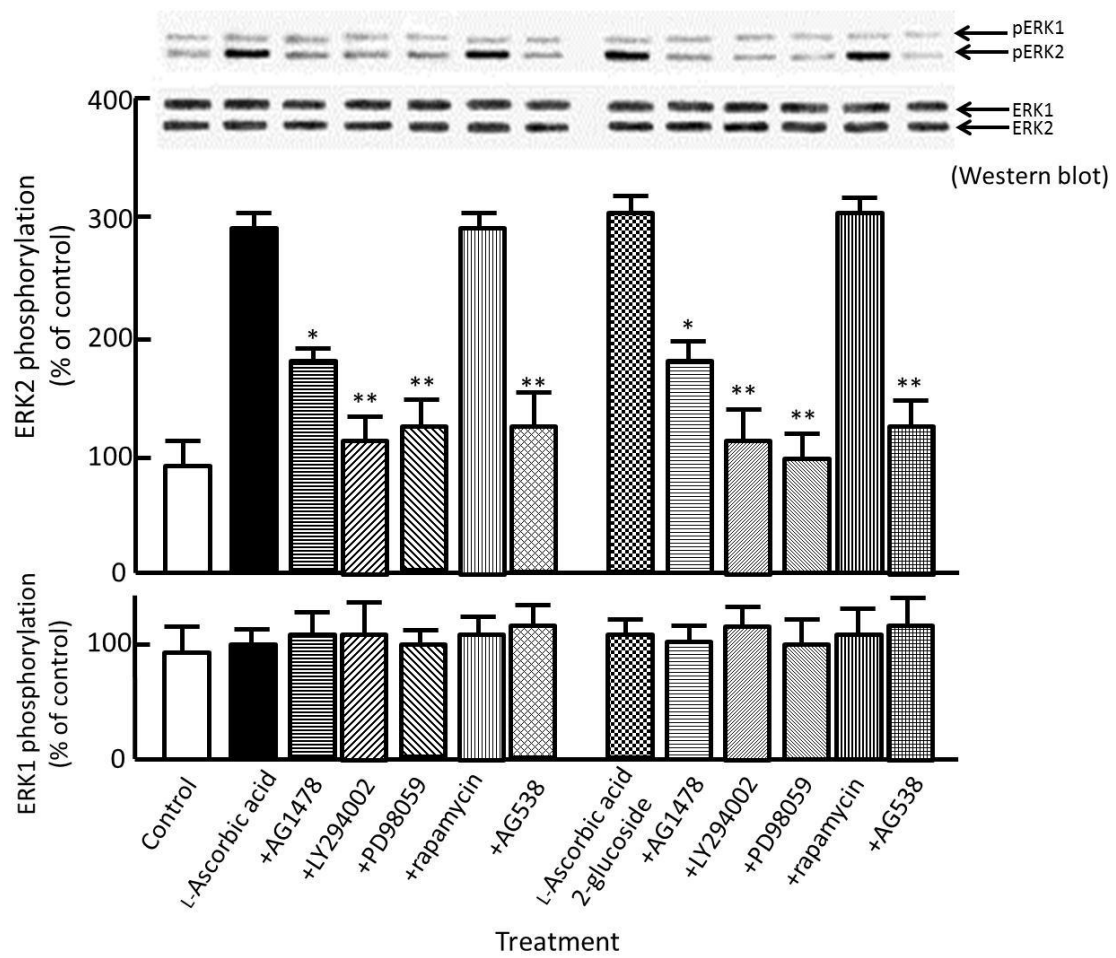
Fig.14 初代培養肝实质細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養（刺激）時間：3 分間

薬物処理： L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M), AG1478 (3×10^{-6} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M), Rapamycin(10 ng/ml), AG538(10^{-7} M)

値： 平均値±標準誤差 (n=3)

有意差： L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)



細胞密度：
藥物處理：

值：
有意差：

3-3. 初代培養肝実質細胞の IGF-I 受容体に対する^[125I]-IGF-I と L-アスコルビン酸及びその誘導体の結合性に関する検討

3-3-1. 初代培養肝実質細胞における^[125I]-IGF-I の IGF-I 受容体に対する結合実験

初代培養肝実質細胞の IGF-I 受容体の発現を確認するため、IGF-I の結合性を検討した。Caro らの方法⁴⁴⁾に従い、初代培養肝実質細胞における IGF-I 受容体結合試験を行った。Fig.16 に示したように、肝実質細胞の特異的な IGF-I の結合性は、0-50 pM の間で、^[125I]-IGF-I の用量に依存して増加したが、75 pM 以上から、ほぼ横ばいとなる飽和曲線になった。下記の式により、Scatchard plot を作成し、親和性を検討したところ、解離定数 (K_d) は 0.35 nM、最大結合量 (B_{max}) は 52.4 fmol/ 3.3×10^5 cells であり、1 つの結合部位を示した (Fig.16 A の挿入図)。

$$\frac{[\text{bound}]}{[\text{free}]} = -\frac{1}{K_d} [\text{bound}] + \frac{[\text{receptor}]_t}{K_d}$$

[bound] : IGF-I 受容体に結合している^[125I]-IGF-I 濃度

[free] : IGF-I 受容体に結合していない^[125I]-IGF-I 濃度

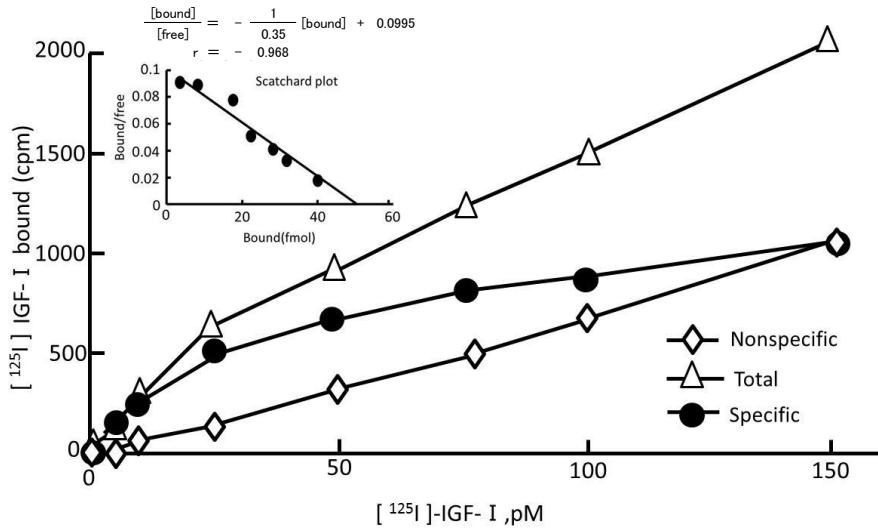
[receptor]_t : 総 IGF-I 受容体濃度

K_d : 解離定数

3-3-2. 初代培養肝実質細胞における IGF-I 受容体への IGF-I 結合に関する L-アスコルビン酸及びその誘導体による競合阻害実験

次に AsA 及びその誘導体が IGF-I 受容体に対して直接結合するか否かについて、AsA 及びその誘導体と^[125I]-IGF-I との競合阻害実験を行い、検討した。肝実質細胞を無血清培地に交換後、50 pM の^[125I]-IGF-I 存在下において、IGF-I、各種濃度の AsA または AsA 誘導体を添加し、インキュベーションし、競合阻害実験を行った。結果を Fig.17 に示した。IGF-I が最も低用量で^[125I]-IGF-I に対

して競合阻害を示し、次いで、AsA2G、AsA という順になり、50%阻害濃度 (IC₅₀) は各々、 4.3×10^{-10} M、 5.4×10^{-8} M、 1.8×10^{-7} M となった。一方、DAsA、IsoAsA



は IGF-I 受容体に非常に低い親和性を示した (Fig.17)。

Fig.16 初代培養肝实质細胞における $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ の IGF-I 受容体に対する結合実験

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²

Nonspecific : 100 nM 非標識 IGF-I 存在下における $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ の γ 線量

Total : 100 nM 非標識 IGF-I 非存在下における $[^{125}\text{I}]\text{-IGF-I}$ の γ 線量

Specific : (Total binding) - (Nonspecific binding)

値 : 平均値 (n=2)

挿入図 : Scatchard plot (K_d : 0.35 nM, B_{max} : 52.4 fmol)

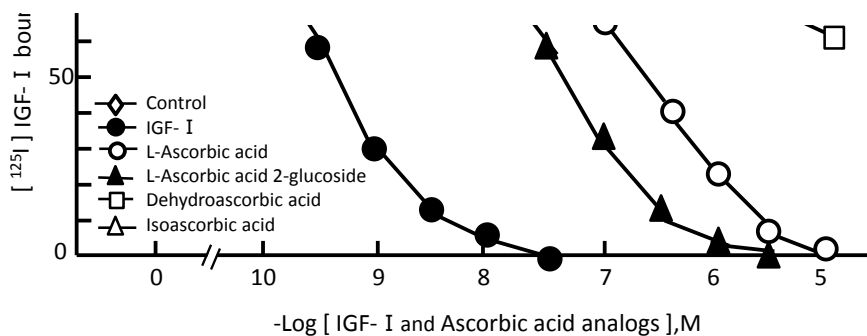


Fig.17 初代培養肝实质細胞における IGF-I 受容体への IGF-I 結合に関する L-アスコルビン酸及びその誘導体による競合阻害実験

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理： L-Ascorbic acid(10^{-10} - 10^{-5} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-10} - 10^{-5} M),
Dehydroascorbic acid(10^{-10} - 10^{-5} M), Isoascorbic acid(10^{-10} - 10^{-5} M),
IGF-I(10^{-10} - 10^{-5} M)

IC₅₀ 値： L-Ascorbic acid(1.8×10^{-7} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(5.4×10^{-8} M),
IGF-I(4.3×10^{-10} M)

値： 平均値 (n=2)

4. 考 察

4-1. L-アスコルビン酸及びその誘導体の初代培養肝実質細胞増殖促進作用

本研究では、*in vitro* 実験系の肝再生モデルとして、成熟ラット初代培養肝実質細胞を用い、AsA 及びその誘導体の肝細胞増殖促進作用について検討した。

Fig.6 の顕微鏡写真から、AsA(3×10^{-6} M)添加により、肝実質細胞数の増加が見受けられた。これは、AsA の何らかの作用により、肝実質細胞の増殖が促進されたと考えられる。この AsA による肝実質細胞増殖促進作用のより詳細な検討を行うため、DNA 合成能及び細胞増殖促進作用の検討を行った。なお、DNA 合成能は³H]-thymidine の取り込み量を、細胞増殖促進作用は核数を指標として検討を行った。

AsA 及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化(Fig.7)において、AsA(3×10^{-6} M)とその安定型誘導体である AsA2G(10^{-6} M)は、培養時間に依存して肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加作用を発現することを見出した。また、その DNA 合成能の上昇と核数の増加との間に 30 分程度の time lag が存在した。これは、本培養条件下において、AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の増殖の場合、DNA 合成期である S 期から、G₂ 期、M 期を経て、実際に肝実質細胞が分裂・増殖するまでに要する時間が、およそ 30 分程度であると考えられる。

更に、AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用の最大反応が培養 4 時間後に認められており、これは、従来報告されていた時間経過（培養時間）よりも早期に起こった。また、この早期の細胞増殖促進作用は EGF や HGF などの増殖因子でも同様の結果が得られている^{39),51)}。

この原因の 1 つに、細胞密度が考えられる。Nakamura らによると、EGF 及びインスリンによる肝実質細胞の DNA 合成能において、subconfluent と高い細胞密度条件下(10^5 cells/cm²)では、およそ培養 40 時間以上経過しないと、DNA 合成能が上昇しないのに対し、 2.5×10^4 cells/cm² と比較的低い細胞密度条件下では、およそ培養 5 時間で DNA 合成能が上昇し始めたと報告している³⁶⁾。つまり、肝実質細胞は、細胞密度の低下に伴い増殖因子の DNA 合成の応答が早まる傾向があり、本研究のように 3.3×10^4 cells/cm² と低い細胞密度条件下では、DNA 合成能及び細胞増殖促進作用が早期に起こったと考えられる。

また、AsA 及び AsA2G による肝細胞増殖促進作用が早期に認められたもう 1 つの原因として、培地に含まれるデキサメタゾン(dexamethasone : Dex と略す)の濃度の影響が考えられる。初代培養肝実質細胞において、Dex は、その用量(10^{-10} - 10^{-7} M)に依存して、HGF により誘発された DNA 合成能の上昇及び核数の増加を抑制することが認められている⁵¹⁾。従来、肝実質細胞の初代培養では、Dex を 10^{-6} M 程度使用したため、肝実質細胞の増殖が遅れたと考えられる。一方、本研究の実験条件は、Dex を 10^{-10} M と低用量に設定しているため、DNA 合成能及び細胞増殖促進作用が早期に起こったと考えられる。これら上記の 2 つの要因により、AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用が早期に現れたと考えられる。

AsA 及びその誘導体による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係(Fig.8)では、AsA(10^{-10} - 10^{-5} M)及び AsA2G(10^{-10} - 10^{-5} M)の用量に依存して、肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加が認められた。AsA による細胞増殖促進作用及び抑制作用は、低用量(10^{-5} - 10^{-6} M)で増殖促進作用が、高用量($\geq 10^{-3}$ M)で増殖抑制作用が認められる傾向がある^{31),33),35)}。本研究では、AsA は 3×10^{-6} M、AsA2G は 10^{-6} M と比較的 low 用量で肝実質細胞増殖促進作用を示しており、他の細胞を用いた報告と同様な傾向を示す結果が認められた。

また、AsA と AsA2G との比較では、AsA2G の方が、より低用量で細胞増殖促進反応を示しており、肝実質細胞の DNA 合成能における 50%有効濃度(EC₅₀)は、AsA が 6.46×10^{-8} M であるのに対し、AsA2G は 3.34×10^{-8} M とその効力比は約 2 倍であった。これは、AsA よりも AsA2G の方が安定性が高いためと考えられる。このような傾向は、他の細胞を用いた研究でも認められており、Shibayama らは、ヒトの皮膚の線維芽細胞において、AsA 及び VCP-IS-Na(安

定型 AsA 誘導体)の細胞増殖促進作用を比較した場合、AsA よりも VCP-IS-Na の方がより低用量で増殖促進作用を示したと報告している³¹⁾。

一方、AsA の光学異性体であり、抗酸化作用をもつ IsoAsA は、肝実質細胞の DNA 合成能及び核数に変化を示さなかった。同じ検討を抗酸化作用を有するビタミンであるビタミン E ((+)α-tocopherol ; 10^{-8} - 10^{-5} M) やビタミン K₁ (phylloquinone ; 10^{-8} - 10^{-5} M) のような脂溶性ビタミンについても行ったが、これらは、肝実質細胞の DNA 合成能及び核数に影響を及ぼさなかった(data not shown)。これらの結果から、AsA 及び AsA2G の肝実質細胞 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用は、抗酸化作用によるものではないと考えられる。

4-2. 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の細胞内シグナル伝達機構

AsA 及び AsA2G がどのようなシグナル伝達機構により、肝実質細胞の DNA 合成や細胞増殖作用を促進したかを明確にするため、特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いて検討した。細胞増殖に関連する細胞内シグナル伝達因子の特異的阻害薬を併用する実験は、何らかの増殖因子やサイトカインにより引き起こされた DNA 合成能及び細胞増殖がどのようなタンパク質 (シグナル伝達因子) を介して促進されているかを調査する上で有用な方法である^{39),42),51)}。Fig.9 において明らかになったように、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加は、AG1478 (RTK 阻害薬)、LY294002 (PI3K 阻害薬)、PD98059 (MEK 阻害薬)、ラパマイシン (mTOR 阻害薬) により著しく抑制された。これらの結果は、少なくとも AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖促進作用が、それぞれの阻害薬の標的分子である受容体チロシンキナーゼ、PI3K、MEK、mTOR を介していることが考えられる。

上記の考察から、AsA 及び AsA2G は、肝実質細胞膜上の何らかのチロシンキナーゼ内蔵型増殖因子受容体あるいはサイトカイン受容体を介して DNA 合成能及び細胞増殖を促していると推察することができた。そこで、各々増殖因子受容体及びサイトカイン受容体を中和するモノクローナル抗体を用い、これら

が、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進にどのような影響を及ぼすのか検討した。Fig.10 に示したように、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加は、抗 IGF-I 受容体モノクローナル抗体を併用した時にのみ、著しく抑制されたことから、AsA 及び AsA2G は、IGF-I 受容体を介して肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖を促進している可能性が示唆された。一方、抗 IGF-II 受容体モノクローナル抗体は、AsA や AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加には影響を及ぼさなかった。このことから、AsA や AsA2G は、選択的に IGF-I 受容体を刺激していることが考えられた。その他、insulin 受容体、EGF 受容体、HGF 受容体、TNF 受容体-1 に対するモノクローナル抗体の併用実験でも、AsA、AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能の上昇及び核数の増加には影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、AsA 及び AsA2G による肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用には、IGF-I 受容体が関与していることが示唆された。しかし、AsA 及び AsA2G が、細胞増殖に関与するオートクリン因子の分泌を促進している可能性も否定できなかった。実際、肝細胞には、IGF-I や TGF- α がオートクリン因子として貯蔵されており³⁾、これらは何らかの刺激により、分泌され、肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を促進する非常に強力な増殖因子である^{6),52)~54)}。そこで、その可能性を探るため、IGF-I や TGF- α を中和するモノクローナル抗体を用いて、これらが、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進にどのような影響を及ぼすのか検討した。その結果は、Fig.11 に示したように、IGF-I や TGF- α に対するモノクローナル抗体は、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖促進作用には影響を及ぼさなかった。Fig.10 と Fig.11 の結果を総合的に解釈すると、AsA 及び AsA2G は、ラット肝実質細胞の IGF-I 受容体を直接刺激することにより、DNA 合成能を上昇させ、細胞増殖を促進していることが考えられた。

IGF-I は、約 7.5 kDa の単鎖のポリペプチドで、構造的にインスリンと相同性が高い⁵⁵⁾。血漿中では、約 20-80 nM 程度存在し、IGF 結合タンパク質 (insulin-like growth factor binding protein : IGFBP) と結合して血液中を循環している。大部分は肝臓で生合成され、ホルモンやオートクリン/パラクリン

の様式にて作用するといわれている⁵⁶⁾。IGF-Iの主な働きは細胞増殖促進作用やアポトーシス抑制作用などであり、胎児の成長に大きな役割を果たしているといわれている⁵⁷⁾。IGF-IをリガンドとするIGF-I受容体は、EGF受容体やHGF受容体のようなチロシンキナーゼ内蔵型の受容体であり、インスリン受容体と高い相同性(84%)をもつ。この受容体は、Fig.18のように135 kDaの α サブユニットと90 kDaの β サブユニットがS-S結合したヘテロ四量体を形成している。また、 α サブユニットには、システイン残基に富む領域(システインリッチドメイン)、 β サブユニットの細胞内部には、チロシンキナーゼドメインがそれぞれ存在する。リガンドがIGF受容体に結合すると、 β サブユニットに存在するチロシンキナーゼドメインが自己リン酸化され、細胞内に様々なシグナルを伝達すると考えられている^{56),58)}。

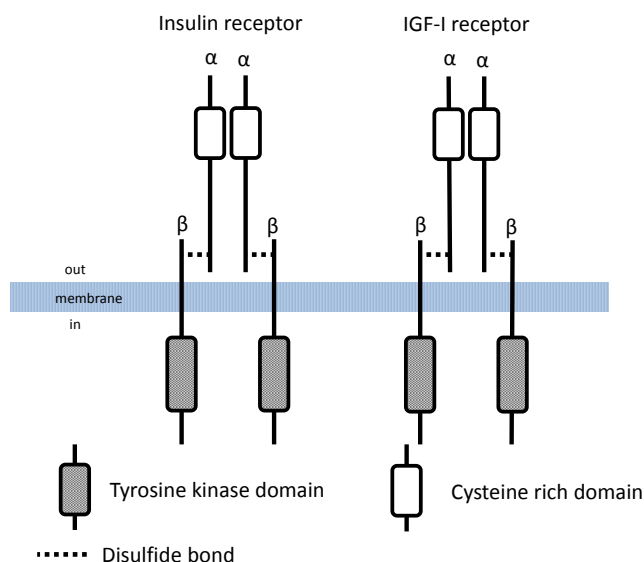


Fig.18 インスリン受容体及びIGF-I受容体の構造⁵⁶⁾

そのシグナル伝達経路の一つにMAPキナーゼ経路が存在する。IGF-I受容体のチロシンキナーゼ領域が活性化されると、アダプタータンパク質である低分子Gタンパク質(Ras)を介してRaf(MAPキナーゼキナーゼキナーゼ)が活性化される。更に、Raf→MAPキナーゼキナーゼ(MAPK/ERK kinase:MEK)→MAPキナーゼ(extracellular signal-regulated kinase:ERK)と順に活性化され、活性化されたERKが遺伝子の発現などを調節し、細胞増殖を促しているといわれている^{59)~61)}。また、IGF-I受容体の活性化は、インスリン受容体基質

