

学位論文要旨

S-allyl-L-cysteine の成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する 増殖促進作用機構に関する研究

栗原 一樹

生体肝移植は、末期肝疾患の治療法として確立され、肝疾患患者の増加や移植技術の進歩に伴い、その例数は右肩上がりに増加している。その一方、ドナーの約 4 割が将来の健康への不安を感じていると報告されている。したがって、ドナーおよびレシピエントの QOL の向上または改善のために肝再生促進薬の開発が期待されている。

肝臓は、代謝の中心的な役割を果たす臓器であり、生体の恒常性維持に必要不可欠である。さらに、肝臓は、他の臓器ではみられない非常に高い自己増殖能を有している。この機能は肝再生と呼ばれ、肝臓に何らかの損傷が生じた時に起こる。しかし、その詳細な機構は未だに不明な点が多い。

肝再生機構に関する研究は、Higgins と Anderson が *in vivo* モデルにおける 70 %部分肝切除モデルを発表したことで大きく前進した。これまでに、部分肝切除後の肝再生において、hepatocyte growth factor (HGF) などの増殖因子や、tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL)-6 等のサイトカインが深く関与することが明らかとなった。そして、これらの因子に加え、ホルモンやオータコイドなども肝再生の促進や抑制に関与しており、複数の因子が複雑に相互作用することで肝再生は完遂する。これらの増殖因子等の詳細な作用機構を検討する場合、*in vivo* モデルでは、多くの因子が複雑に相互作用をするため、個々の詳細なシグナル伝達機構の解析は困難である。そこで、*in vivo* モデルと並行し、*in vitro* モデルである初代培養肝実質細胞系を用いることにより、肝実質細胞に対する増殖因子などの詳細な細胞増殖促進作用機構を明らかにすることが可能になった。このように肝再生は、増殖因子やサイトカインの影響を受けることが明らかになった。さらに、肝再生の促進には、栄養素 (アミノ酸) の影響を受けることもわかってきており、肝再生を促進するアミノ酸として branched-chain amino acid (BCAA) が知られている。また、含硫アミノ酸である L-cysteine も肝庇護作用などが報告されている。熟成ニンニクに含まれる含硫アミノ酸である S-allyl-L-cysteine (SAC) についても肝保護作用や抗炎症作用、肝がん抑制作用などが報告されている。SAC は、線維芽細胞に対する増殖促進作用も有していることが確認されており、近年、SAC の作用に注目が集まっている。しかし、SAC の肝臓に対する肝保護作用などが報告される一方で、SAC の肝細胞に対する増殖促進作用機構は未だ明らかとなっていない。

そこで、本研究では、*in vivo* 実験系の 70 %部分肝切除ラットおよび *in vitro* 実験系の初代培養肝実質細胞実験系を用いて SAC の肝実質細胞の増殖に対する効果を検討した。その結果、70 %部分肝切除ラットにおいて、SAC は用量依存的に、肝細胞の DNA 合成を促進させ、肝重量を増加させることを見出し、その作用は、insulin-like growth factor (IGF)-1 mRNA の発現量を増加させることに起因すると判明した。その後、*in vitro* 実験系である初代培養

肝実質細胞実験系にて、SAC の肝実質細胞増殖促進作用を検討した結果、培養時間及び用量依存的な肝実質細胞増殖促進作用が確認された。次に、SAC の肝実質細胞増殖促進作用に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果を検討することで、細胞増殖に関与するシグナル伝達因子を推測した。その結果、phospholipase C (PLC)、細胞内 Ca^{2+} 、receptor tyrosine kinase (RTK)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK)、mammalian target of rapamycin (mTOR)の関与が示唆された。さらに、肝実質細胞の RTK、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 及び ribosomal p70 S6 kinase (p70S6K) のリン酸化活性を測定し、より詳細な SAC による細胞内増殖シグナル伝達機構を検討した。その結果、SAC によって、まず、Janus kinase 2 (JAK2)がリン酸化され、続いて、RTK、ERK2、p70S6K の順でリン酸化されることを見出した。即ち、SAC の肝実質細胞増殖促進作用は、JAK2 / PLC / Ca^{2+} 経路と IGF-1 RTK / PI3K / ERK 2 / mTOR / p70S6K 経路が深く関与していることが明らかとなった。また、顆粒分泌を抑制するソマトスタチンにより、SAC による RTK や ERK2、p70S6K のリン酸化活性が抑制されたことから、何らかの増殖因子が肝実質細胞から自己分泌されたことが示唆された。そこで、抗増殖因子抗体および抗増殖因子受容体抗体を SAC と併用したところ、growth hormone (GH) receptor (GHR)、IGF-1、IGF-1 receptor、に対するモノクローナル抗体によって、SAC の肝実質細胞増殖促進作用が完全に抑制された。この結果から、SAC の肝実質細胞増殖促進作用には、IGF-1 とその受容体および GH 受容体の関与が示唆された。GHR / JAK2 / PLC 経路と IGF-1 RTK / PI3K / ERK 2 / TOR / p70S6K 経路は、IGF-1 を介して関連しているのではないかと仮説を立て、培養液中の IGF-1 の濃度を ELISA 法を用いて測定した結果、SAC の刺激により、急速な培養液中 IGF-1 濃度の上昇が確認された。それと同時に、肝実質細胞内の IGF-1 を蛍光免疫染色したところ、SAC の刺激によって肝実質細胞内の IGF-1 の枯渇が認められ、培養液中の IGF-1 濃度の上昇と肝実質細胞内の IGF-1 との間で、逆相関が認められた。