1 (insulin receptor substrate-1 : IRS-1) を介して、アポトーシス抑制に関与する PI3K/Akt 経路を活性化させるといわれている^{60~63}。

Fig.6~11 より、AsA 及び AsA2G は、肝実質細胞の IGF-I 受容体に結合し、MAP キナーゼ経路を介して肝実質細胞の DNA 合成能及び細胞増殖を促しているものと考えられる。そこで、Western blot 解析法を用いて、IGF-I 受容体に存在する RTK (IGF-I-RTK) と MAP キナーゼ (ERK1/2) のリン酸化活性を直接測定し、AsA と AsA2G の効果を検討した。

無血清培地に交換した初代培養肝実質細胞に、AsA(3.3×10^{-6} M) 及び AsA2G(10^{-6} M) を添加し、一定時間培養 (刺激) し、肝実質細胞の IGF-I-RTK リン酸化活性及び MAP キナーゼリン酸化活性を測定した。IGF-I-RTK リン酸化活性は、AsA(3.3×10^{-6} M) 及び AsA2G(10^{-6} M) 添加 3 分後に一過性の上昇ピークが認められた (Fig.12)。一方、MAPK (ERK1/2) リン酸化活性は、AsA(3.3×10^{-6} M) 及び AsA2G(10^{-6} M) 添加後、ERK2 のみリン酸化が認められ、ERK1 のリン酸化は認められなかった。ERK2 リン酸化活性は、AsA 及び AsA2G 添加 5 分後に一過性の上昇ピークが認められた (Fig.13)。IGF-I-RTK リン酸化活性と ERK2 リン酸化活性のピークの間にある time lag は、IGF-I-RTK の下流に ERK2 が存在していることを意味し、AsA 及び AsA2G により IGF-I-RTK が活性化 (リン酸化) され、その活性化に伴い ERK2 が活性化したものと考えられる。また、AsA 及び AsA2G 添加により、肝実質細胞の ERK2 のみにリン酸化が認められ、ERK1 にリン酸化が認められなかった現象は、部分肝切除動物を用いた *in vivo* 実験系などでも報告されていることから、肝実質細胞の増殖には ERK1 は関与しないと考えられる^{64,65}。

以後の実験では、培養時間 (刺激時間) を IGF-I-RTK リン酸化活性は 3 分、MAPK 活性は 5 分に固定し、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の IGF-I-RTK リン酸化活性と MAPK 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。

AsA(3.3×10^{-6} M) 及び AsA2G(10^{-6} M) により誘発された IGF-I-RTK リン酸化活性は、AG1478 (RTK 阻害薬) と AG538 (特異的 IGF-I 受容体 RTK 阻害薬) により、抑制され、その抑制作用は AG538 の方が強く現れた (Fig.14)。これは、AsA 及び AsA2G が、特異的に IGF-I 受容体に結合し、IGF-I 受容体の RTK をリン酸化しているため、AG1478 よりも AG538 の方が AsA 及び AsA2G 誘発 RTK リン酸化活性を抑制したと考えられる。その他、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能及び核数計測を抑制した LY294002 (PI3K 阻害薬)、PD98059 (MEK 阻害薬)、ラパマイシン (mTOR 阻害薬) は、RTK 活性に影響を及ぼさなかった (Fig.14)。これにより、PI3K、MEK、mTOR は、IGF-I-RTK の下流に存在していると考えられる。

一方、AsA(3.3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)により誘発された ERK2 リン酸化活性は、IGF-I-RTK リン酸化活性と同様に、AG1478 (RTK 阻害薬)と AG538 (特異的 IGF-I 受容体 RTK 阻害薬)により、抑制され、その抑制作用は AG538の方が強く現れた(Fig.15)。しかし、LY294002 (PI3K 阻害薬)、PD98059 (MEK 阻害薬)は、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化活性の抑制し、ラパマイシン (mTOR 阻害薬)は、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化活性に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、PI3K、MEK は、ERK2 の上流に存在し、mTOR は、ERK2 の下流に存在していると考えられる。

IGF-I-RTK リン酸化活性及び MAPK リン酸化活性の結果より、AsA 及び AsA2G は、IGF-I 受容体刺激後、IGF-I-RTK→PI3K→MEK→ERK2→mTOR と順に活性化していくと考えられる。mTOR は活性化 (リン酸化) されると、4E 結合タンパク質 1 (4E binding protein 1 : 4E-BP1) をリン酸化し、これにより翻訳制御因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E : eIF4E) が解離する。eIF4E は cyclin D の発現を促し、これが細胞周期の G1 期を S 期に移行させ、DNA 合成が促進されるといわれている。また、mTOR は p70 リボソーム S6 キナーゼ (70-kDa ribosomal protein S6 kinase : p70S6K) のリン酸化を促し、この経路も細胞周期の制御や細胞増殖に関与するといわれている^{66)~68)}。

4-3. 初代培養肝実質細胞の IGF-I 受容体に対する L-アスコルビン酸及びその誘導体の結合性

Fig.6~15 の結果より、AsA 及び AsA2G は、肝実質細胞の IGF-I 受容体を刺激することにより、DNA 合成能を促進し、細胞増殖を促していることが示唆された。実際、AsA や AsA2G は、IGF-I と比較して、どの程度の親和性で IGF-I 受容体に結合しているのかを確認するため、IGF-I 受容体結合試験を行った。初代培養肝実質細胞の IGF-I 受容体と [125 I]-IGF-I (0-150 pM) の結合性を確認したところ、特異的に IGF-I 受容体に結合する [125 I]-IGF-I は、0-50 pM において、用量依存的に増加したが、75 pM 以上から増えず、ほぼ飽和状態になっていると考えられる。また、Scatchard 解析から、結合と結合/遊離関係は、1 本の直線になり解離定数 (K_d) が 1 つになったことから、肝実質細胞における IGF-I の結合部位は 1 種であることが考えられた (Fig.16)。解離定数は、リガンドと受容体との結合性を示す固有の値である。本実験から求められた解離定数は、0.35 nM であり、これは、他の細胞を用いた IGF-I 受容体結合実験においても類似の値が報告されている^{69,70)}。従って、この値は IGF-I と IGF-I 受容体の解離定数であることを意味しており、本実験のアプローチからも、初代培養肝実

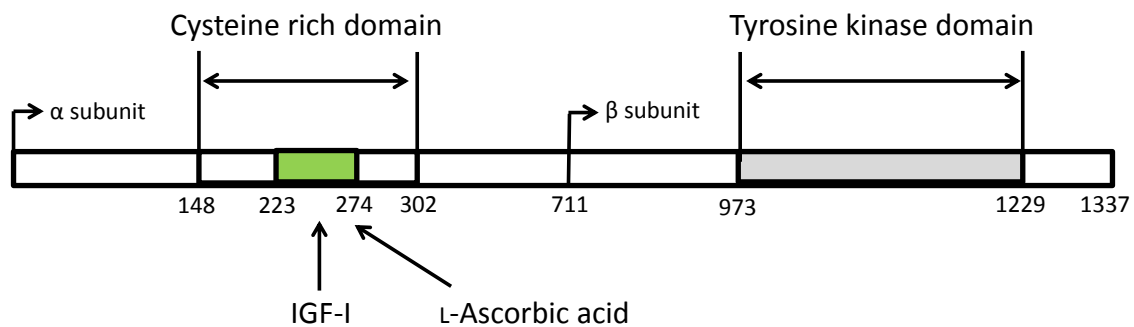
質細胞において、IGF-I 受容体が発現していることを証明することができた。

この結果を踏まえて、50 pM [¹²⁵I]-IGF-I 存在下において、AsA 及びその誘導体が IGF-I 受容体に対してどの程度、競合阻害するかを検討した。Fig.17 に示したように、IGF-I の阻害効果が最も高く、その 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 4.3×10^{-10} M であり、次いで AsA2G (IC₅₀: 5.4×10^{-8} M)、AsA (IC₅₀: 1.8×10^{-7} M) という順であった。この IC₅₀ は、IGF-I 受容体との結合の特異性を示し、比較するとその効力比は AsA : AsA2G : IGF-I = 1 : 3 : 420 となった。これは、Fig.7 の AsA と AsA2G の肝細胞増殖作用の用量-反応関係の結果と近い相関性を示した。

AsA は、SVCT などのトランスポーターにより、細胞内へ取り込まれて、細胞内で抗酸化作用を示すことが知られており、肝実質細胞においても主に SVCT1 が多く存在している²⁴⁾。従って、AsA 及び AsA2G による肝実質細胞増殖促進も、細胞内に取り込まれて作用を示している可能性が考えられた。しかし、本実験の結果より、AsA 及び AsA2G は、肝実質細胞の IGF-I 受容体との結合特異性を示唆したことから、AsA 及び AsA2G は、細胞内に取り込まれてから肝細胞増殖促進作用を示すのではなく、直接的に IGF-I 受容体を介して肝実質細胞の増殖を促進しているものと考えられる。

IGF-I 受容体の α サブユニットには、アミノ酸配列 148~302 番目の間に 24 個のシステイン残基を含む領域 (システインリッチドメイン) が存在している (Fig.19)。リガンドである IGF-I は、この領域のアミノ酸配列 223~274 番目の間に結合するといわれており、これは、インスリン受容体と IGF-I 受容体のキメラ受容体を用いた実験で証明されている^{71),72)}。また、IGF-I の IGF-I 受容体への結合を阻害する mAb IGF-I 受容体が同じ領域を認識していることも示されており、この領域は、IGF-I 結合特異性に重要な役割を果たしていると考えられている^{71),72)}。

一方、本研究では、AsA 及び AsA2G の IGF-I 受容体結合領域に関して、AsA 及び AsA2G は、IGF-I 受容体に対して IGF-I と競合阻害を示し、また、mAb IGF-I 受容体は AsA 及び AsA2G による肝実質細胞増殖促進作用が抑制することを示した。これらの結果から、AsA 及び AsA2G は、IGF-I と同様に、IGF-I 受容体の α サブユニットに存在するシステインリッチドメインのアミノ酸配列 223~274 番目の間に結合するものと考えられる (Fig.19)。



5. 小括

第 1 章の結果を総合的に解釈すると、Fig.20 のようなシグナル伝達機構が考えられる。初代培養肝実質細胞において、AsA 及び AsA2G は、IGF-I 受容体を直接刺激し、RTK、PI3K を介して MAP キナーゼ経路を活性化させる。そして、活性化した MAPK により DNA 合成能が促進され、結果的に肝実質細胞の分裂・増殖が促進されたと考えられる (Fig.20)。

これらの結果から、肝障害時に、AsA や AsA2G を投与することにより、肝細胞を早期に増殖させ、機能を回復させることが期待できる。しかし、序論でも述べたように実際の肝再生時には、肝再生に関わる様々な因子が分泌されており、それらと AsA の細胞増殖促進作用との相互作用を考慮しなければならない。その一つにノルアドレナリンなどのカテコールアミンがある。ノルアドレナリンは、単独では、肝実質細胞に対して増殖促進作用を示さない細胞増殖修飾因子(comitogen)であるが、HGF や EGF などの特定の増殖因子の細胞増殖促進作用を増強させるといわれている³⁾。AsA や AsA2G が IGF-I 様作用を示したことから、その作用がカテコールアミンの影響を受ける可能性も十分あると考えられる。そこで、第 2 章では、AsA 及び AsA2G 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との関連性について検討を行った。

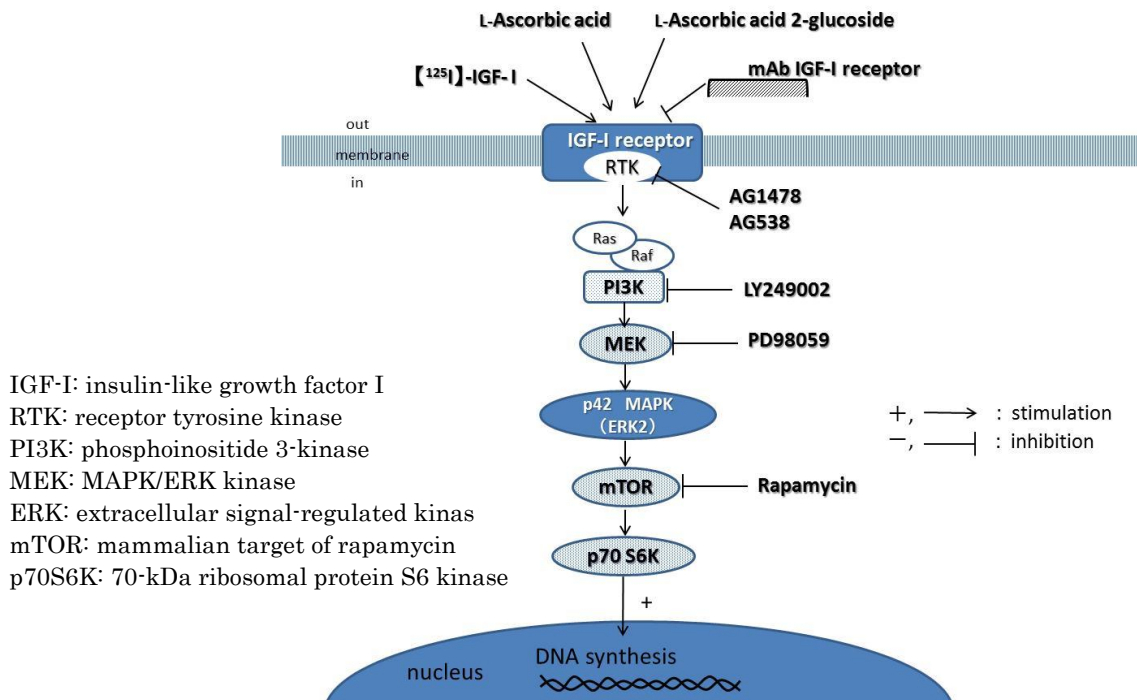


Fig.20 IGF-I受容体を介するL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドの初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構モデル

第2章 ラット初代培養肝実質細胞における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MAPキナーゼ活性化に対するアドレナリン作動性調節機構の検討

1. 諸言

カテコールアミン（ノルアドレナリンやその誘導体）は、生体のホメオスタシス維持に欠くことのできない生理活性物質であり、肝臓においては、脂質や糖質の代謝（脂肪酸合成やグリコーゲン分解など）などに関与している。カテコールアミンの受容体は、Gタンパク質共役型受容体であり、主に α 受容体と β 受容体に分類されている。更に、 α 受容体は、 α_1 及び α_2 に、 β 受容体は、 β_1 及び β_2 のサブタイプが存在する。 α_1 受容体を介する α_1 作用は、Gqタンパク質の活性化を経て、ホスホリパーゼC（phospholipase C：PLC）を活性化する。これによりイノシトール三リン酸（inositol triphosphate：IP₃）とジアシルグリセロール（diacylglycerol：DG）が合成され、合成されたIP₃は、細胞内Ca²⁺の増

加、DGはプロテインキナーゼC (protein kinase C : PKC) の活性化に寄与している(Fig.21 右)。一方、 β 作用は、 β 受容体刺激によるGsタンパク質の活性化を経て、アデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase : AC) を活性化し、細胞内cAMPの増加を引き起こす。更に、このcAMPはプロテインキナーゼA (protein kinase A : PKA) を活性化する。それに対して、 α_2 作用は、 α_2 受容体刺激によるGiタンパク質の活性化を経て、ACを抑制するため、細胞内cAMPの減少を引き起こすといわれている(Fig.21 左)⁷³⁾。

カテコールアミンは、肝再生時における肝細胞増殖に大きな役割を果たしていることが分かっている。第1章の諸言でも述べたように、肝再生時に肝臓から血漿中へEGFやHGFの濃度が、上昇するとともに、アドレナリンやノルアドレナリンなどのカテコールアミンも上昇するといわれている³⁾。また、肝臓のカテコールアミンに対する受容体も肝再生時に増加するといわれており、これは、部分肝切除ラットを用いた*in vivo*実験系でも証明されている⁷⁴⁾。更に、部分肝切除ラットに、 α_1 受容体遮断薬のプラゾシンや β_2 受容体遮断薬のプロプラノロールを投与すると、肝細胞のDNA合成が大幅に遅れることもわかっている^{11),75)}。このように、*in vivo*実験系において、カテコールアミンが肝再生に促進的な影響を与えているものと考えられる。

一方、初代培養肝実質細胞において、ノルアドレナリンは、単独では、肝細胞増殖促進作用を示さないが、EGFあるいはHGFとの併用により、これらの因子による肝細胞増殖促進作用を増強することが報告されている^{10),13),76),77)}。この理由としては、カテコールアミンなどのアドレナリン作動性シグナルが、増殖因子の細胞増殖促進シグナルを増強していることが考えられる。このように、あるシグナル伝達経路が他の経路に影響を与えることをクロストーク (cross-talk) といい、肝再生時には、アドレナリン作動性シグナルと増殖因子の細胞増殖促進シグナルとのクロストークによって、肝細胞増殖を増強しているものと考えられる。しかし、各増殖因子のシグナル伝達機構のどの部分で、どのようなアドレナリン作動性調節を受けているのかは、現在も不明な部分が多い (Fig.21)。

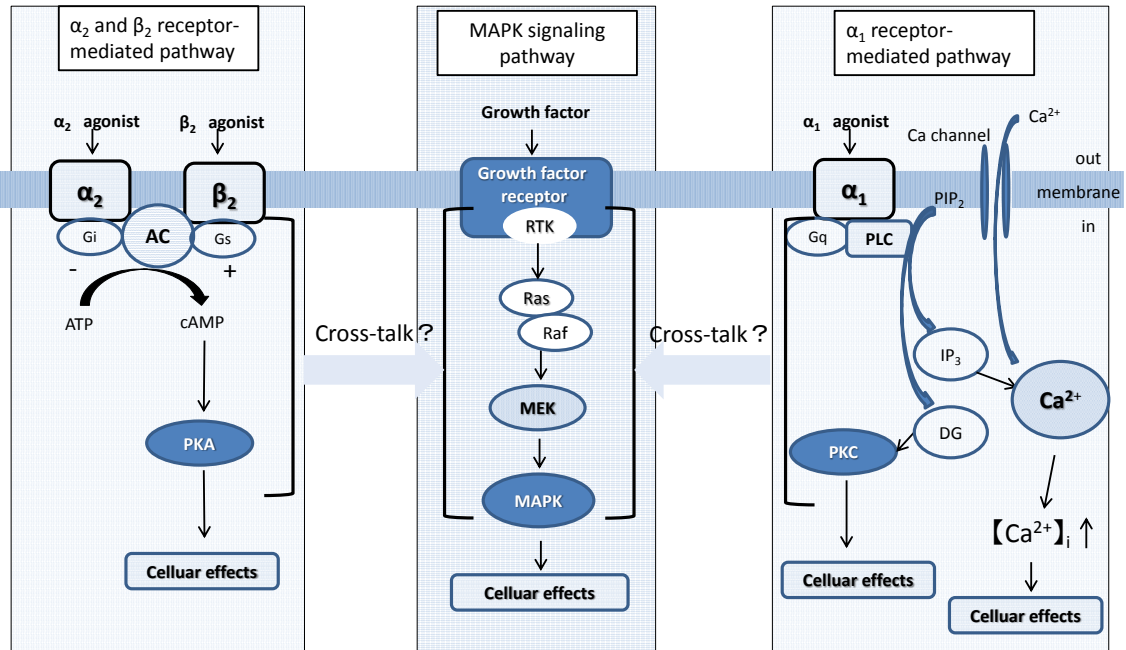


Fig.20 MAP キナーゼ経路とアドレナリン作動性シグナル経路とのクロストーク

AC: adenylyate cyclase	PLC: phospholipase C
PKA: protein kinase A	IP ₃ : inositol triphosphate
RTK: receptor tyrosine kinase	DG: diacylglycerol
MEK: MAPKK/ERK kinase	PKC: protein kinase C
MAPK: mitogen-activated protein kinase	

最近の研究で、アドレナリン作動性シグナルによる細胞増殖シグナルの増強は、増殖因子の種類によって異なることが示唆されている。例えば、初代培養肝実質細胞における各増殖因子の細胞増殖シグナルは、HGF の場合は、 α_1 作動性と β_2 作動性の両方のシグナル伝達系により増強を受けるが⁵¹⁾、一方で、EGF は β_1 作動性シグナル伝達系による調節のみ⁷⁸⁾、血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor : PDGF) は α_1 作動性シグナル伝達系による調節のみ⁷⁹⁾と、それぞれ異なった増強シグナルによる調節を受けていることが示めされている。更に、IGF-I は HGF と同様に、 α_1 作動性及び β_2 作動性シグナル伝達系による細胞増殖シグナルの増強を受けるが、IGF-II では、逆に α_1 作動性及び β_2 作動性シグナル伝達系により細胞増殖シグナルが減弱する現象も報告されている⁵³⁾。

第 1 章において、AsA 及び AsA2G は肝実質細胞の IGF-I 受容体を刺激することにより、下流の MAP キナーゼ経路を活性化させ、肝細胞増殖促進作用を示

した。AsA 及び AsA2G が IGF-I 受容体のリガントとして、細胞増殖促進作用を示すことを見出したので、上記のようなカテコールアミンとの併用により、AsA 及び AsA2G の肝実質細胞増殖促進作用は増強される可能性が高いことが推察された。そこで、第 2 章では、AsA 及び AsA2G の肝実質細胞増殖促進作用とアドレナリン作動性調節機構との関連性について、肝実質細胞の DNA 合成能及び核数の変化を計測し、また、MAP キナーゼリン酸化活性及び IGF-I の RTK リン酸化活性を直接測定することにより検討した。

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. 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. 核数計測

第1章の「核数計測」の項目に準じた。

2-5. IGF-I 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定

第1章の「IGF-I 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定」の項目に準じた。

2-6. MAP キナーゼリン酸化活性の測定

第1章の「MAP キナーゼリン酸化活性の測定」の項目に準じた。

2-7. 実験材料

- ・ 2,4-dideoxyadenosine, 8-bromo cAMP, H-89, metaproterenol hemisulfate, GF109203X hydrochloride, phenylephrine hydrochloride, UK14304, ionomycin calcium saltは、Sigma-Aldrich(St.Louis, MO, U.S.A.)から購入した。
 - ・ U-73122 は、Enzo Life Sciences(Farmingdale, NY, U.S.A.)から購入した。
 - ・ TPA は、Research Biochemicals Inc. (Natick, MA, U.S.A.)から購入した。
- その他、第1章の「実験材料」の項目に準じた。

2-8. 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. L-アスコルビン酸の初代培養肝実質細胞増殖作用に対するアドレナリン作動性調節機構の検討

アドレナリン作動性調節機構が AsA の肝実質細胞増殖促進作用にどのような影響を及ぼすのかを検討するため、 α_1 作動薬であるフェニレフリン（以下、Pheny と略す）及び β_2 作動薬であるメタプロテレノール（以下、Meta と略す）を AsA と併用して、肝実質細胞の初代培養を行った。

Fig.22 には、培養4時間後における、AsA($3 \times 10^{-6} M$)単独及び Pheny または Meta 併用の肝実質細胞の位相差顕微鏡像を示した。顕微鏡像から、肝実質細胞数は、AsA 添加により増加したことが確認できた(Fig.22 AsA)。一方、 α_1 作動

薬の Pheny(10^{-6} M)を併用して培養すると、肝実質細胞数は、AsA 単独よりも更に増加した(Fig.22 AP)。この現象は、 β_2 作動薬の Meta(10^{-6} M)を併用しても同様の結果が認められた(Fig.22 AM)。

また、Pheny 及び Meta 併用における AsA による肝実質細胞の DNA 合成能と核数計測の結果を Fig.23 に示した。培養 4 時間後の DNA 合成能では、AsA(3×10^{-6} M)単独で control と比較して約 6 倍まで増加したのに対して、Pheny(10^{-6} M)との併用では、更に上昇し、control の約 15 倍まで増加した(Fig.23 A)。また、Meta(10^{-6} M)との併用においても同様に約 15 倍まで増強した(Fig.23 A)。また、核数計測の結果でも同様な傾向が認められ、AsA(3×10^{-6} M)単独では control と比較して、約 1.2 倍増加したのに対して、Pheny 併用または Meta 併用では、各々 control の約 1.4 倍まで増加した。一方、Pheny 及び Meta 単独では、肝実質細胞の DNA 合成能及び核数に影響を及ぼさなかった(Fig.23 B)。

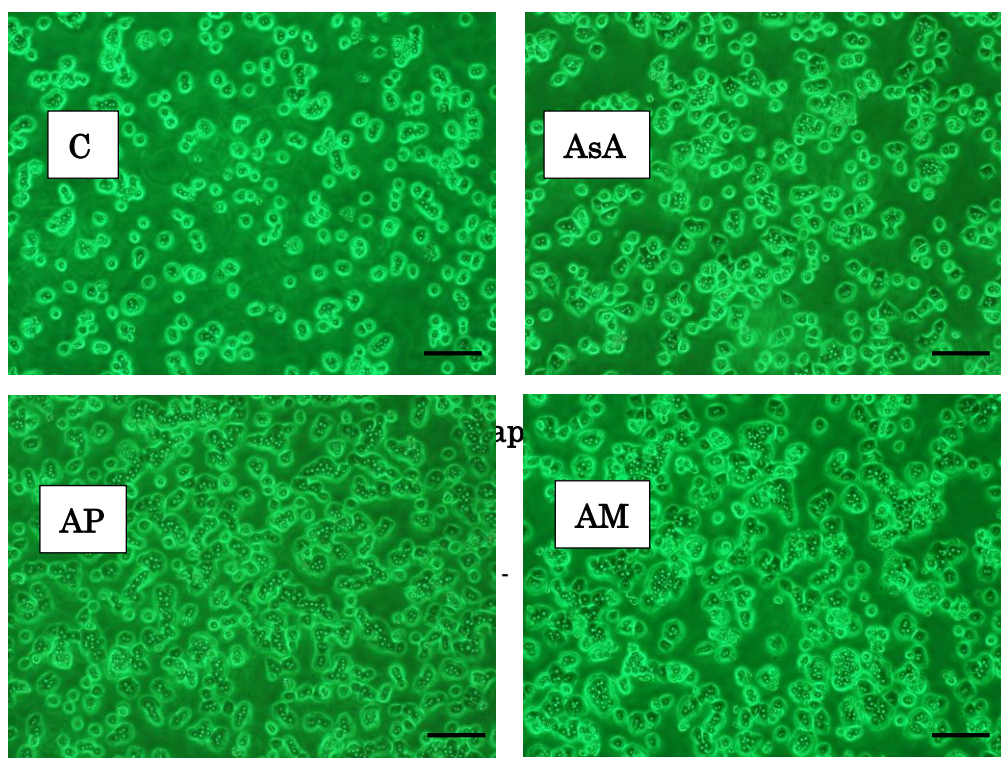


Fig.22 L-アスコルビン酸の肝実質細胞増殖促進作用に対するフェニレフリン及びメタプロテレノールの効果（位相差顕微鏡像）

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養（刺激）時間：4時間

薬物処理： C：control(medium), AsA：L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M),

AP：L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M)+phenylephrine(10^{-6} M),

AM：L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M)+metaproterenol(10^{-6} M),

スケールバー： 100 μ m

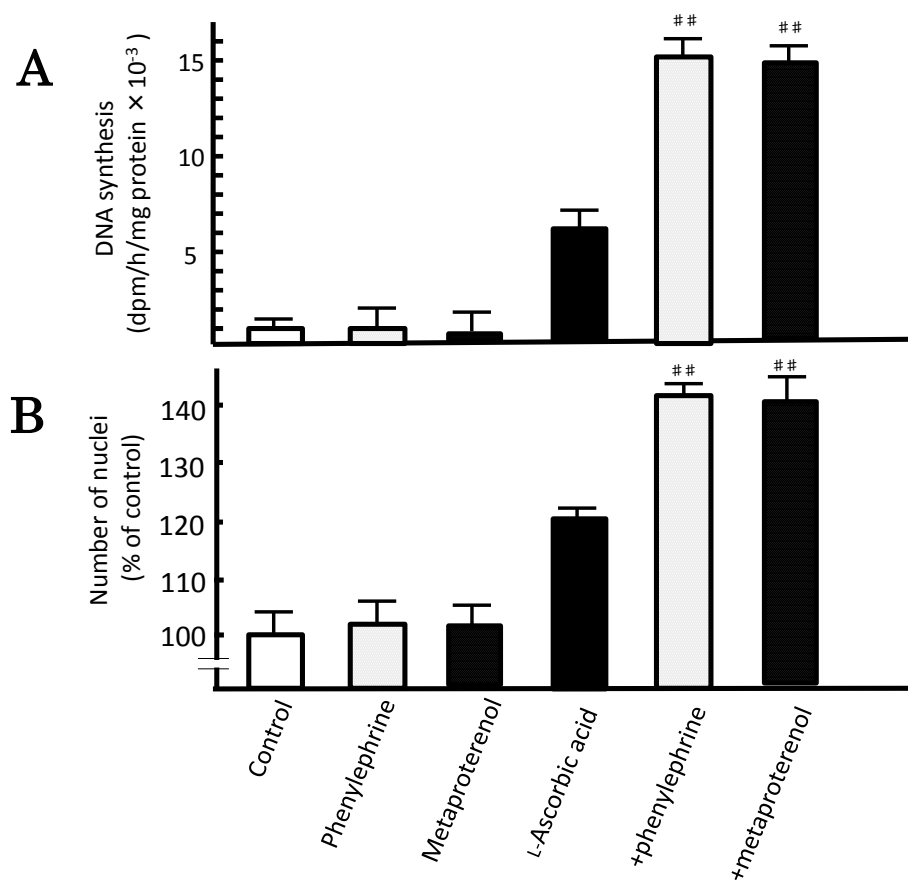


Fig.23 L-アスコルビン酸の肝実質細胞増殖促進作用に対するフェニレフリン及びメタプロテレノールの効果 (A ; DNA 合成能、B ; 細胞増殖)

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 4 時間

薬物処理 : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M),

Phenylephrine(10^{-6} M), Metaproterenol(10^{-6} M),

値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-2. L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドによる初代培養肝細胞増殖促進作用に対する α_1 アドレナリン作動性調節機構の検討

Fig.22,23 の結果より、AsA の肝実質細胞増殖作用は、 α_1 受容体作動薬の Pheny により、増強を受けていたことから、AsA の増殖促進シグナルは、 α_1 アドレナリン作動性の調節を受けている可能性が示された。そこで、 α_1 受容体応答が AsA の肝実質細胞増殖シグナル伝達機構のどの部分と相互作用をしているのか、AsA の細胞増殖シグナル伝達因子の 1 つである MAP キナーゼと IGF-I-RTK のリン酸化活性を直接測定することにより検討した。

3-2-1. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK1/2 リン酸化活性に対するフェニレフリンの効果の経時的变化

Fig.24 は、AsA(3×10^{-6} M)または AsA2G(10^{-6} M)と Pheny(10^{-6} M)⁸⁰⁾の併用による初代培養肝実質細胞の ERK1/2(pERK1/2)リン酸化活性の経時的变化を Western blot 解析法により直接測定した結果である。無血清培地に交換した 3.3×10^4 cells/cm² の肝実質細胞に AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加すると、ERK2 リン酸化活性は、添加 1 分後から上昇し、添加 5 分後には一過性のピークを迎え、その活性比は control と比較して各々約 3 倍だった。一方、ERK1 は AsA 及び AsA2G で刺激をしても、それらの活性上昇は認められなかった。

これらに対して、Pheny(10^{-6} M)共存在下において、AsA 及び AsA2G による ERK2 リン酸化活性は、AsA 及び AsA2G 単独よりも更に一過性に増強し、それらのピークは添加 5 分後にみられ、活性比は control と比較して共に約 4 倍であった。ERK1 は AsA 及び AsA2G 単独と同様、Pheny 共存在下においても、活性の変動は認められなかった。また、Pheny 単独においても ERK1/2 リン酸化作用への影響は認められなかった。

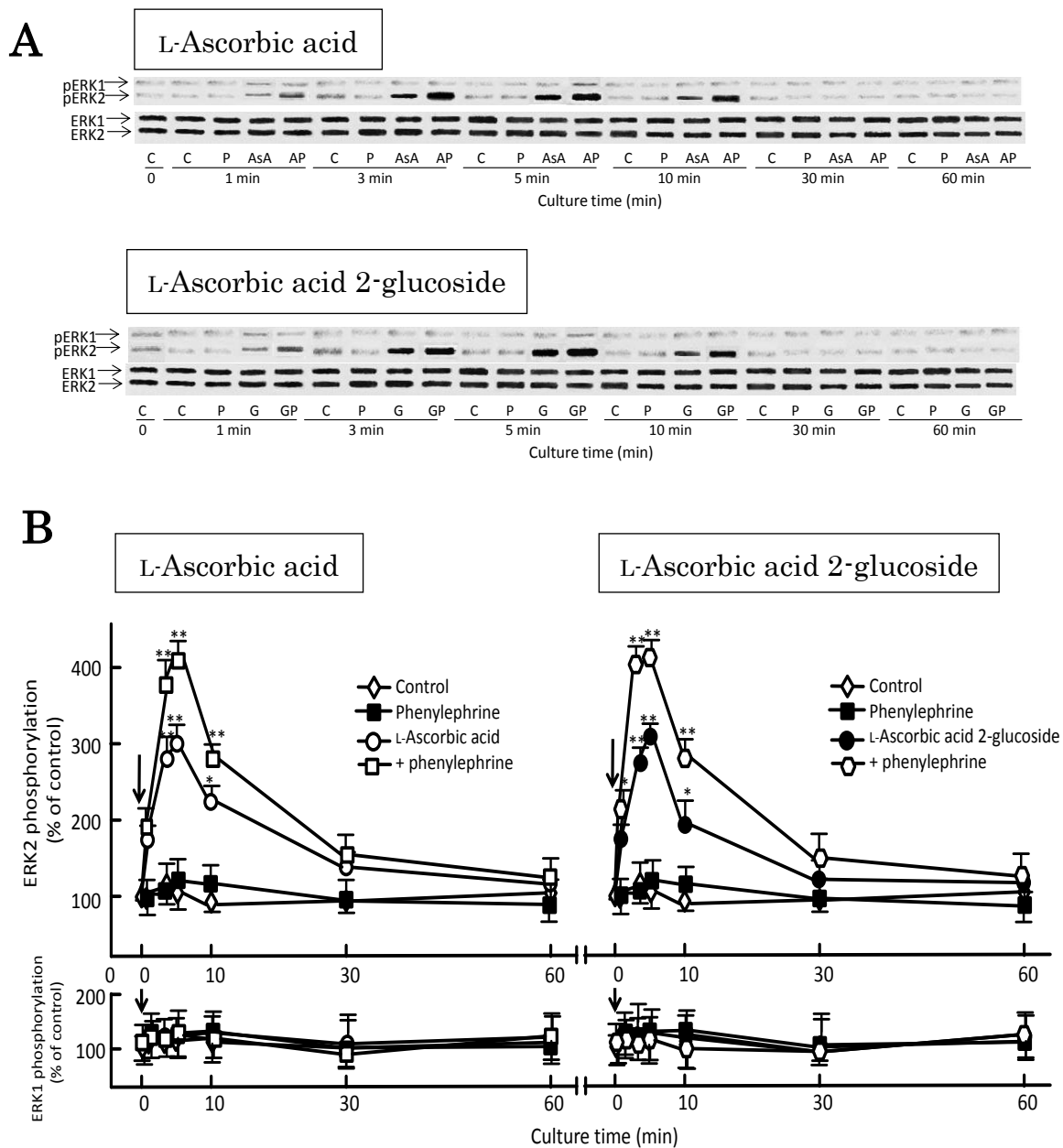


Fig.24 初代培養肝実質細胞におけるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシド誘発 ERK1/2 リン酸化活性に対するフェニレフリンの効果の経時的変化

A : Western blotting band B : MAP キナーゼ(ERK1/2)リン酸化活性
 細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
 薬物処理 : C : Control(medium), AsA : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M),
 G : L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M), P : Phenylephrine(10^{-6} M),
 AP : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M)+phenylephrine(10^{-6} M),
 GP : L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M)+phenylephrine(10^{-6} M)
 値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
 有意差 : 各々control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2-2. フェニレフリン存在下におけるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン

酸 2 グルコシド誘発 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

Fig.24 の結果から、肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性の上昇ピークが、AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)添加 5 分後に認められた。そこで、培養時間（刺激時間）を 5 分に固定し、 α_1 受容体/PLC/PKC 経路及び MAP キナーゼ経路に関するそれぞれの特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いて、これらの薬物が、AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性に対する Pheny の増強作用にどのような影響を及ぼすか検討した。

Fig.25 には、Pheny 存在下における AsA(Fig.25 A)及び AsA2G(Fig.25 B)誘発 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の結果を示した。AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性は、Pheny の用量(10^{-8} - 10^{-6} M)に依存して増強された。この Pheny(10^{-6} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用は、PLC 阻害薬の U-73122⁸¹⁾の用量に依存して、抑制が認められ、 10^{-6} M の U-73122 により、ERK2 リン酸化活性は、AsA 単独レベルにまで抑制された(Fig.25A)。

α_1 受容体刺激により、PLC が活性化され、これにより DG と IP₃ が合成されることが知られている。DG は PKC を活性化し、IP₃ は細胞内 Ca²⁺濃度を増加させる。この PKC と細胞内 Ca²⁺濃度の影響について検討するため、細胞内 Ca²⁺濃度を増加させるイオノマイシン(10^{-7} M)⁸²⁾と PKC 阻害薬の GF109203X(10^{-7} M)⁸³⁾を用いて、AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用に対して検討した。イオノマイシン(10^{-7} M)は、AsA 誘発 ERK2 リン酸化の増強作用に影響を及ぼさなかった。一方、GF109203X(10^{-7} M)は、AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性に影響を及ぼさなかったが、Pheny による AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性増強作用は、完全に抑制し、ERK2 リン酸化活性を AsA 単独レベルにまで抑制させた(Fig.25 A)。

また、特異的 IGF-I-RTK 阻害薬の AG538(10^{-7} M)、PI3K 阻害薬の LY294002(10^{-7} M)、MEK 阻害薬の PD98059(10^{-6} M)は、各々 Pheny(10^{-6} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用のみならず、AsA 単独による ERK2 リン酸化活性をも完全に抑制し、ERK2 リン酸化活性は control レベルにまで抑制したが、mTOR 阻害薬のラパマイシン(10 ng/ml)は、影響を及ぼさなかった。なお、各種特異的シグナル伝達阻害薬単独では、肝実質細胞の ERK2 のリン酸化には影響を及ぼさなかった (Fig.25 A)。

Pheny による AsA2G(10^{-6} M)誘発 ERK2 リン酸化増強作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果は、AsA(3×10^{-6} M)を用いた場合と同様な結果が得られた (Fig.25 B)。

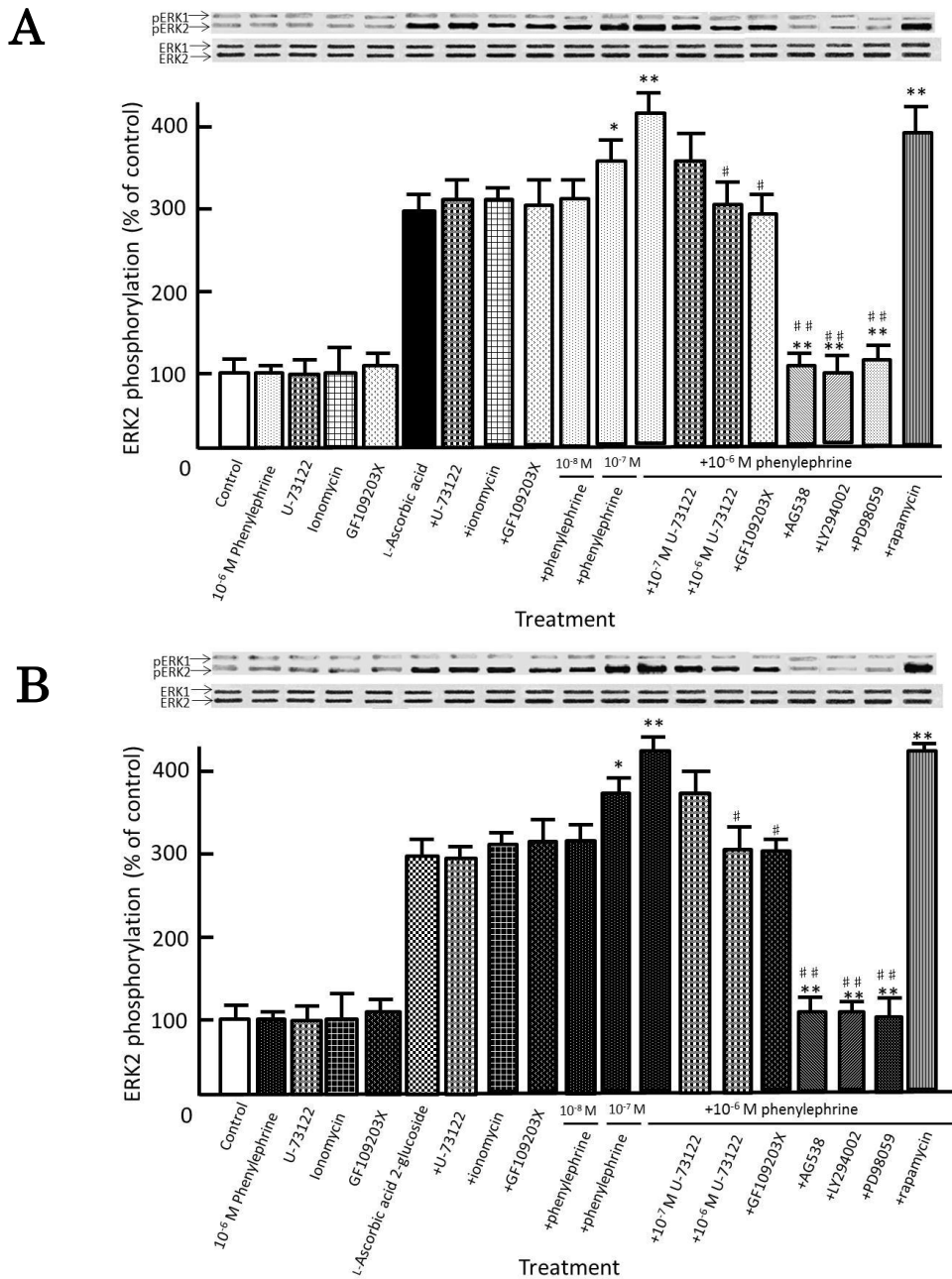


Fig.25 フェニレフリン存在下におけるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシド誘発ERK2リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : L-Ascorbic acid B : L-Ascorbic acid 2-glucoside