以上の結果を総合的に考察すると、SAC の肝実質細胞増殖促進作用は、SAC が GH 受容体を刺激することで開始され、その下流に存在する JAK2 / PLC が活性化されると細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き金とし、肝実質細胞内に貯蔵されていた IGF-1 が細胞外へと分泌される。分泌された IGF-1 が、肝実質細胞膜上の IGF-1 受容体と結合することで、RTK がリン酸化され、この増殖シグナルが、PI3K、ERK2、mTOR、p70S6K と経時的に順次伝達され、最終的に細胞増殖に至ることを見出した。

SAC は、多彩な薬理作用を示す物質である。本研究では、肝実質細胞に対する SAC の詳細な細胞増殖促進作用機構を初めて明らかにした。SAC は、低分子かつ水溶性のアミノ酸であり、経口投与が可能である。そのため、本研究で得られた知見は、SAC を基盤とした安心、安全な「肝再生促進薬」の開発に貢献し、さらには、肝再生現象の解明にも役立つものであると考えられる。また、SAC は安価であることから、医療費削減に寄与することが可能と考えられる。特に、薬剤費は、医療費増大の一因であると考えられていることから、SAC は、安価で安全、安心な肝再生促進薬の開発の一助になることが期待される。

Thesis abstract

Signal transduction mechanism for S-allyl-L-cysteine-induced proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes

Kazuki Kurihara

Living-donor liver transplantation has been established as a treatment for end-stage liver disease, and its record of performance in operations has been improving ; however, following the procedure, about 40% of donors feel anxiety about their future health condition. The development of drugs for liver regeneration is expected to improve or improve the quality of life of donors and recipients.

The liver is an organ that plays a central role in metabolism. In addition, the liver has a high regenerative capacity, known as liver regeneration. However, the detailed mechanisms underlying liver regeneration remain unclear. Since Higgins and Anderson established a partial hepatectomy animal model of liver regeneration, liver regeneration after partial hepatectomy has been shown to involve growth factors such as hepatocyte growth factor and transforming growth factor- α and cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukin-6. Moreover, hormones and autacoids are related to the liver regeneration, which is completed by the complex interaction of various growth factors. However, it remains difficult to elucidate the detailed mechanism of liver regeneration by growth factors in an *in vivo* model. Therefore, details have been examined using primary cultured hepatocytes in an *in vitro* model, which has made it possible to elucidate the detailed cell proliferation mechanism, such as growth factors, involving hepatic parenchymal cells, with the results confirming that liver regeneration is affected by growth factors and cytokines. Furthermore, liver regeneration has been shown to be affected by nutrients such as amino acids. In addition, L-cysteine, a sulfur-containing amino acid, has also been reported to have a hepatoprotective effect. S-allyl-L-cysteine (SAC), a sulfur-containing amino acid contained in aged garlic, has also been reported to exhibit hepatoprotective, anti-inflammatory, and anticancer effects, and been confirmed to have a proliferative effect on fibroblasts. Therefore, attention has been increasingly focused on the effects of SAC in recent years. However, while SAC has been reported to have a proliferative effect on the liver, the mechanism underlying its effect on hepatocytes remains unclear. Therefore, we investigated the effect of SAC on the proliferation of hepatic parenchymal cells by using 70% partially hepatectomized rats in an *in vivo* model and primary cultured hepatocytes in an *in vitro* model. The results revealed that SAC-induced proliferative effects promote hepatocyte DNA synthesis and increase liver weight in a dose-dependent manner owing to an increase in the expression level of insulin-like growth factor (IGF)-1 mRNA, and that SAC induces time- and dose-dependent cell proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. Next, we investigated the growth-related signal transducers involved in cell proliferation by examining the effects of growth-related signal transducer inhibitors on the SAC-induced proliferative effects. The results suggested the involvement of phospholipase C (PLC), intracellular Ca^{2+} , receptor tyrosine kinase (RTK), phosphoinositide 3-kinase (PI3K), extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase (MEK), and mammalian target of rapamycin (mTOR). Furthermore, I measured the phosphorylation activity of RTK, ERK, and ribosomal p70 S6 kinase (p70S6K) in hepatic parenchymal cells and investigated the intercellular signal pathway mechanism by SAC in more detail. The results revealed that Janus kinase 2 (JAK2) was first phosphorylated by SAC, followed

by RTK, ERK2, and p70S6K, in that order. The results also showed that the proliferative effects of SAC in hepatocyte involved the JAK2/PLC/Ca²⁺ and IGF-1 RTK/PI3K/ERK2/mTOR/p70S6K pathways. Additionally, activation was suppressed by somatostatin, which inhibits mitogenic-activated exocytosis. This result suggested that some growth factors were autocrine from hepatic parenchymal cells. Therefore, when anti-growth factor antibody and anti-growth factor receptor antibody were used in combination with SAC, monoclonal antibodies against growth hormone receptor (GHR), IGF-1, and IGF-1 receptor (IGF-1 R), the proliferative effects of SAC were completely suppressed. This result suggested the involvement of IGF-1 and its receptors, as well as GHR, in the proliferative effects of SAC on hepatic parenchymal cells. Therefore, I hypothesized that the GHR/JAK2/PLC and IGF-1 RTK/PI3K/ERK 2/mTOR/p70S6K pathways are related via IGF-1 and its concentration in the culture medium. As a result of measurement using an ELISA kit, it was confirmed that the IGF-1 concentration in the culture medium increased rapidly because of the stimulation of SAC. At the same time, IGF-1 in hepatic parenchymal cells was measured by fluorescent immunostaining and IGF-1 depletion in hepatocytes was observed by the stimulation of SAC. An inverse correlation was observed between the increase in IGF-1 concentration in the culture medium and IGF-1 in the hepatic parenchymal cells.

These results suggest that stimulation of the GHR by SAC initiates proliferation and downstream signal transmission. Consequently, the activation of the JAK2/PLC pathway increases the intracellular Ca²⁺ concentration, which triggers the extracellular secretion of stored IGF-1 in hepatocytes. IGF-1 then activates a second pathway by binding to IGF-1 R and phosphorylated RTK and transmits successive growth signals to the PI3K/ERK2/mTOR/p70S6K pathway.

The results of this study clarified the detailed mechanisms underlying the proliferative effects of SAC on hepatic parenchymal cells was clarified. SAC is a small molecule and water-soluble amino acid that can be orally administered. Therefore, the findings obtained in this study could be expected to contribute to the development of inexpensive, safe, and secure SAC-based liver regeneration promoters, and to be useful for elucidating the phenomenon of liver regeneration. In addition, since SAC is inexpensive and high drug costs are known to contribute to increased medical costs, SAC could contribute to a reduction in medical expenses.

論文審査の結果の要旨

生体肝移植は、末期肝疾患における治療法として確立されており、肝機能障害患者の増加や移植技術の進歩に伴って、その症例数は増加している。生体肝移植後のドナーやレシピエントは、肝臓が再生し、その機能が回復するまで、倦怠感や食欲不振などに悩まされ、患者の QOL は著しく低下する。しかしながら、現在のところ、早期に肝機能を回復させる医薬品は存在せず、その開発が急務となっている。これまでに、肝再生現象のメカニズムを解明するため、様々な増殖因子や栄養素（アミノ酸）などによる肝実質細胞における増殖促進作用が検討されてきた。そのなかで、水溶性アミノ酸誘導体のひとつである *S*-allyl-L-cysteine (SAC) は、主な薬理作用である抗酸化作用に加え、肝細胞の増殖を促進させることが近年見出されている。したがって、SAC の肝実質細胞増殖促進作用メカニズムを解明することにより、SAC の新しい効能を明らかにするとともに、生体肝移植後の肝再生促進薬の開発に繋げることができると期待される。

本研究において、栗原一樹氏は、SAC の肝実質細胞増殖促進作用メカニズムを解明するために、*in vivo* 実験による個体レベルから *in vitro* 実験による細胞・分子レベルまでの詳細な検討を 3 章構成で論じている。