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 5 分間

薬物処理 : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M), Phenylephrine (10^{-8} - 10^{-6} M), U-73122 (10^{-7} / 10^{-6} M), Ionomycin (10^{-7} M), GF109203X (10^{-7} M), AG538 (10^{-7} M), LY294002 (10^{-7} M), PD98059 (10^{-6} M), Rapamycin (10 ng/ml)

値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

*有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくはL-アスコルビン酸2グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P < 0.05, **P < 0.01)

#有意差 : L-アスコルビン酸+フェニレフリン併用群もしくはL-アスコルビン酸2グルコシド+フェニレフリン併用群に対する有意差 (#P < 0.05, ##P < 0.01)

3-2-3. TPA 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 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

Fig.26 には、TPA 存在下における AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)により誘発された肝実質細胞の 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示した。TPA とは 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate の略称であり、生理的条件下で細胞膜を通過して、PKC を活性化する DG の代わりに働く薬物として、PKC の下流シグナルの研究のために汎用されている⁸⁴⁾。TPA 存在下における AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性は、TPA の用量(10^{-9} - 10^{-7} M)⁸⁵⁾に依存して増強を示した。一方、この TPA(10^{-7} M)の AsA に対する ERK2 リン酸化増強作用は、U-73122(10^{-7} / 10^{-6} M)では、抑制されなかった(Fig.26 A)。

一方、GF109203X(10^{-7} M)は、TPA(10^{-7} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用を完全に抑制し、ERK2 リン酸化活性を AsA(3×10^{-6} M)単独レベルにまで抑制した(Fig.26 A)。

AG538(10^{-7} M)、LY294002(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M)は、それぞれ TPA(10^{-7} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化に対する増強作用のみならず、AsA 単独による ERK2 リン酸化まで抑制し、ERK2 リン酸化活性を control レベルにまで著しく抑制した。一方、ラパマイシン(10 ng/ml)は、TPA(10^{-7} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用に影響を及ぼさなかった。なお、TPA(10^{-7} M)単独では、肝実質細胞の ERK2 のリン酸化作用は示さなかった(Fig.26 A)。

以上のように、Pheny による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強シグナル(Fig.25)との相違点は、TPA による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強シグナルは、PLC 阻害薬の U-73122 により抑制されない点であった。

TPA による AsA2G(10^{-6} M)誘発 ERK2 リン酸化増強活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果は、AsA(3×10^{-6} M)を用いた場合と同様な結果が得られた (Fig.26 B)。

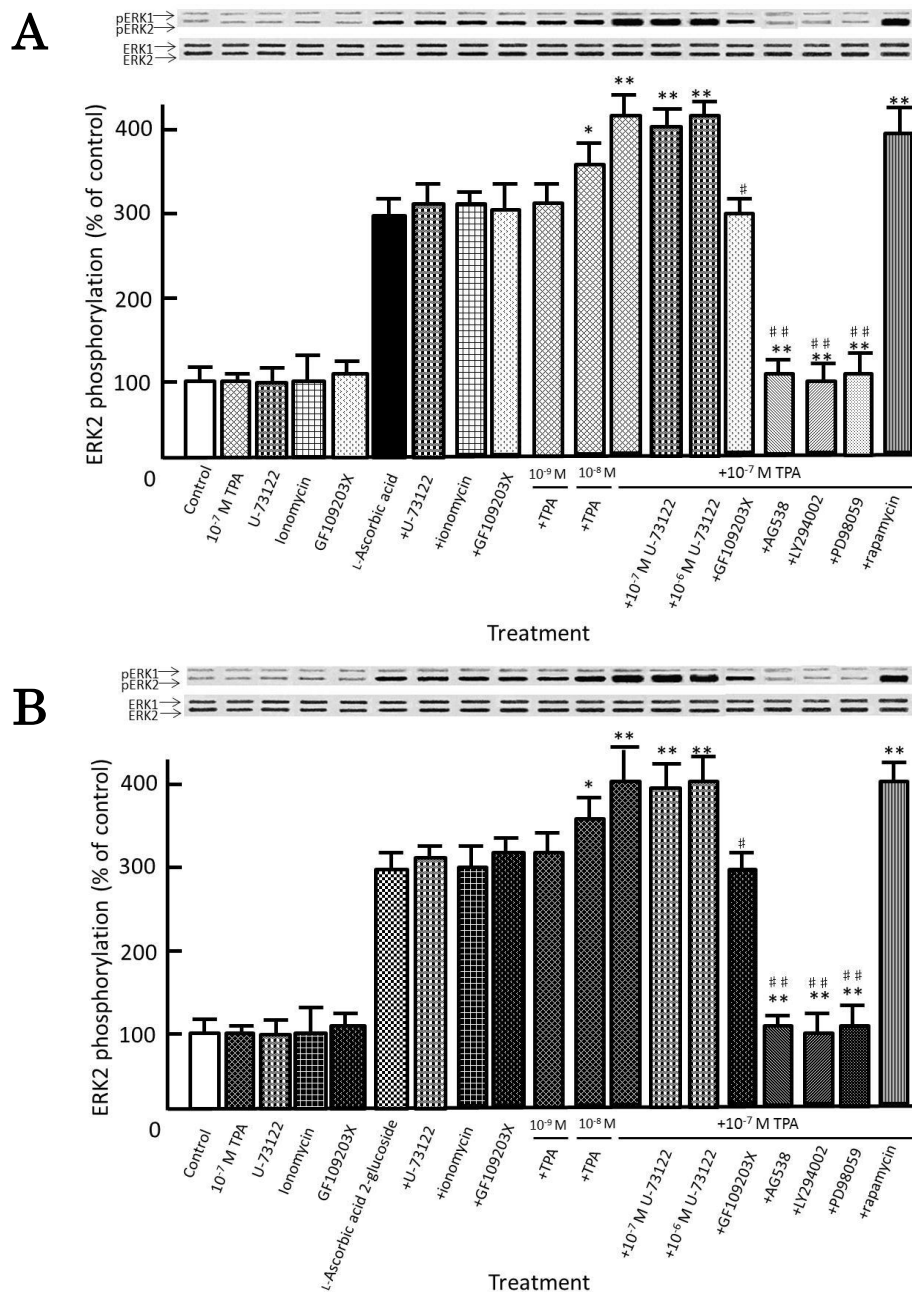


Fig.26 TPA 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK2 リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : L-Ascorbic acid B : L-Ascorbic acid 2-glucoside

細胞密度 : 3.3 × 10⁴ cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 5 分間

薬物処理 : L-Ascorbic acid(3 × 10⁻⁶ M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10⁻⁶ M),
TPA(10⁻⁹-10⁻⁷ M), U-73122(10⁻⁷/10⁻⁶ M), Ionomycin(10⁻⁷ M), GF109203X(10⁻⁷ M),
AG538(10⁻⁷ M), LY294002(10⁻⁷ M), PD98059(10⁻⁶ M), Rapamycin(10 ng/ml)

値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

*有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P < 0.05, **P < 0.01)

#有意差 : L-アスコルビン酸 + TPA 併用群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド + TPA 併用群に対する有意差 (#P < 0.05, ##P < 0.01)

3-2-4. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対するフェニレフリンの効果の経時的変化

Fig.27 は、初代培養肝実質細胞における、AsA 及び AsA2G 単独と、それらと Pheny 併用による IGF-I-RTK リン酸化活性の経時的変化を Western blot 解析法により直接測定した結果である。無血清培地に交換した肝実質細胞に AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加すると、IGF-I-RTK リン酸化活性は、添加 1 分後から上昇し、添加 3 分後に一過のピークを迎え、その活性比は control と比較して各々約 3 倍を示した。これに対し、Pheny(10^{-6} M)共存下における AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性の増強作用は認められず、AsA 及び AsA2G 単独とほぼ同じ挙動を示した。また、Pheny 単独では肝実質細胞の IGF-I-RTK リン酸化作用は認められなかった(Fig.27 A,B)。

3-2-5. TPA 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK 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

Fig.27 の結果から、IGF-I-RTK リン酸化活性の上昇ピークが、AsA(3×10^{-6} M) 及び AsA2G(10^{-6} M)添加 3 分後に認められた。AsA や AsA2G による培養時間 (刺激時間) を 3 分に固定し、TPA や各種シグナル伝達因子阻害薬が、AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性にどのような影響を及ぼすのか検討した。AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性は、Pheny(10^{-6} M)及び TPA (10^{-7} M)の各々併用においてもリン酸化増強作用は認められなかった(Fig.27 B,28 A)。また、U-73122(10^{-6} M)、イオノマイシン(10^{-7} M)、GF109203X(10^{-7} M)は、それぞれ AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった。GF109203X(10^{-7} M)に関しては TPA(10^{-7} M)共存在下(GF109203X + TPA + AsA)においても、同様に AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった。一方、AG538 (10^{-7} M)は、それぞれ AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性を control レベルにまで抑制したが、LY294002(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M)、ラパマイシン(10 ng/ml) は、それぞれ AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった(Fig.28 A)。

TPA(10^{-7} M)による AsA2G(10^{-6} M)誘発 IGF-I-RTK 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は、AsA を用いた場合と同様な結果が得られた (Fig.28 B)。

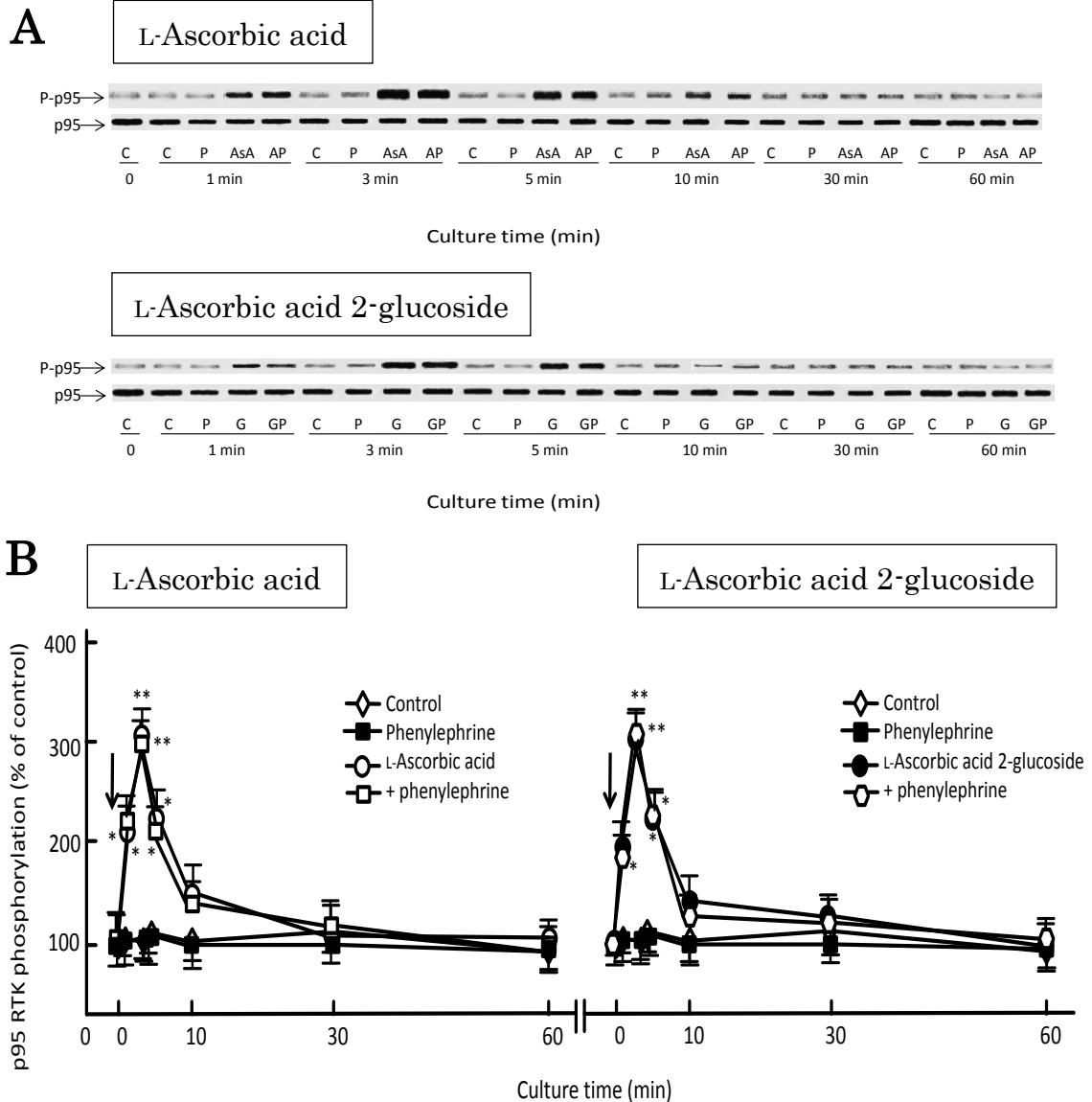


Fig.27 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対するフェニレフリンの効果の経時的変化

A : Western blotting band B : p95 IGF-I-RTK リン酸化活性
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
薬物処理 : C : Control (medium), AsA : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M),
G : L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M), P : Phenylephrine (10^{-6} M),
AP : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M) + phenylephrine (10^{-6} M),
GP : L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M) + phenylephrine (10^{-6} M)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
有意差 : 各々 control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

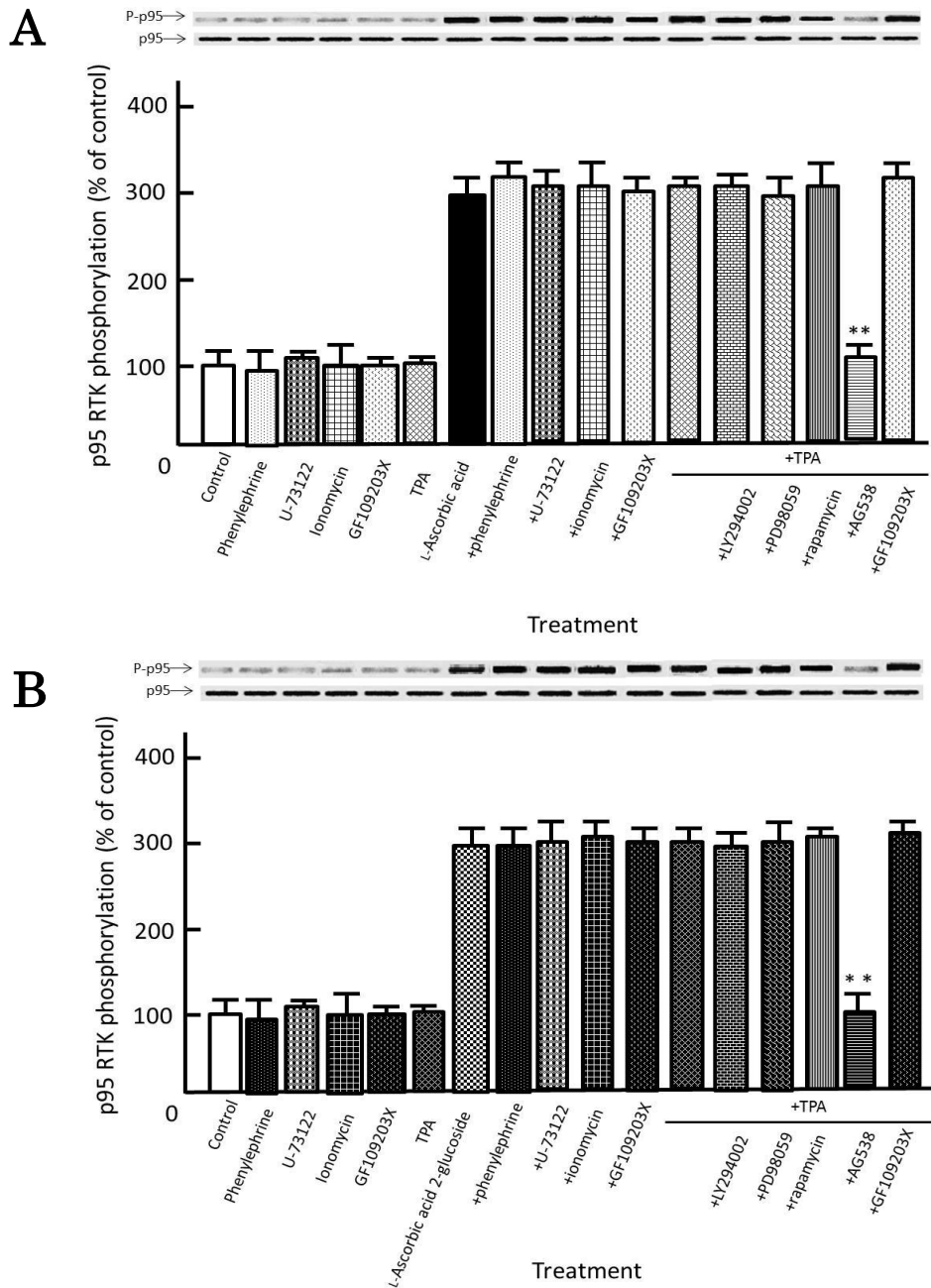


Fig.28 TPA 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : L-Ascorbic acid B : L-Ascorbic acid 2-glucoside
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 3 分間
薬物処理 : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M),
Phenylephrine(10^{-6} M), U-73122(10^{-6} M), Ionomycin(10^{-7} M),
GF109203X(10^{-7} M), TPA(10^{-7} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M),
Rapamycin(10 ng/ml), AG538(10^{-7} M)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-2-6. 初代培養肝実質細胞におけるフェニレフリンまたはTPAによるL-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシド誘発DNA合成能及び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

前節の結果を踏まえて、初代培養肝実質細胞における Pheny(10^{-6} M)及びTPA(10^{-7} M)存在下による AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)誘発 DNA 合成能及び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の検討を行った。肝実質細胞を無血清培地交換後、Pheny(10^{-6} M)、TPA(10^{-7} M)及び各種特異的シグナル伝達因子阻害薬存在/非存在下において、AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加し、培養して、DNA 合成能及び核数計測を行った。

培養4時間の結果を Fig.29(AsA)と Fig.30(AsA2G)に示した。Pheny(10^{-6} M)及びTPA(10^{-7} M)併用により、AsA 誘発肝実質細胞 DNA 合成能及び核数の増強が認められた。更に、AG538(10^{-7} M)、LY294002(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M)、ラパマイシン(10 ng/ml)は、それぞれ Pheny(10^{-6} M)及びTPA(10^{-7} M)による AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加を control レベルにまで抑制した。U-73122(10^{-6} M)は、Pheny(10^{-6} M)による AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加を AsA 単独レベルにまで抑制したが、TPA(10^{-7} M)による AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加には影響を及ぼさなかった。また、GF109203X(10^{-7} M)は、Pheny(10^{-6} M)及びTPA(10^{-7} M)各々併用においても、AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加を AsA 単独レベルにまで抑制した。一方、Pheny(10^{-6} M)、TPA(10^{-7} M)及び各種特異的シグナル伝達因子阻害薬は、単独では、DNA 合成能及び核数に影響を及ぼさなかった(Fig.29)。

AsA2G(10^{-6} M)を用いた場合では、AsA を用いた場合の結果と同様な傾向が認められた(Fig.30)。

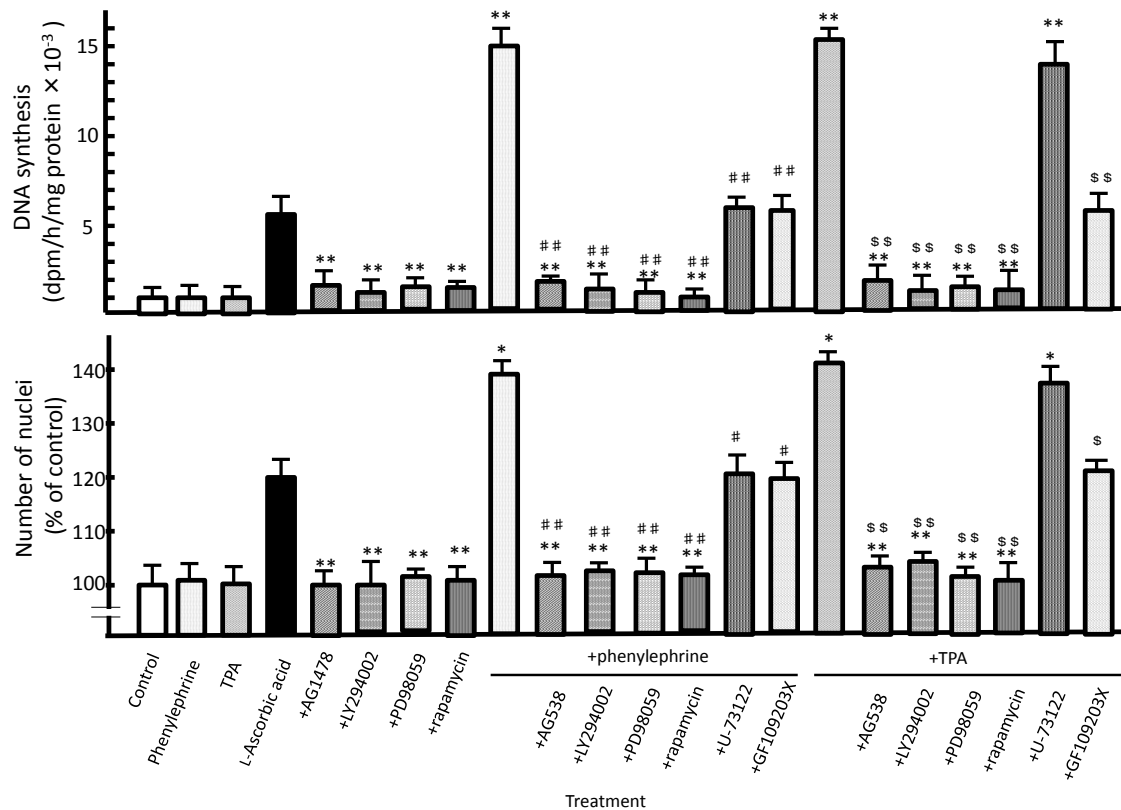


Fig.29 初代培養肝実質細胞におけるフェニレフリンまたは TPA による L-アスコルビン酸誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養（刺激）時間：4 時間

薬物処理： L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), Phenylephrine(10^{-6} M), TPA(10^{-7} M),
AG538(10^{-7} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M),
Rapamycin(10 ng/ml), U-73122(10^{-7} / 10^{-6} M), GF109203X(10^{-7} M)

値： 平均値±標準誤差 (n=3)

*有意差： L-アスコルビン酸単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

#有意差： L-アスコルビン酸+フェニレフリン併用群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

\$有意差： L-アスコルビン酸+TPA 併用群に対する有意差 (\$P<0.05, \$\$P<0.01)

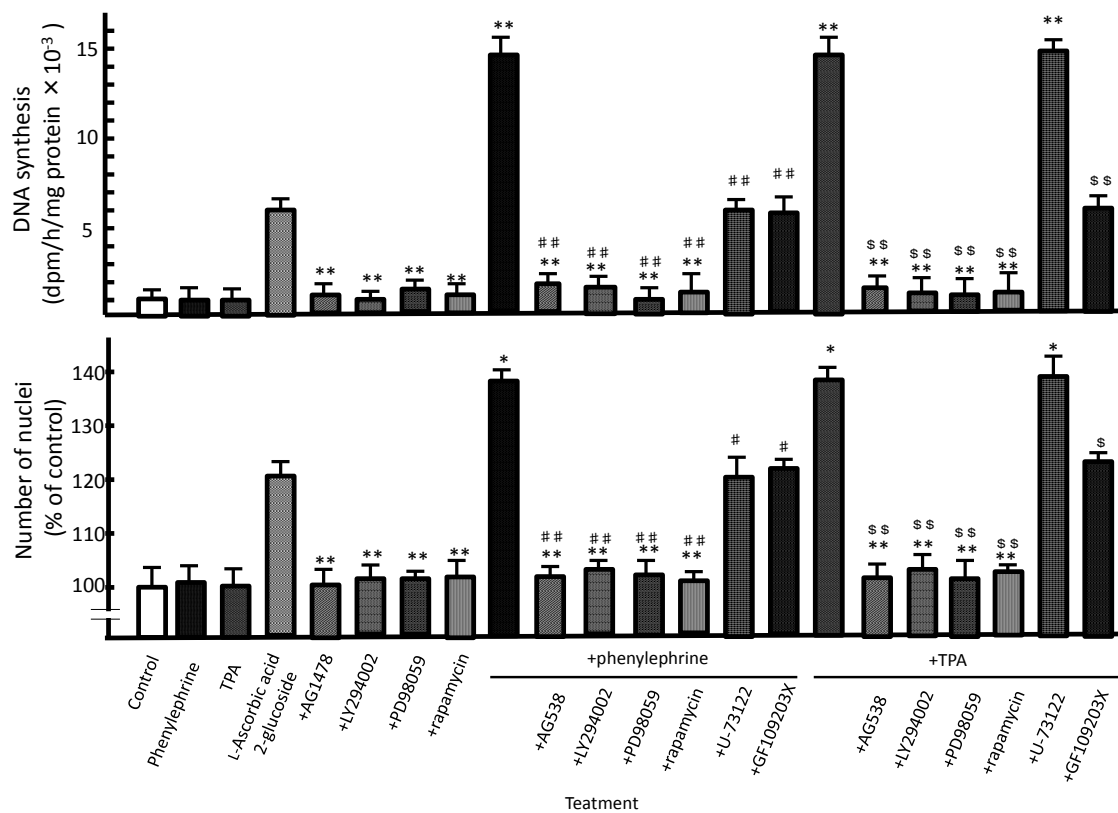


Fig.30 初代培養肝実質細胞におけるフェニレフリンまたは TPA による L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養（刺激）時間： 4 時間

薬物処理： L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M), Phenylephrine(10^{-6} M), TPA(10^{-7} M), AG538(10^{-7} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M), Rapamycin(10 ng/ml), U-73122($10^{-7}/10^{-6}$ M), GF109203X(10^{-7} M)

値： 平均値±標準誤差 (n=3)

*有意差： L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

#有意差： L-アスコルビン酸 2 グルコシド+フェニレフリン併用群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

\$有意差： L-アスコルビン酸 2 グルコシド+TPA 併用群に対する有意差 (\$P<0.05, \$\$P<0.01)

3-3. L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドによる初代培養肝実質細胞増殖促進作用に対する β_2 アドレナリン作動性機構の検討

Fig.22,23 の結果より、AsA の肝実質細胞増殖作用は、 β_2 作動薬の Meta により、増強を受けていたことから、AsA の増殖促進シグナルは、 α_1 アドレナリン作動性以外にも β_2 アドレナリン作動性の増強も受けている可能性がある。そこで、 β_2 受容体応答が AsA の肝実質細胞増殖シグナル伝達機構のどの部分と相互作用をしているのかを 3-2. で行った方法と同様に、MAP キナーゼ及び IGF-I-RTK のリン酸化活性を直接測定して検討することにした。

3-3-1. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK1/2 リン酸化活性に対するメタプロテレノールの効果の経時的変化

Fig.31 は、AsA または AsA2G と Meta の併用による初代培養肝実質細胞の ERK1/2(pERK1/2)リン酸化活性の経時的変化を Western blot 解析法により直接測定した結果である。無血清培地に交換した 3.3×10^4 cells/cm² の肝実質細胞に AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加すると、ERK2 リン酸化活性は、添加 1 分後から上昇し、添加 5 分後には一過性のピークを迎え、その活性比は control と比較して各々約 3 倍だった。一方、ERK1 は AsA 及び AsA2G で刺激をしても、活性上昇は認められなかった。

これらに対して、Meta(10^{-6} M)⁸⁶⁾ 共存在下において、AsA 及び AsA2G による ERK2 リン酸化活性は、AsA 及び AsA2G 単独よりも更に一過性に増加し、それらのピークは添加 5 分後にみられ、活性比は control と比較して共に約 4 倍であった。ERK1 は AsA 及び AsA2G 単独と同様、Meta 共存在下においても、リン酸化活性の変動は認められなかった。また、Meta 単独においても ERK1/2 リン酸化作用への影響は認められなかった(Fig.31)。

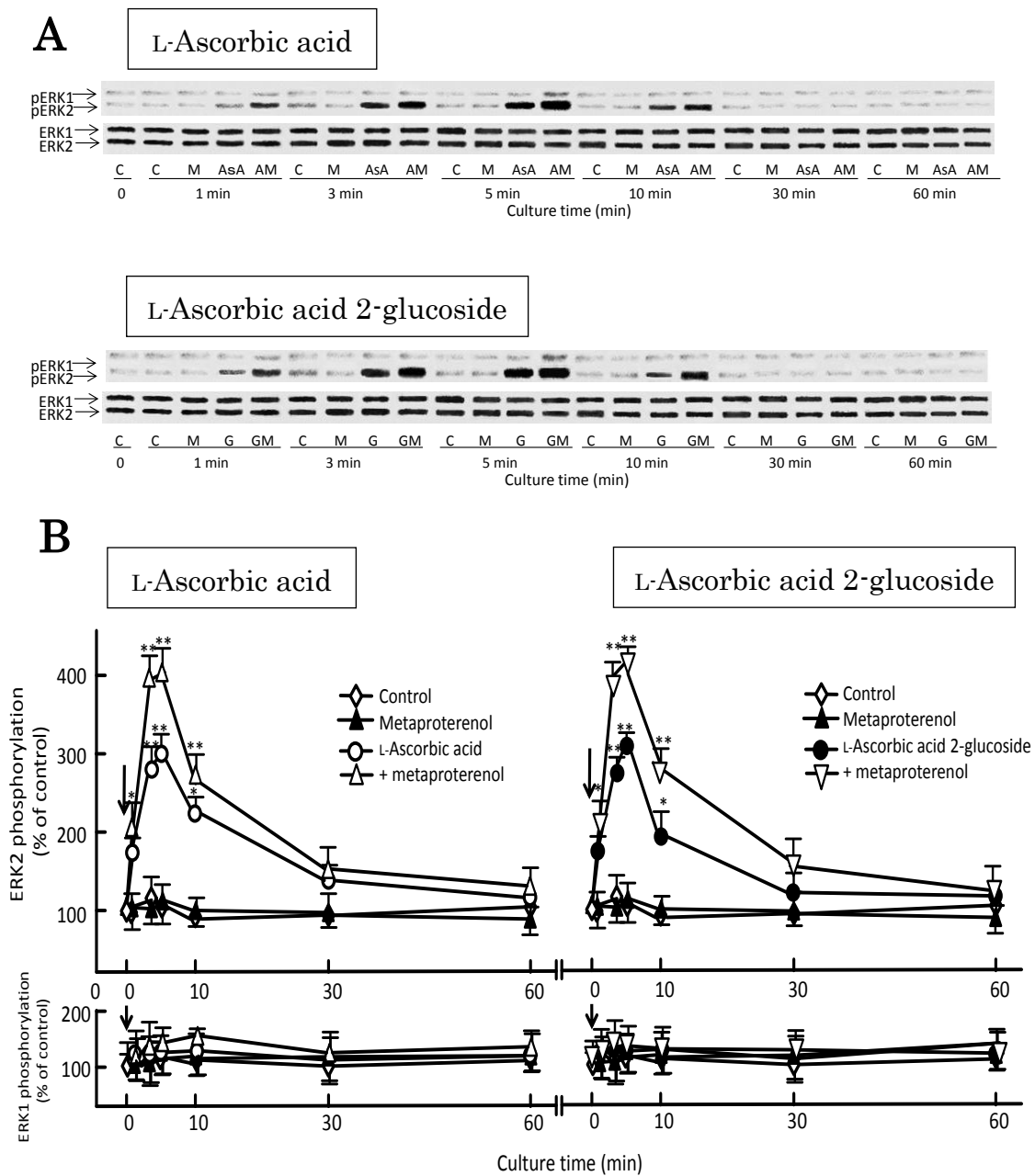


Fig.31 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK1/2 リン酸化活性に対するメタプロテレノールの効果の経時的変化

A : Western blotting band B : MAP キナーゼ(ERK1/2)リン酸化活性
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
薬物処理 : C : Control(medium), AsA : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M),
G : L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M), M : Metaproterenol(10^{-6} M),
AM : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M)+metaproterenol(10^{-6} M),
GM : L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M)+metaproterenol(10^{-6} M)
値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
有意差 : 各々control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-3-2. メタプロテレノール存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 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

Fig.32 の結果から肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性の上昇ピークが AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)添加 5 分後に認められた。そこで、培養時間 (刺激時間) を 5 分に固定し、 β_2 受容体/AC/PKA 経路及び MAP キナーゼ経路に関する特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いて、これらの薬物が、AsA 及び AsA2G 誘発肝実質細胞の ERK2 リン酸化活性に対する Meta の増強作用にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。

Fig.32 には、Meta 存在下における AsA(Fig.32 A)及び AsA2G(Fig.32 B)誘発 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の結果を示した。AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性は、Meta の用量(10^{-8} - 10^{-6} M)に依存して増強を示した。この Meta による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用は、 α_2 受容体作動薬の UK14304⁸⁷⁾の用量(10^{-7} / 10^{-6} M)に依存して、抑制が認められ、 10^{-6} M の UK14304 により、ERK2 リン酸化活性は、AsA 単独レベルにまで抑制された(Fig.32 A)。

β_2 受容体刺激により、AC が活性化され、これにより cAMP が合成される。合成された cAMP は PKA を活性化する。この AC と PKA の影響を検討するため、AC 阻害薬の 2,4-dideoxyadenosine(10^{-6} M)⁸⁸⁾と PKA 阻害薬の H-89(10^{-7} M)⁸⁹⁾を Meta による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用に対して検討したところ、両者とも Meta による AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性に対する増強作用を AsA 単独レベルにまで抑制した (Fig.32 A)。

また、AG538(10^{-7} M)、LY294002(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M)は、それぞれ Meta による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用のみならず、AsA 単独による ERK2 リン酸化活性をも完全に抑制し、ERK2 リン酸化活性は control レベルにまで抑制したが、ラパマイシン(10 ng/ml)は、影響を及ぼさなかった。なお、各種特異的シグナル伝達阻害薬単独では、ERK2 リン酸化活性には、影響を及ぼさなかった。その他、UK14304(10^{-6} M)、2,4-dideoxyadenosine(10^{-6} M)、H-89 (10^{-7} M)をそれぞれ用いた場合でも AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性に対する増強作用は認められなかった(Fig.32 A)。

Meta による AsA2G(10^{-6} M)誘発 ERK2 リン酸化増強作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果は、AsA(3×10^{-6} M)を用いた場合と同様な結果が得られた(Fig.32 B)。

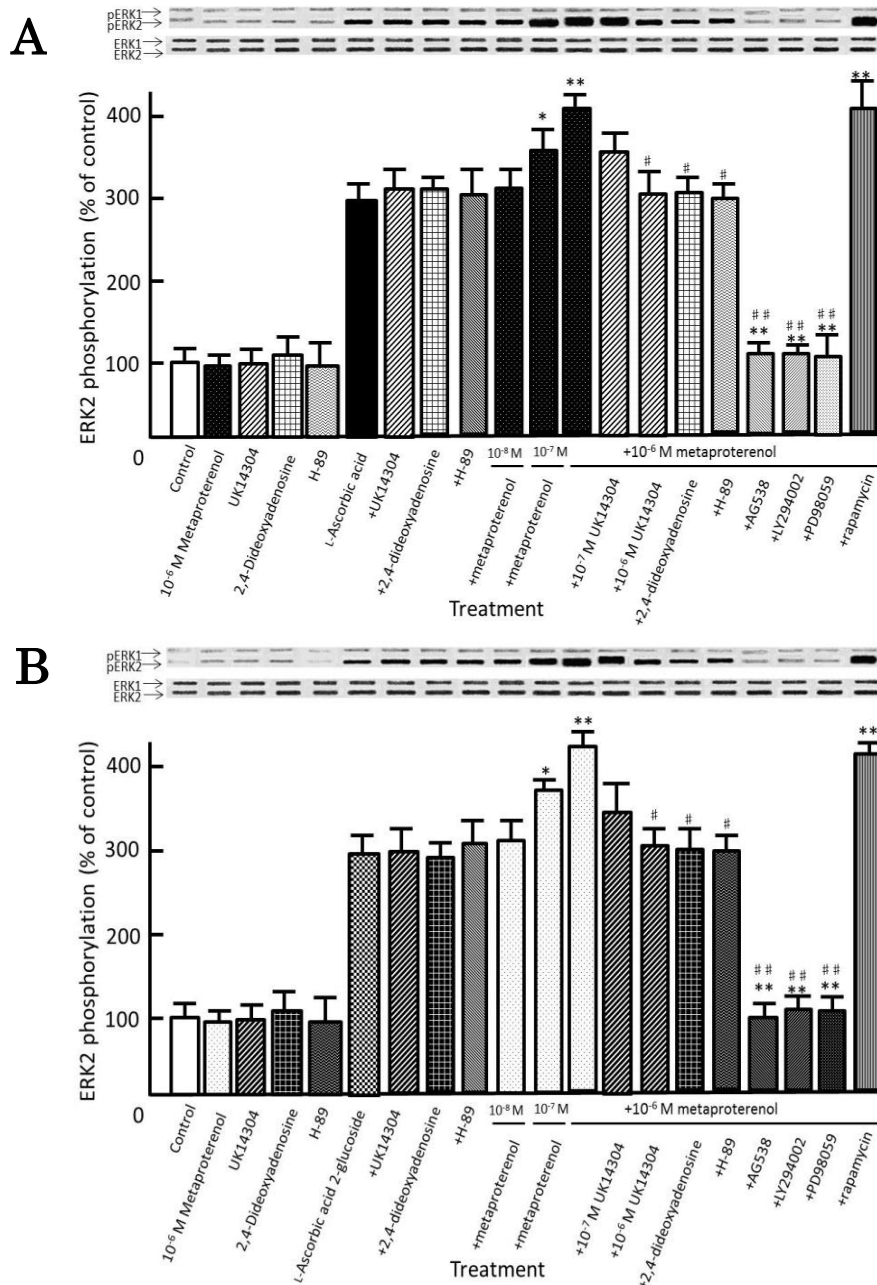


Fig.32 メタプロテレノール存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK2 リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : L-Ascorbic acid B : L-Ascorbic acid 2-glucoside
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 5 分間
薬物処理 : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M),
Metaproterenol(10^{-8} - 10^{-6} M), UK14304(10^{-7} / 10^{-6} M),
2,4-Dideoxyadenosine(10^{-6} M), H-89(10^{-7} M), AG538(10^{-7} M),
LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M), Rapamycin(10 ng/ml)
値 : 平均値±標準誤差 (n=3)
*有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)
#有意差 : L-アスコルビン酸+メタプロテレノール併用群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド+メタプロテレノール併用群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-3-3. 8-Bromo cAMP 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン 2-グルコシド誘発 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

Fig.33 には、cAMP の細胞膜透過性誘導体である 8-bromo cAMP 併用における AsA 及び AsA2G 誘発 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示した。AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性は、8-bromo cAMP の用量(10^{-9} - 10^{-7} M)⁹⁰)に依存して増強を示し、8-bromo cAMP は、Meta と同様のリン酸化増強作用を示した。しかし、この 8-bromo cAMP による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用は、UK14304 (10^{-7} / 10^{-6} M)や 2,4-dideoxyadenosine(10^{-6} M)では、抑制されなかった(Fig.33 A)。

その他の結果は、Meta(Fig.32)を用いた場合と類似の傾向が見られた。H-89(10^{-7} M)は、8-bromo cAMP(10^{-7} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用を AsA 単独レベルにまで抑制した。また AG538(10^{-7} M)、LY294002(10^{-7} M)、PD98259(10^{-6} M)は、それぞれ 8-bromo cAMP(10^{-7} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化に対する増強作用のみならず、AsA 単独による ERK2 リン酸化まで抑制し、ERK2 リン酸化活性を control レベルにまで著しく抑制した。一方、ラパマイシン(10 ng/ml)は、8-bromo cAMP(10^{-7} M)による AsA 誘発 ERK2 リン酸化増強作用に影響を及ぼさなかった(Fig.33 A)。なお、8-bromo cAMP 単独(10^{-7} M)は、肝実質細胞の ERK2 リン酸化に影響を示さなかった(Fig.33 A)。

以上のように、Meta による AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性増強シグナルとの相違点は、8-bromo cAMP による AsA 誘発 ERK2 リン酸化活性増強シグナルの場合は、 α_2 受容体作動薬の UK14304 及び AC 阻害薬の 2,4-dideoxyadenosine との併用により抑制されない点であった。