本論の第 1 章では、70%部分肝切除ラットを用いた *in vivo* 実験系において、SAC の肝実質細胞の増殖に対する効果を検討している。その結果、SAC が、肝重量および肝細胞 DNA 合成能の測定により、投与後早期から肝実質細胞の増殖を促進し、用量依存的な肝再生促進作用を示すとともに、肝機能の指標である血清トランスアミナーゼ活性の一過性上昇からの回復を促進させることを見出した。さらに、SAC により、肝組織細胞において増殖因子 insulin-like growth factor-1 (IGF-1) およびその受容体 IGF-1 receptor の遺伝子発現レベルが上昇していること、細胞増殖に関わる細胞内シグナル伝達経路が活性化していることを見出した。一方で、SAC が、血清 growth hormone (GH) 濃度に影響を及ぼすことがないことを確認した。

第 2 章では、初代培養肝実質細胞を用いた *in vitro* 実験系において、SAC の肝実質細胞の増殖に対する効果とそのメカニズムを検討している。第 1 章での *in vivo* 実験系の結果と同様、SAC は、肝実質細胞の核数の測定により、培養時間および用量に依存した細胞増殖促進作用を示すことを見出した。SAC により誘発される細胞増殖促進作用の最大反応は、既存の増殖因子である epidermal growth factor (EGF) と同程度であった。次に、この SAC による肝実質細胞増殖促進作用に対して、各種シグナル伝達分子の特異的な阻害薬の影響およびシグナル伝達分子である IGF-1 receptor や extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) のリン酸化レベルを検討することによって、SAC 誘発細胞増殖に関与するシグナル伝達経路を推測している。その結果、SAC による肝実質細胞増殖促進作用には、GH receptor / janus kinase 2 (JAK2) / phospholipase C (PLC) / Ca²⁺ 経路および IGF-1 receptor / phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / ERK2 / mammalian target of rapamycin (mTOR) / p70S6K 経路の 2 つのシグナル伝達経路が関与していることを明らかにした。さらに、細胞内 Ca²⁺ 濃度を低下させる BAPTA/AM および分泌顆粒の開口放出を抑制する somatostatin

の処置によって、SACにより誘発される IGF-1 receptor や ERK2、p70S6K のリン酸化レベルが抑制されることを明らかにした。

続く第3章では、第2章の結果を踏まえ、SACによる肝実質細胞からのオートクリン性増殖因子を特定し、その自己分泌のシグナル伝達経路とその分泌調節メカニズムにおけるSACの標的となる作用点について検討している。その結果、SAC刺激により、肝実質細胞内のIGF-1が消失するとともに、培養液中のIGF-1濃度が上昇したことから、SACによってIGF-1が分泌されることを見出した。また、SACによるIGF-1の自己分泌促進作用は、GH receptor / JAK2 / PLC / Ca²⁺ 経路を介して調節されていることを明らかにした。そして、最後に、SACがGH receptorに直接的に結合することを明らかにした。

これらのことから、SACによる肝実質細胞増殖促進作用は、①SACがGH receptorを刺激することにより開始され、その下流に存在するJAK2およびPLCが活性化されて細胞内のCa²⁺濃度が上昇する。②この細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き金として、肝実質細胞内の分泌顆粒に貯蔵されていたIGF-1が細胞外へと分泌される。③その分泌されたIGF-1が、肝実質細胞膜上のIGF-1 receptorと結合することで、細胞内のシグナル伝達分子であるPI3K、ERK2、mTOR、p70S6Kを順次活性化し、最終的に細胞増殖応答に至ると結論づけている。さらに、本研究で得られた知見より、SACが経口投与可能なアミノ酸誘導体であるため、生体肝移植後に安全で利用しやすい肝再生促進薬として臨床応用に繋げることも可能であることを考察している。また、今後の課題として、SACの細胞増殖促進作用による正常組織細胞の癌化などの副作用を検討することによって、より安全で安心な肝再生促進薬の開発へと繋げていくことにも言及している。

以上、本研究成果として、個体から組織、細胞、分子レベルにおいて、水溶性アミノ酸誘導体のひとつであるSACが、抗酸化作用の薬理作用に加え、肝実質細胞増殖促進能を有し、肝実質細胞に対するSACのGH receptorを介した詳細な細胞増殖促進作用メカニズムを初めて解明したことは、薬学的に高く評価できる。SACのこの新しい効能は、生体肝移植後の肝再生促進薬や肝炎等に対する肝底護薬などの開発、肝切除後の保存や運搬に使用される保存液の開発というように臨床分野への応用が大いに期待できる。特に、SACのような水溶性アミノ酸は、体内に蓄積しにくいために、投与による副作用の危険も低く、熟成ニンニクに含有される低分子アミノ酸であるために、他の細胞増殖因子に比べて安価であり、医療費削減にも貢献できる期待がある。

よって、本論文は、その客観的かつ論理的思考性と薬学的意義の観点から、本研究科課程における博士（薬学）論文に十分に値するものと判断する。