8-Bromo cAMP による AsA2G(10^{-6} M)誘発 ERK2 リン酸化増強活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果は、AsA(3×10^{-6} M)を用いた場合と同様な結果が得られた (Fig.33 B)。

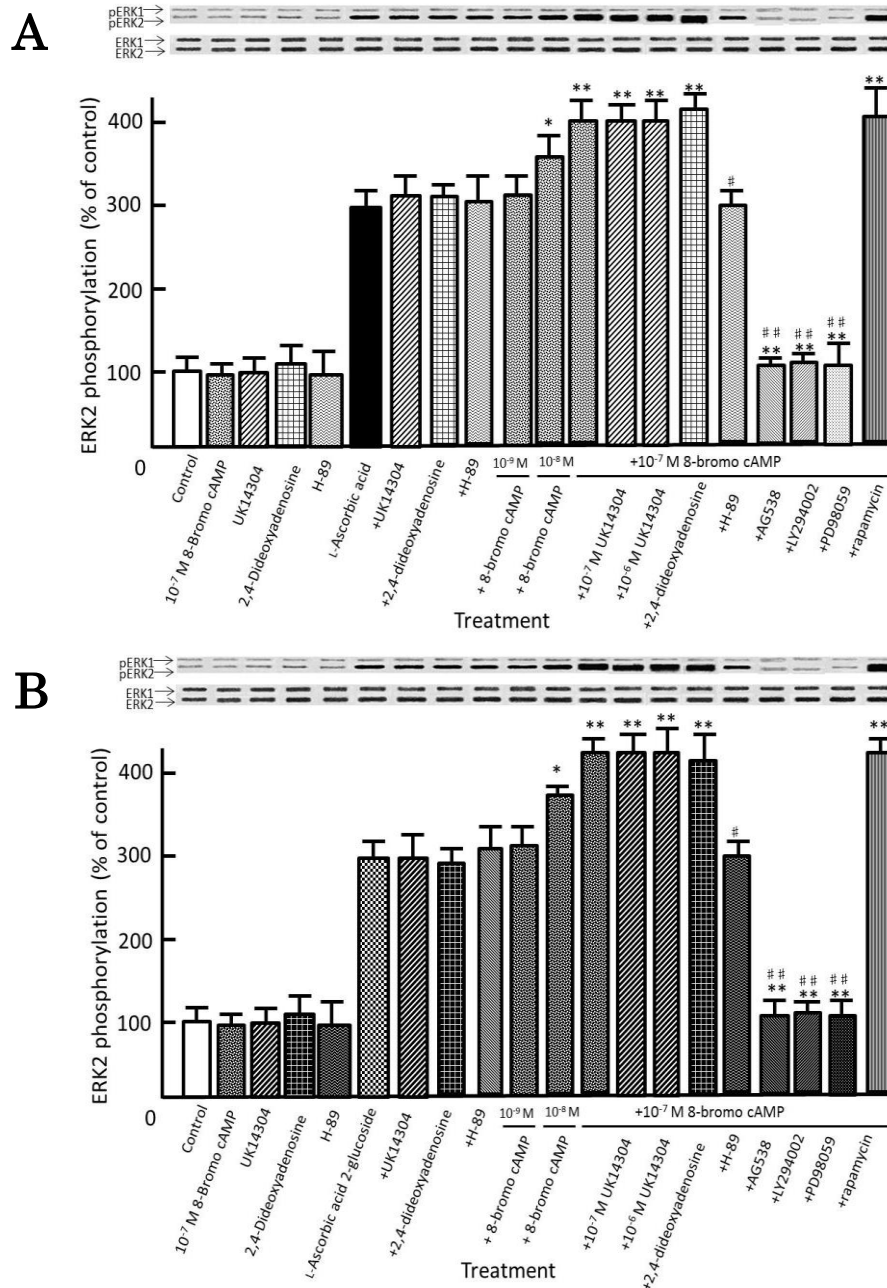


Fig.33 8-Bromo cAMP 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 ERK2 リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

A : L-Ascorbic acid B : L-Ascorbic acid 2-glucoside

細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 5 分間

薬物処理 : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M),
8-Bromo cAMP(10^{-9} - 10^{-7} M), UK14304(10^{-7} / 10^{-6} M),
2,4-Dideoxyadenosine(10^{-6} M), H-89(10^{-7} M), AG538(10^{-7} M),
LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M), Rapamycin(10 ng/ml)

値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

*有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

#有意差 : L-アスコルビン酸 + 8-bromo cAMP 併用群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド + 8-bromo cAMP 併用群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

3-3-4. 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対するメタプロテノールの効果の経時的変化

Fig.34 は、初代培養肝実質細胞における、AsA 及び AsA2G 単独とそれらと Meta 併用による IGF-I-RTK リン酸化活性化の経時的変化を Western blot 解析法により直接測定した結果である。無血清培地に交換した肝実質細胞に AsA($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加すると、IGF-I-RTK リン酸化活性は、その 1 分後から上昇し、添加 3 分後にはピークを迎え、その活性比は control と比較して各々約 3 倍を示した。これに対し、Meta(10^{-6} M)共存下における AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性は増強作用は認められず、AsA 及び AsA2G 単独とほぼ同じ挙動を示した。また、Meta 単独では IGF-I-RTK リン酸化作用は認められなかった(Fig.34 A,B)。

3-3-5. 8-Bromo cAMP 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK 活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

Fig.34 の結果より、IGF-I-RTK リン酸化活性の上昇ピークが AsA($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)及び AsA2G(10^{-6} M)添加 3 分後にみられた。そこで、AsA 及び AsA2G による培養時間 (刺激時間) を 3 分に固定し、8-bromo cAMP や各種特異的シグナル伝達因子阻害薬が、AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性にどのような影響を及ぼすのか検討した。Meta(10^{-6} M)や 8-bromo cAMP(10^{-7} M)は、AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対して有意な増強作用を示さなかった(Fig.34 B, Fig.35 A)。また、UK143 04(10^{-6} M)、2,4-dideoxyadenosine(10^{-6} M)、H-89(10^{-7} M)は、それぞれ AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった。更に、H-89(10^{-7} M)に関しても 8-bromo cAMP(10^{-7} M)共存在下(H-89 + 8-bromo cAMP + AsA)においても、同様に AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった (Fig.35 A)。一方、AG538(10^{-7} M)は、それぞれ AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性を control レベルにまで抑制したが、LY294002(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M)、ラパマイシン (10 ng/ml)は、それぞれ AsA 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に影響を及ぼさなかった(Fig.35 A)。

8-bromo cAMP(10^{-7} M)による AsA2G(10^{-6} M)誘発 IGF-I-RTK 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は、AsA($3 \times 10^{-6} \text{ M}$)を用いた場合と同様な結果が得られた (Fig.35 B)。

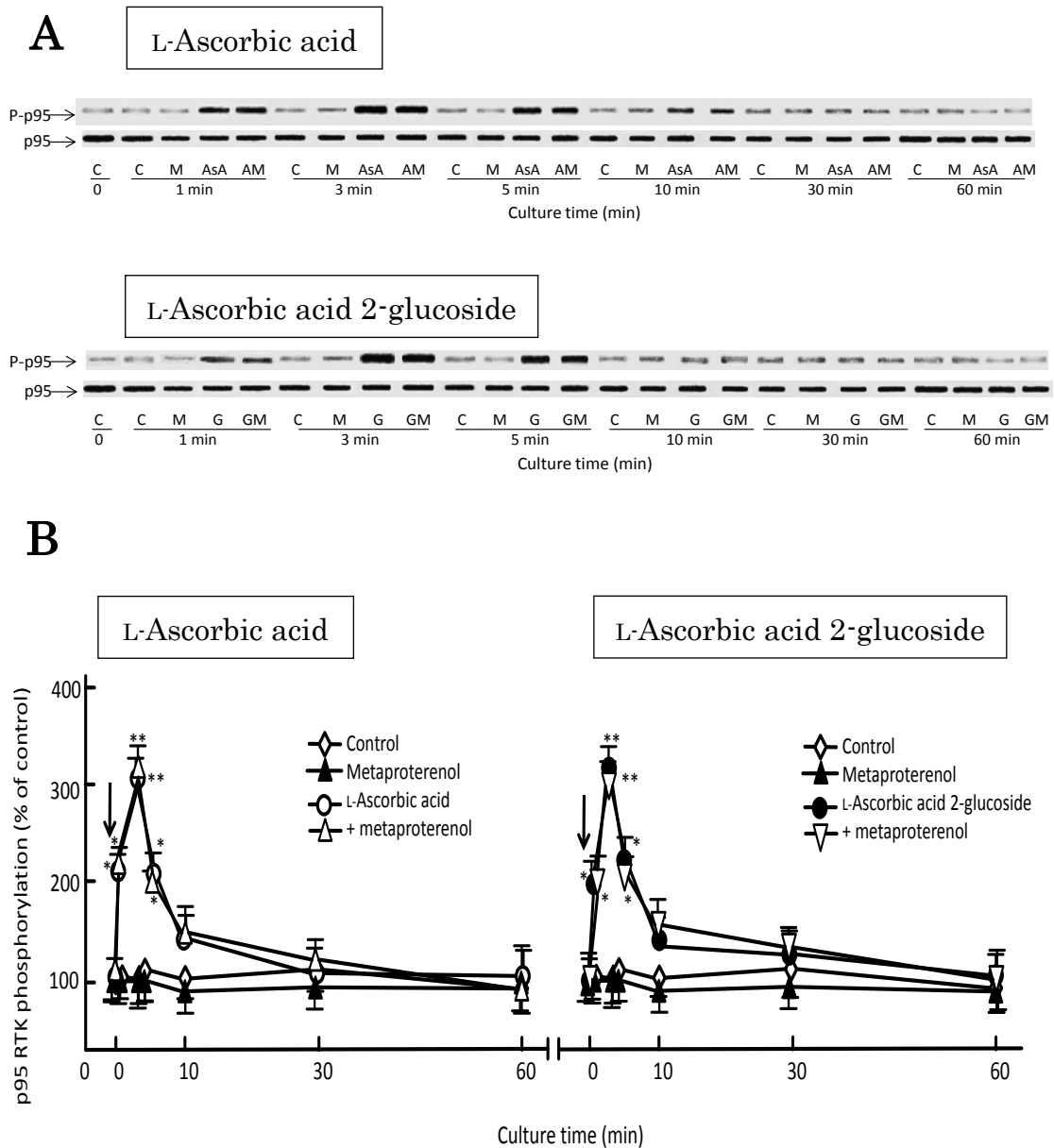


Fig.34 初代培養肝実質細胞における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対するメタプロテレノールの効果の経時的変化

A : Western blotting band B : p95 IGF-I-RTK リン酸化活性
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm²
薬物処理 : C : Control (medium), AsA : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M),
G : L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M), M : Metaproterenol (10^{-6} M),
AM : L-Ascorbic acid (3×10^{-6} M) + metaproterenol (10^{-6} M),
GM : L-Ascorbic acid 2-glucoside (10^{-6} M) + metaproterenol (10^{-6} M)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
有意差 : 各々 control 群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

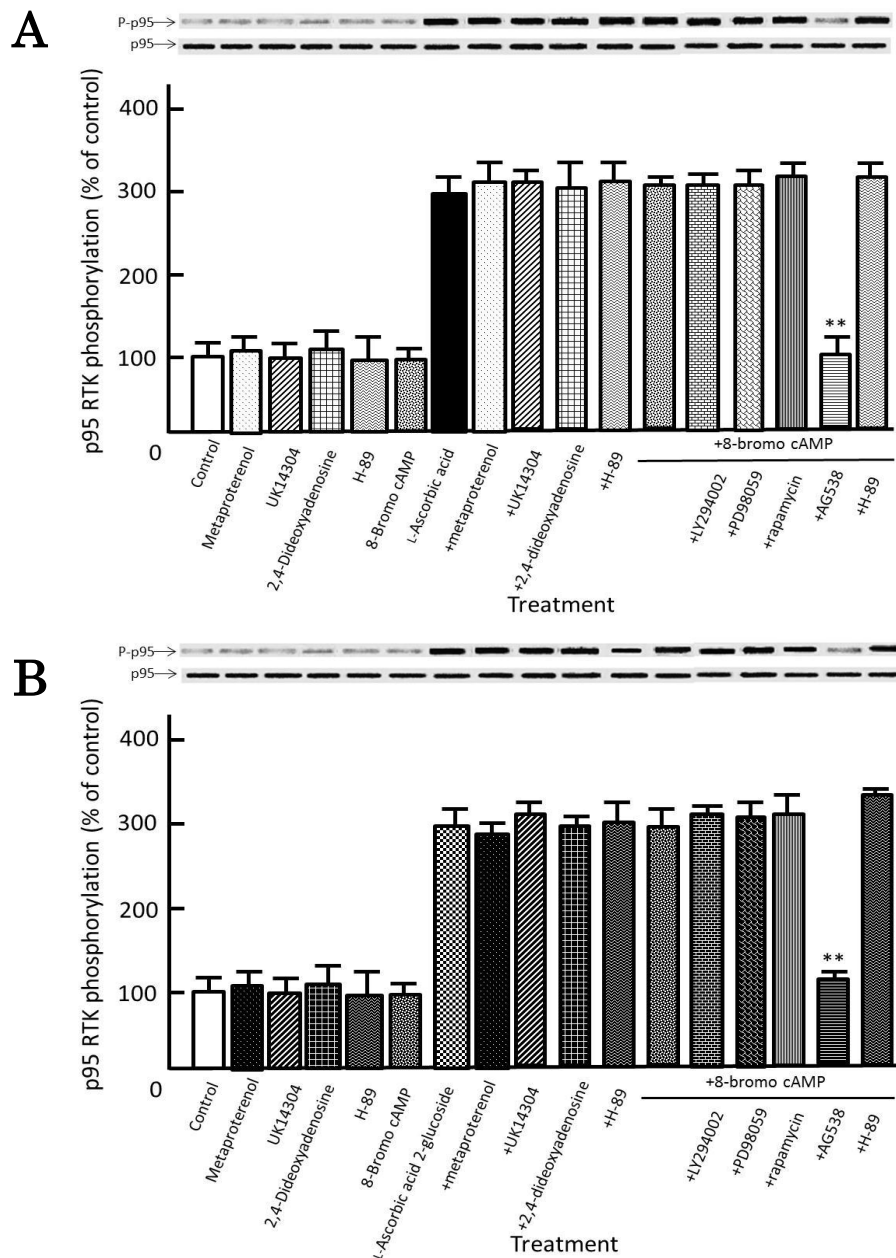


Fig.35 8-Bromo cAMP 存在下における L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に対する特異的シグナル伝因子阻害薬の効果

A : L-Ascorbic acid B : L-Ascorbic acid 2-glucoside
細胞密度 : 3.3×10^4 cells/cm² 培養 (刺激) 時間 : 3 分間
薬物処理 : L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M),
Metaproterenol(10^{-6} M), UK14304(10^{-7} / 10^{-6} M), 2,4-Dideoxyadenosine(10^{-6} M),
H-89(10^{-7} M), 8-bromo cAMP(10^{-7} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M),
Rapamycin(10 ng/ml), AG538(10^{-7} M)
値 : 平均値 ± 標準誤差 (n=3)
* 有意差 : L-アスコルビン酸単独添加群もしくは L-アスコルビン酸 2 グルコシド単独添加群
に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-3-6. 初代培養肝実質細胞におけるメタプロテレノールまたは 8-bromo cAMP による L-アスコルビン酸及び L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び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

前節の結果を踏まえて、初代培養肝実質細胞の Meta 及び 8-bromo cAMP 存在下における AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成能及び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の検討を行った。肝実質細胞を無血清培地交換後、Meta、8-bromo cAMP 及び各種特異的シグナル伝達因子阻害薬存在/非存在下において AsA(3×10^{-6} M)及び AsA2G(10^{-6} M)を添加し、培養して、DNA 合成能及び核数計測を行った。

培養 4 時間の結果を Fig.36(AsA)と Fig.37(AsA2G)に示した。Meta(10^{-6} M)及び 8-bromo cAMP(10^{-7} M)併用により AsA 誘発肝実質細胞 DNA 合成能及び核数の増強が認められた。更に、AG538(10^{-7} M)、LY294002(10^{-7} M)、PD98059(10^{-6} M)、ラパマイシン(10 ng/ml)は、Meta(10^{-6} M)及び 8-bromo cAMP(10^{-7} M)による AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加を、control レベルにまで抑制した。また、2,4-dideoxyadenosine(10^{-6} M)は、Meta(10^{-6} M)による AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加を AsA 単独レベルにまで抑制したが、8-bromo cAMP(10^{-7} M)による AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加には影響を及ぼさなかった。また、H-89(10^{-7} M)は、Meta(10^{-6} M)及び 8-bromo cAMP(10^{-7} M)各々併用においても AsA 誘発 DNA 合成能の上昇及び核数の増加を AsA 単独レベルにまで抑制した。Meta(10^{-6} M)、8-bromo cAMP(10^{-7} M)及び各種特異的シグナル伝達因子阻害薬単独では、DNA 合成能及び核数に影響を及ぼさなかった(Fig.36)。

AsA2G(10^{-6} M)を用いた場合では、AsA を用いた場合の結果と同様な傾向が見受けられた(Fig.37)。

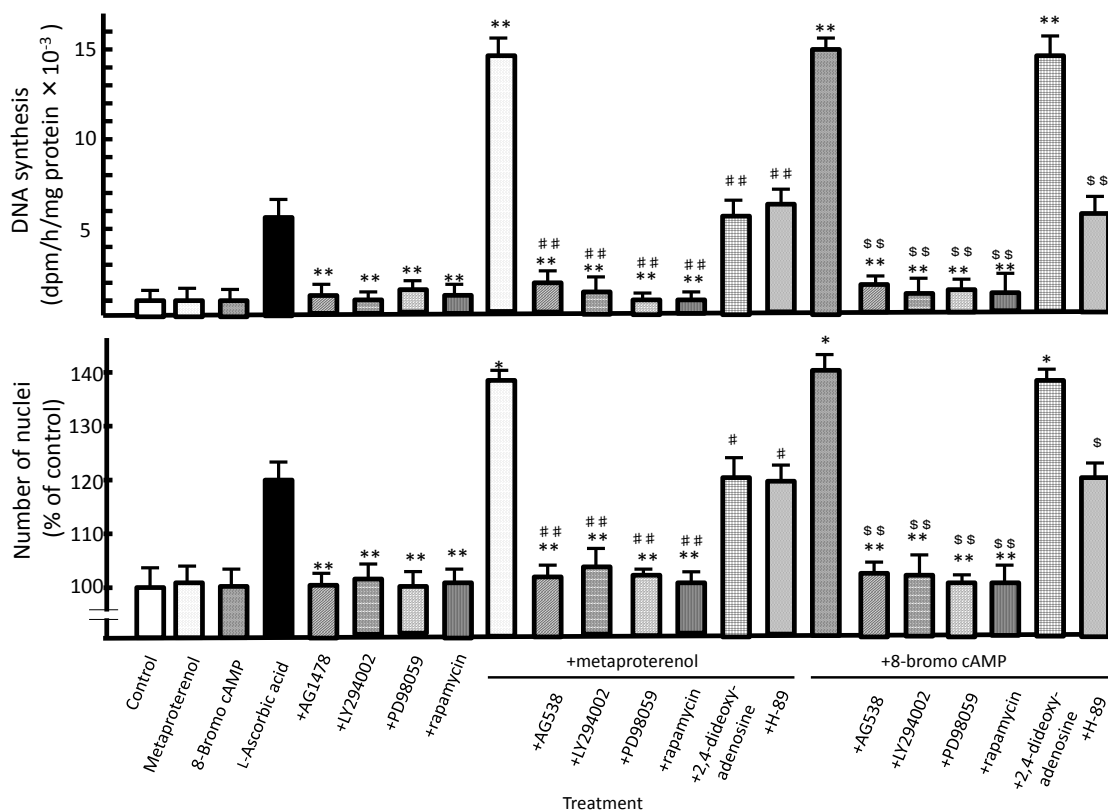


Fig.36 初代培養肝実質細胞におけるメタプロテレノールまたは 8-bromo cAMP による L-アスコルビン酸誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養（刺激）時間： 4 時間

薬物処理： L-Ascorbic acid(3×10^{-6} M), Metaproterenol(10^{-6} M), 8-Bromo cAMP(10^{-7} M), AG538(10^{-7} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M), Rapamycin(10 ng/ml), 2,4-Dideoxyadenosine(10^{-6} M), H-89(10^{-7} M)

値： 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

*有意差： L-アスコルビン酸単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

#有意差： L-アスコルビン酸+メタプロテレノール併用群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

\$有意差： L-アスコルビン酸+8-bromo cAMP 併用群に対する有意差 (\$P<0.05, \$\$P<0.01)

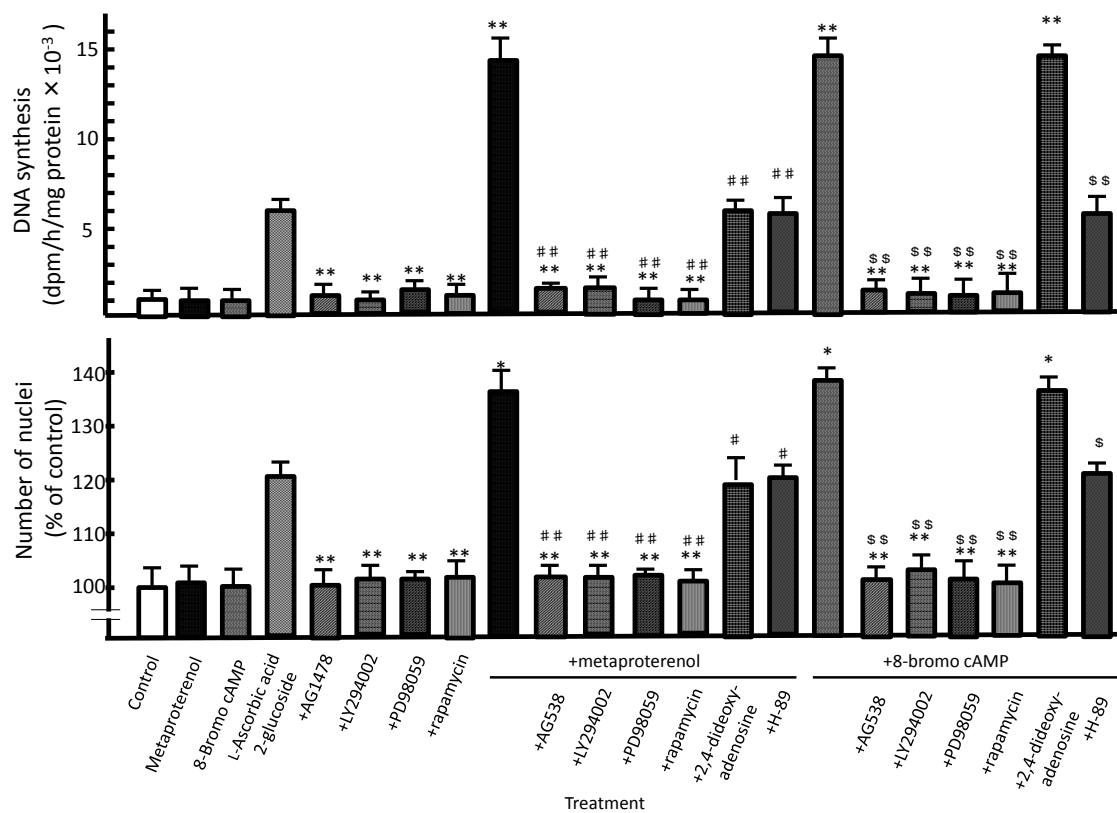


Fig.37 初代培養肝实质細胞におけるメタプロテレンールまたは 8-bromo cAMP による L-アスコルビン酸 2 グルコシド誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 3.3×10^4 cells/cm² 培養（刺激）時間： 4 時間

薬物処理： L-Ascorbic acid 2-glucoside(10^{-6} M), Metaproterenol(10^{-6} M),
8-Bromo cAMP(10^{-7} M), AG538(10^{-7} M), LY294002(10^{-7} M), PD98059(10^{-6} M),
Rapamycin(10 ng/ml), 2,4-Dideoxyadenosine(10^{-6} M), H-89(10^{-7} M)

値： 平均値 ± 標準誤差 (n=3)

*有意差： L-アスコルビン酸 2 グルコシド酸単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

#有意差： L-アスコルビン酸 2 グルコシド+メタプロテレンール併用群に対する有意差 (#P<0.05, ##P<0.01)

\$有意差： L-アスコルビン酸 2 グルコシド+8-bromo cAMP 併用群に対する有意差 (\$P<0.05, \$\$P<0.01)

4. 考察

Fig.22,23 より、 α_1 作動薬の Pheny 及び β_2 作動薬の Meta は、それぞれ初代培養肝実質細胞の AsA 誘発 DNA 合成能及び細胞増殖促進作用を、各々用量に依存して増強した。また、同様の傾向が IGF-I に関して報告されていたため⁵³⁾、AsA 及び AsA2G による IGF-I 受容体を介する細胞増殖促進シグナルは、 α_1 及び β_2 アドレナリン作動性の増強を受けている可能性が支持された。

4-1. 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に対する α_1 アドレナリン作動性調節機構

3-2.で、初代培養肝実質細胞における AsA 及び AsA2G による肝実質細胞増殖促進作用に対する α_1 アドレナリン作動性調節機構の検討を行った。Pheny 併用により AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸活性が増強されたことから、Pheny による AsA 及び AsA2G 誘発肝実質細胞 DNA 合成能、細胞増殖促進作用の増強には、少なくとも ERK2 リン酸化活性の増強が関与していると考えられる (Fig.24,25)。Pheny は、 α_1 受容体を刺激すると Gq タンパク質を介して PLC を活性化させることが知られている。PLC は PIP₂ から IP₃ と DG への変換を触媒する。IP₃ は細胞内に遊離 Ca²⁺濃度を増加させ、DG は PKC を活性化させる。Fig.25,26 の結果では、Pheny や PKC 活性化薬の TPA を AsA や AsA2G と併用すると、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化活性が増強された。この増強効果は、特異的 PKC 阻害薬の GF109203X により、抑制された。これは、肝実質細胞の DNA 合成能及び核数計測 (細胞増殖作用) においても、同様な傾向が認められた (Fig.29,30)。これらの結果により、Pheny による AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化増強作用は、少なくとも PKC の活性化が関与していると考えられる。PLC 阻害薬の U-73122 が、Pheny の効果を抑制したのは、U-73122 が PLC を阻害することにより、Pheny による間接的 PKC 活性化を阻害したためと考えられる。また、カルシウムイオノフォアのイオノマイシンが、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化活性に影響を及ぼさなかったことから、細胞外からの Ca²⁺の流入は、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化増強作用には有意な影響を及ぼさないと考えられる。

また、IGF-I-RTK リン酸化活性に関しては、AsA 及び AsA2G により、IGF-I-RTK リン酸化活性は上昇したが、Pheny や TPA による、AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性を増強することは認められなかった。特異的 IGF-I-RTK 阻害薬の AG538 は、AsA 及び AsA2G による IGF-I-RTK リン酸化

作用を抑制したが、その他の阻害薬では、AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-I-RTK リン酸化活性に変化は認められなかった (Fig.27,28)。これらの結果より、AsA 及び AsA2G の IGF-I 受容体を介する細胞増殖促進シグナルは、RTK の下流から ERK2 の上流の間で α_1 アドレナリン作動性シグナル伝達系の増強を受けていると考えられる (Fig.38)。

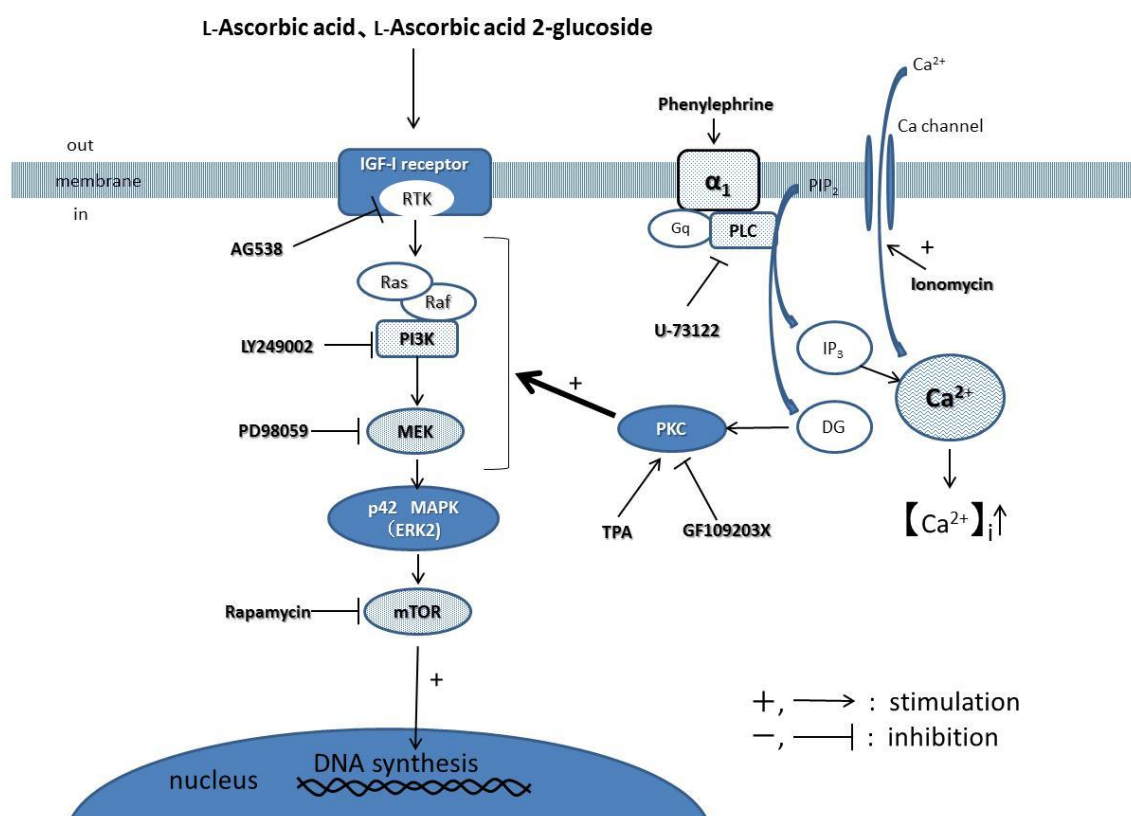


Fig.38 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドによる肝実質細胞増殖促進作用に対する α_1 アドレナリン作動性調節機構

RTK: receptor tyrosine kinase
 PI3K: phosphoinositide 3-kinase
 MEK: MAPK/ERK kinase
 ERK: extracellular signal-regulated kinase
 mTOR: mammalian target of rapamycin

PLC: phospholipase C
 IP₃: inositol triphosphate
 DG: diacylglycerol
 PKC: protein kinase C

4-2. 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に対する β_2 アドレナリン作動性調節機構

3-3.では、3-2.と同様の方法で初代培養肝実質細胞における AsA 及び AsA2G による細胞増殖促進作用に対する β_2 アドレナリン作動性調節機構の検討を行った。Meta 併用により AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化活性が増強されたことから、Meta による AsA 及び AsA2G により誘発された肝実質細胞の DNA 合成及び細胞増殖促進作用の増強には、少なくとも ERK2 リン酸化活性の増強が関与していると考えられる (Fig.31,32)。Meta は、 β_2 受容体を刺激すると Gs タンパク質を介して AC を活性化させることが知られている。活性化された AC は ATP から cAMP を合成させ、これが PKA を活性化させる。一方、この経路には α_2 受容体応答のような抑制系も存在し、この受容体が刺激されると Gi タンパク質を介して AC は抑制され、細胞内 cAMP は減少する。この2つの経路により PKA の活性は調節されている。Fig.32,33 の結果では、Meta や PKA 活性化薬の 8-bromo cAMP を併用すると、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化活性が増強された。しかし、これらの増強作用は、PKA 阻害薬の H-89 により、抑制された。これは DNA 合成能及び核数計測 (細胞増殖作用) でも同様な傾向が見受けられた (Fig.36,37)。これらの結果により、AsA 及び AsA2G 誘発 ERK2 リン酸化増強作用は、少なくとも PKA の活性化が関与していると考えられる。 α_2 作動薬の UK14304 や AC 阻害薬の 2,4-dideoxyadenosine が、Meta の効果を抑制したのは、UK14304 や 2,4-dideoxyadenosine が、間接的及び直接的に AC を阻害することにより、Meta による細胞内 cAMP 合成が阻害されたためと考えられる。

一方、IGF-I-RTK リン酸化活性に関しては、Meta や 8-bromo cAMP では、AsA 及び AsA2G 誘発 IGF-IRTK リン酸化活性に対する増強作用は認められなかった。

また、各種特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果も 3-2-4.及び 3-2-5.の結果と同様の傾向が見受けられた。特異的 IGF-I-RTK 阻害薬の AG538 は、AsA 及び AsA2G による IGF-I-RTK リン酸化作用を抑制したが、その他の阻害薬では、AsA 及び AsA2G 誘発 RTK リン酸化活性に変化は認められなかった (Fig.34,35)。

これらの結果より、AsA 及び AsA2G の細胞増殖促進シグナルは、RTK の下流から ERK2 の上流で α_2 及び β_2 アドレナリン作動性シグナル系の調節を受けていると考えられる (Fig.39)。

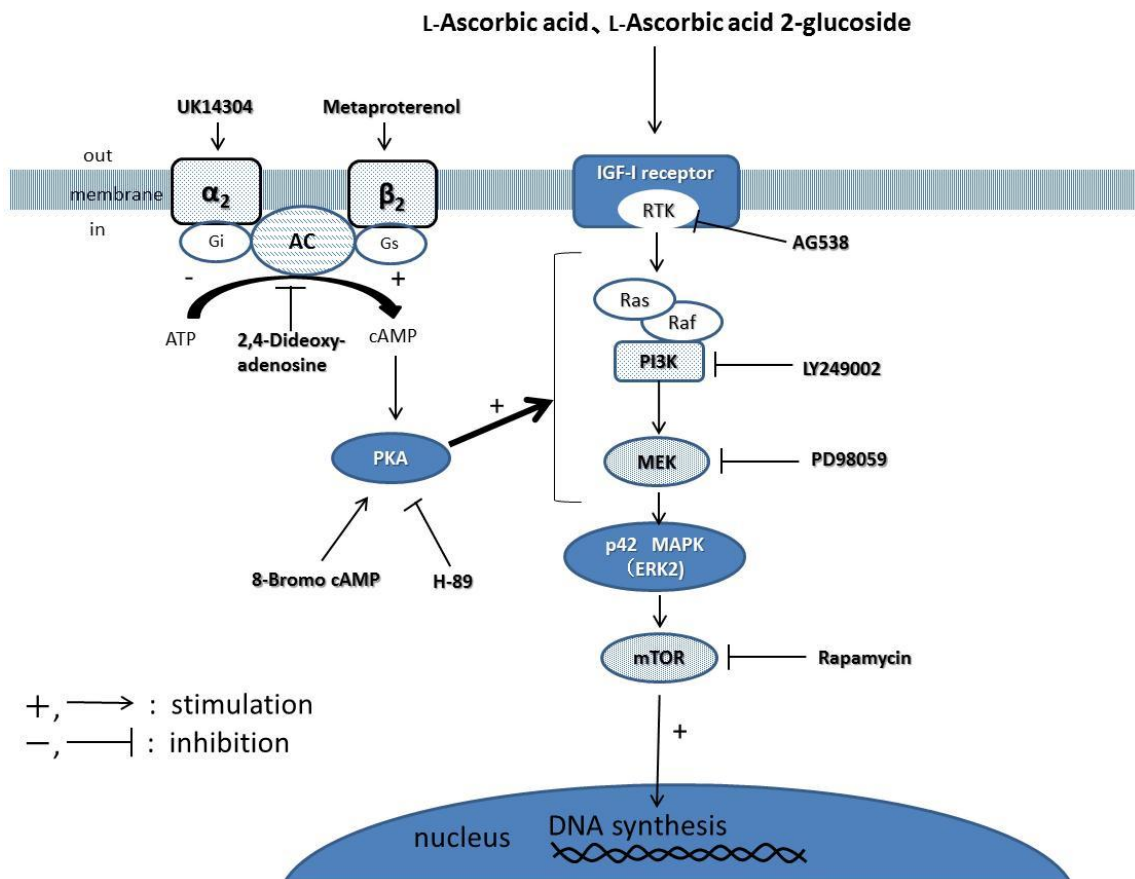


Fig.39 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドによる肝実質細胞増殖促進作用に対する β_2 アドレナリン作動性調節機構

RTK: receptor tyrosine kinase

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

MEK: MAPKK/ERK kinase

ERK: extracellular signal-regulated kinase

mTOR: mammalian target of rapamycin

AC: adenylate cyclase

PKA: protein kinase A

4-3. 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機構と PKC 及び PKA との相互作用

MAP キナーゼ経路は、古くから知られている細胞増殖に関連するシグナル伝達経路であり、増殖因子が細胞膜に存在する受容体に結合すると、アダプタータンパク質や Ras を経由して Raf→MEK→MAPK(ERK1/2)というリン酸化反応により MAPK 経路が活性化する⁹¹⁾。Ras は、膜の内部表面上に存在する G タンパク質の一種であり、これは、エフェクターによっていくつかの経路を活性化する分岐点となっている⁹²⁾。その1つに Raf があり、哺乳動物では、A-Raf、B-Raf、C-Raf (Raf-1) の3つのアイソフォームに分類することができる。これら3つのアイソフォームは、ERK に対する活性化の強度は各々異なるものの、3つとも ERK を活性化することができる^{93)~95)}。最近では、Raf とアドレナリン作動性調節機構などの経路との相互作用について注目されており、PKA (または cAMP) や PKC などが、Raf 活性を調節することにより、ERK 活性や細胞増殖を調節しているのではないかと考えられている。

近年、PKC 及び PKA と Raf との関連性についても検討されている。PKC は、間接的及び直接的に Raf-1 の活性化に関与しているといわれており、PKC が Raf-1 を活性化することにより、増殖因子の細胞増殖促進シグナルを増強していると考えられている^{94),95)}。また、最近では、Raf-1 を抑制するタンパク質 (raf kinase inhibitor protein : RKIP) の関与も報告されている。RKIP は、Raf-1 を抑制することにより、MAP キナーゼ経路を制御しているが、PKC 活性化により、RKIP が抑制される。これにより、Raf-1 の抑制が解除され、結果的に MAP キナーゼ経路のシグナルが増強し、増殖因子による細胞増殖が増強すると考えられている(Fig.40)^{94),96),97)}。

一方、PKA は、Raf-1 を抑制するが、B-Raf を活性化するといわれており、PC12 細胞 (ラット副腎由来褐色腫細胞) やメラノーマ細胞などは、cAMP や PKA が活性化されることにより、ERK の活性が増強したとの報告が挙げられている(Fig.40)⁹²⁾。

以前の報告で、初代培養肝実質細胞における各増殖因子の細胞増殖シグナルは、EGF は β_1 作動性の増強を受け、PDGF は α_1 作動性の増強を受けるが、IGF-I は α_1 作動性と β_2 作動性の両方のシグナル伝達系を介する増強を受けていることが示唆された^{53),78),79)}。肝実質細胞でも Raf と PKC 及び PKA が相互作用していると仮定すると、EGF は B-Raf を、PDGF は Raf-1 を、IGF-I は B-Raf と Raf-1 の両方を経由し、細胞増殖を促進させている可能性が考えられる。従って、AsA 及び AsA2G は IGF-I 様の肝実質細胞増殖促進作用を示したことから、これらの細胞増殖促進シグナルは、B-Raf と Raf-1 の両方を経由しており、 α_1 及

び β_2 受容体応答により、活性化された PKC 及び PKA が、それぞれ B-Raf と Raf-1 を活性化させ、肝実質細胞増殖促進作用を増強するのではないかと推察される (Fig.40)。

いずれにせよ、今回の本研究の結果のみでは、AsA 及び AsA2G による肝実質細胞増殖促進機構と PKC 及び PKA を介する Ras/Raf 系との相互作用について証明することは困難であり、今後、更に、詳細な検討が必要であるが、上記の報告等を参考にすると、その可能性は大きいと考えられる。

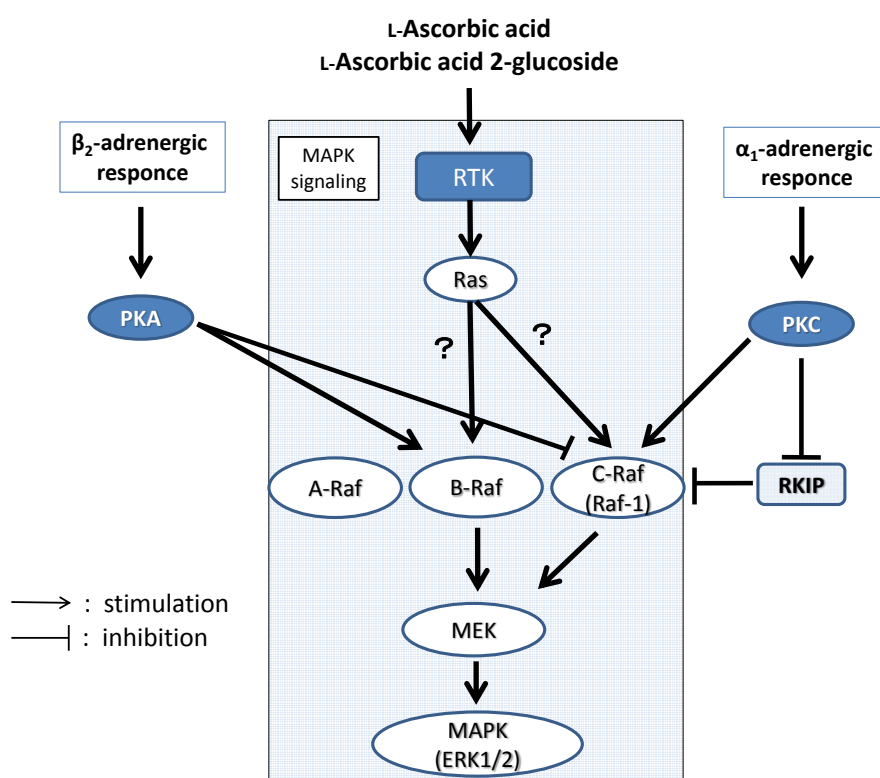


Fig.40 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドによる肝実質細胞増殖促進機構とPKC及びPKAとの相互作用

第3篇 結論

本実験結果を総合的に解釈すると、L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドによる初代培養肝実質細胞の増殖促進作用機構は、Fig.41 のように考えられる。

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、初代培養肝実質細胞膜上に発現している IGF-I 受容体に結合して、これを刺激することにより、IGF-I-RTK、PI3K、MEK、ERK2、mTOR を順次活性化し、核内へ増殖シグナルを伝える。その結果、DNA 合成を活性化させ、肝実質細胞の増殖を促進していると考えられる。また、この 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シグナルは、IGF-I-RTK の下流から ERK2 の上流の間で α_1 及び β_2 アドレナリン作動性の増強作用を受けていることが考えられる。更に、その増強には、それぞれ PKC もしくは PKA の活性化が不可欠であると考えられる。

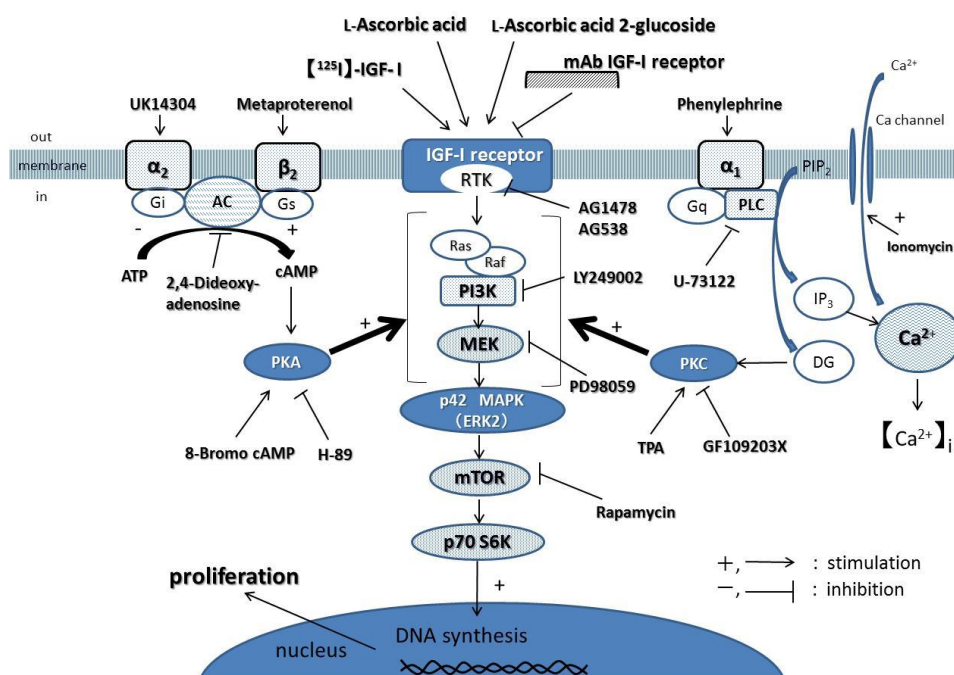


Fig.41 L-アスコルビン酸及びL-アスコルビン酸2グルコシドの初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構モデル

IGF-I: insulin-like growth factor I
 RTK: receptor tyrosine kinase
 PI3K: phosphoinositide 3-kinase
 MEK: MAPKK/ERK kinase
 ERK: extracellular signal-regulated kinase
 mTOR: mammalian target of rapamycin
 p70S6K: 70-kDa ribosomal protein S6 kinase

PLC: phospholipase C
 IP₃: inositol triphosphate
 DG: diacylglycerol
 PKC: protein kinase C
 AC: adenylate cyclase
 PKA: protein kinase A

ビタミン C として知られる L-アスコルビン酸は、身近な薬物でありながら、多様な薬理作用を有するビタミンである。その主な薬理作用は、抗酸化作用であり、生体内に発生した活性酸素種の消去を行っている。また、L-アスコルビン酸は、生体内の様々なヒドロキシル化反応にも関与しており、アドレナリンや L-カルニチン、コラーゲンなどの合成に必須である。更に、近年、L-アスコルビン酸は、様々なタイプの細胞の増殖を促進させることが報告されており、その新しい薬理作用が注目されている。

本研究では、初代培養肝実質細胞を用いて L-アスコルビン酸による肝実質細胞増殖促進作用機構を検討した。その結果、L-アスコルビン酸は、比較的少量で初代培養肝実質細胞の増殖を促進し、更に、その作用は L-アスコルビン酸が肝実質細胞膜上に存在する IGF-I 受容体を直接刺激することにより、効果を現していることが明らかとなった。また、この L-アスコルビン酸による肝実質細胞増殖促進作用は α_1 及び β_2 アドレナリン作動性の増強作用の調節を受けていることも明らかとなった。本研究を通して、L-アスコルビン酸による肝実質細胞の増殖促進や抑制などの調節機構を詳しく研究することにより、肝再生現象に関わる増殖因子や増殖修飾因子などの作用メカニズムの一端を解明することが出来た。また、本研究から得られた基礎的データは、臓器形成や癌化の仕組みの解明など様々な研究分野への応用が期待される。

本研究により証明した L-アスコルビン酸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-アスコルビン酸が直接 IGF-I 受容体に結合して効果を示すものと考えられることから、肝実質細胞だけでなく、IGF-I 受容体が発現してい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。更に、上記のような L-アスコルビン酸による肝庇護作用や創傷治癒作用は、 α_1 及び β_2 アドレナリン受容体作動薬を併用することにより、治療効果を高めることも期待できる。

昨今、増殖因子を用いた臨床応用は進みつつあるが、いくつか問題点がある。その一つに増殖因子による副作用が挙げられる。既存の増殖因子は、様々な細胞に対し多彩な作用をする可能性があり、予測できない副作用を起こす恐れがある。これに対し、L-アスコルビン酸は、水溶性が高いビタミンであることから体内に蓄積しにくいいため、副作用も少なく、比較的安全性の高い薬物である。また、L-アスコルビン酸は種々の増殖因子よりもかなり安価な薬物であるため、

コスト面からも既存の増殖因子よりも使いやすい薬物であると考えられる。そのため、L-アスコルビン酸は、安価で副作用の少ない細胞増殖因子療法薬として臨床応用することが期待できると考えられる。

謝辞

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

本論文作成にあたりご高閲とご教授を賜りました、副査 城西大学薬学部教授 荒田 洋一郎 先生、及び城西大学薬学部 教授 従二 和彦 先生に深く感謝の意を表します。

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

参考文献

- 1) 中村 敏一、初代培養肝実質細胞実験法 (1989)、学会出版センター
- 2) Fausto, N., Campbell, J. S., Riehle, K. J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology*, **43**, S45-S53.
- 3) Michalopoulos, G. K., DeFrances, M.C., 1997. Liver regeneration. *Science*, **276**, 60-66.
- 4) Higgins, G. H., Anderson, R. M., 1931. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial removal. *Arch. Pathol.*, **12**, 186-202.
- 5) Webber, E. M., Bruix, J., Pierce, R. H., Fausto, N., 1998. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*, **28**, 1226-1234.
- 6) Fausto, N., 2000. Liver regeneration. *J. Hepatol.*, **32**, 19-31.
- 7) 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.
- 8) Malik, R., Mellor, N., Selden, C., Hodgson, H. 2003. Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy. *Hepatology*, **37**, 79-86.
- 9) 山羽 義貴、1984. 肝疾患における血清甲状腺ホルモン, 3,5,3'-Triiodothyronine (T₃), Thyroxine (T₄), 3,3',5'-Triiodothyronine(rT₃)の動態、日本消化器病学会雑誌、**81**, 1214-1222.
- 10) Michalopoulos, G. K., 1990. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J.*, **4**, 176-87.

- 11) Diehl, A. M., Rai, R. M., 1996. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.*, **10**, 215-27.
- 12) 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**, 7229-33.
- 13) Michalopoulos, G. K., 1994. Control mechanisms of liver regeneration. *J. Gastroenterol.*, **7**, 23-9.
- 14) Michalopoulos, G. K., 2007. Liver regeneration. *J. Cell. Physiol.*, **213**, 286-300.
- 15) Seglen, P. D., 1975. Preparation of isolated liver cells. *Methods Cell Biol.*, **13**, 29-83.
- 16) 荻原 政彦、2000. 肝実質細胞の増殖を促進する因子の作用機構、城西大学生命科学研究センター報告、**4**, 9-19.
- 17) Lima, C. C. *et al.*, 2009. Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rat. *Braz. J. Biol.*, **69**, 1195-201.
- 18) Wu, Y. L., *et al.*, 1998. Stimulation of hepatocyte growth factor production by ascorbic acid and its stable 2-glucoside. *Growth Horm. IGF Res.*, **8**, 421-8.
- 19) Potdar, P. D., *et al.*, 2010. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX2. *Hum. Cell*, **23**, 152-5.
- 20) Padayatty, S. J., Levine, M., 2001. New insights into the physiology and pharmacology of vitamin C. *CMAJ*, **164**, 353-5.
- 21) 村田 晃、1999. ビタミン C の発見と新展開、*Vitamins (Japan)*, **73**, 95-98.

- 22)西川 仁、石川 考博、2009. D-ガラクトツロン酸/L-ガラクトン酸経路は光合成生物に普遍的なアスコルビン酸生合成経路だろうか? *Vitamins (Japan)*, **83**, 152-154.
- 23)Nishikimi, M., *et al.*, 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxdase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J. Biol. Chem.*, **269**, 13685-8.
- 24)Savini, I., *et al.*, 2008. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, **34**, 347-55.
- 25)Li, Y., Schellhorn, H. E., 2007. New developments and novel therapeutic perspectives for Vitamin C. *J. Nutr.*, **137**, 2171-84.
- 26)Arrigoni, O., De, Tullio, M., C., 2002. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1569**, 1-9.
- 27)石神 昭人、ビタミンCの事典 (2011)、東京堂出版
- 28)Kónya, C., Ferdinandy, P., 2006. Vitamin C: new role of the old vitamin in the cardiovascular system? *Br. J. Pharmacol.*, **147**, 125-7.
- 29)Rebouche, C. J., 1991. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, **54**, 1147S-1152S.
- 30)Mandl, J., Szarka, A., Bánhegyi, G., 2009. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 1097-110.
- 31)Shibayama, H., *et al.*, 2008. Effect of novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-*O*-L-ascorbyl phosphate on human dermal fibroblasts: increased collagen synthesis and inhibition of MMP-1. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 563-8.

- 32) Yang, J., *et al.*, 2006. Aqueous humor enhances the proliferation of rat retinal precursor cells in culture, and this effect is partially reproduced by ascorbic acid. *Stem Cells*, **24**, 2766-75.
- 33) Alcaín, F. J., Burón, M. I., 1994. Ascorbate on cell growth and differentiation. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26**, 393-8.
- 34) Fukushima, S., *et al.*, 1988a. L-ascorbic acid amplification of second-stage bladder carcinogenesis promotion by NaHCO₃. *Cancer Res.*, **48**, 6317-6320.
- 35) Belin, S., Kaya, F., Duisit, G., Giacometti, S., Ciccolini, J., Fontés, M., 2009. Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression. *PLoS One*, **4**, 1-8.
- 36) Nakamura, T., Tomita, Y., Ichihara, A., 1983. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.*, **94**, 1029-1035.
- 37) 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.
- 38) Morley, C. G. D., Kingdon, H. S., 1972. Use of ³H-thymidine for measurement of DNA synthesis in rat liver—a warning. *Anal. Biochem.*, **45**, 298-305.
- 39) Kimura, M., Ogihara, M., 1997a. Density-dependent proliferation of adult rat hepatocytes in primary culture induced by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents. *Eur. J. Pharmacol.*, **324**, 267-276.
- 40) Lee, M. B., Paxman, S., 1972. Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein. *Anal. Biochem.*, **47**, 184-192.

- 41) Li, S., Ferber, A., Miura, M., Baserga, R., 1994. Mitogenicity and transforming activity of the insulin-like growth factor-I receptor with mutation in tyrosine kinase domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32558-32564.
- 42) Okamoto, H., Kimura, M., 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-alpha. *Eur. J. Pharmacol.*, **14**, 12-19.
- 43) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, **76**, 4350-4354.
- 44) Caro, J. F., Poulos, J., Ittoop, O., Pories, W.J., Flickinger, E.G., Sinha, M.K., 1988. Insulin-like growth factor I binding in hepatocytes from human liver, human hepatoma, and normal, regenerating, and fetal rat liver. *J. Clin. Invest.*, **81**, 976-981.
- 45) Leviziki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*, **267**, 1782-1788.
- 46) 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-L-benzo-pyran-4-one(LY294002). *J. Biol. Chem.*, **269**, 5241-5248.
- 47) Alessi, D., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D., Staltiel, A., 1995. PD98059 is a specific inhibitor of the activation of MAP kinase kinase-1 *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27489-27494.
- 48) Chung, J., Kuo, C.J., Crabtree, G.R., Blenis, J., 1992. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of the signaling by the 70 kD S6 protein kinase. *Cell*, **69**, 1227-1236.
- 49) 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.

- 50) Blum, G., Gazit, A., Levitzki, A., 2000. Substrate competitive inhibitors of IGF-I receptor kinase. *Biochemistry*, **39**, 15705-15712.
- 51) Kimura, M., Ogihara, M., 1997b. Proliferation of adult rat hepatocytes by hepatocyte growth factor is potentiated by both phenylephrine and metaproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 1146-1154.
- 52) Andus, T., Bauer, J., Gerok, W., 1991. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*, **13**, 364-375.
- 53) 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.
- 54) Kimura, M., Ogihara, M., 1999. Stimulation by transforming growth factor-alpha of DNA synthesis and proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures: modulation by alpha- and beta-adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 171-180.
- 55) Ullrich, A., Gray, A., *et al.* 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.*, **5**, 2503-2512.
- 56) Humbel, R. E., 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 445-462.
- 57) Lund, P. K., Mosts-Staats, B. M., Hynes, M. A., Simmons, J. G., Jansen, M., D' Ercoles, A. J., Van Wyk, J. J., 1986. Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II mRNAs in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.*, **261**, 14539-14544.
- 58) 宮園浩平、菅村和夫、サイトカイン・増殖因子 改訂版 (1998)、羊土社
- 59) Davis, R. J., 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14553-14556.

- 60) Zha, J., Lackner, M. R., 2010. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, **16**, 2512-2517.
- 61) Melmed, S., Yamashita, S., Yamasaki, H., Fagin, J., Namba, H., Yamamoto, H., Weber, M., Morita, S., Webster, J., Prager, D., 1996. IGF-I receptor signaling: lessons from the somatotroph. *Recent Prog. Horm. Res.*, **51**, 189-216.
- 62) Kurmasheva, R. T., Houghton, P. J., 2006. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1766**, 1-22.
- 63) Blume-Jensen, P., Hunter, T., 2001. Oncogenic kinase signaling. *Nature*, **411**, 355-365.
- 64) Frémin, C., *et al.* 2012. The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses. *J. Cell. Physiol.*, **227**, 59-69.
- 65) Frémin C., *et al.* 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.
- 66) Ching, C. B., *et al.* 2010. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Lab Invest.*, **90**, 1406-14.
- 67) Lane, H. A., *et al.* 1993. p70^{s6k} function is essential for G1 progression. *Nature*, **363**, 170-172.
- 68) Fenton, T. R., Gout, I.T. 2010. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 47-59.
- 69) Hutchison, M. R., Bassett, M. H., White, P. C., 2007. Insulin-like growth factor-I and fibroblast growth factor, but not growth hormone, affect growth plate chondrocyte proliferation. *Endocrinology*, **148**, 3122-30.

- 70) Fottner, C., Minnemann, T., Kalmbach, S., Weber, M. M., 2006. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor in human pheochromocytomas. *J. Mol. Endocrinol.*, **36**, 279-87.
- 71) 井村 裕夫、岡 哲雄、芳賀 達也、岸本 英爾、レセプター —基礎と臨床— (1993)、朝倉書店
- 72) Gustafson, T.A., Rutter, W.J., 1990. The cysteine-rich domains of the insulin and insulin-like growth factor I receptors are primary determinants of hormone binding specificity. Evidence from receptor chimeras. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18663-7.
- 73) 小池 勝夫、荻原 政彦、薬理学 (2008)、朝倉書店
- 74) Sandnes, D., Sand, T.E., Sager, G., Brønstad, G.O., Refsnes, M. R., Gladhaug, I. P., Jacobsen, S., Christoffersen, T., 1986. Elevated level of beta-adrenergic receptors in hepatocytes from regenerating rat liver. Time study of [¹²⁵I]iodocyanopindolol binding following partial. *Exp. Cell Res.*, **165**, 117-26.
- 75) Cruise, J. L., Knechtle, S. J., Bollinger, R. R., Kuhn, C., Michalopoulos, G., 1987. Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology*, **7**, 1189-94.
- 76) Cruise, J. L., Michalopoulos, G., 1985. Norepinephrine and epidermal growth factor: dynamics of their interaction in the stimulation of hepatocyte DNA synthesis. *J. Cell. Physiol.*, **125**, 45-50.
- 77) Houck, K. A., Michalopoulos, G. K., 1989. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 503-9.
- 78) 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**, 1542-52.

- 79) 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**, 980-6.
- 80) Kajiyama, Y., Ui, M., 1998. Differential mitogenic actions of alpha 1- and beta-adrenergic agonists on rat hepatocytes. *Cell. signal*, **10**, 241-51.
- 81) Thompson, A. K., Mostafapour, S. P., Denlinger, L. C., Bleasdale, 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.*, **15**, 23856-62.
- 82) Liu, C., Hermann, T. E., 1978. Characterization of ionomycin as calcium ionophore. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5892-4.
- 83) Toullec, D., et al. 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15771-81.
- 84) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **257**, 7847-51.
- 85) Smith, K. B., Losonczy, I., Sahai, A., Pannerselvam, M., Fehnel, P., Salomon, D. S., 1983. Effect of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) on the growth inhibitory and increased phosphatidylinositol (PI) responses induced by epidermal growth factor (EGF) in A431 cells. *J. Cell. Physiol.*, **117**, 91-100.
- 86) Ogihara, M., 1996. Cell-density-dependent expression of the beta-adrenergic response by epidermal growth factor (EGF) in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 752-7.

- 87) Remaury, A., Larrouy, D., Daviaud, D., Rouot, B., Paris, H., 1993. Coupling of the alpha 2-adrenergic receptor to the inhibitory G-protein Gi and adenylate cyclase in HT29 cells. *Biochem. J.*, **292**, 283-8.
- 88) Holgate, S. T., Lewis, R. A., Austen, K. F., 1980. Role of adenylate cyclase in immunologic release of mediators from rat mast cells: agonist and antagonist effects of purine- and ribose-modified adenosine analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 6800-4.
- 89) Zuscik, M. J., Puzas, J. E., Rosier, R. N., Gunter, K. K., Gunter, T. E., 1994. Cyclic-AMP-dependent protein kinase activity is not required by parathyroid hormone to stimulate phosphoinositide signaling in chondrocytes but is required to transduce the hormone's proliferative effect. *Arch. Biochem. Biophys.*, **315**, 352-61.
- 90) Derubertis, F. R., Zenser, T., 1976. Activation of murine lymphocytes by cyclic guanosine 3',5'-monophosphate: specificity and role in mitogen activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **428**, 91-103.
- 91) 秋山 徹、シグナル伝達がわかる (2001)、羊土社
- 92) Dumaz, N., Marais, R., 2005. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. *FEBS J.*, **272**, 3491-504.
- 93) Hagemann, C., Rapp, U. R., 1999. Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.*, **253**, 34-46.
- 94) Rozengurt, E., 2007. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J. Cell. Physiol.*, **213**, 589-602.
- 95) Marais, R., Light, Y., Mason, C., Paterson, H., Olson, M. F., Marshall, C. J., 1998. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science*, **280**, 109-12.
- 96) Lorenz, K., Lohse, M. J., Quitterer, U., 2003. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature*, **426**, 574-9.

97) Corbit, K. C., Trakul, N., Eves, E. M., Diaz, B., Marshall, Rosner, M. R., 2003. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13061-8.