

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

目次

略語	-----8
第1編 序論	-----11
第2編 本論	-----18
第1章 70%部分肝切除ラットに対する S-allyl-L-cysteine の肝再生促進作用の検討	
1. 緒言	
2. 実験材料及び実験方法	-----22
2-1. 実験動物	
2-2. 70%部分肝切除モデル動物の作製および薬物投与	
2-3. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 免疫組織化学的染色	
2-4. 血清トランスアミナーゼ活性の測定	
2-5. RNA 抽出および定量的 real-time (RT)-PCR	
2-6. 血清中の growth hormone (GH)濃度の測定	
2-7. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) および Akt リン酸化活性の測定	
2-8. 実験材料	
2-9. データの統計処理	

3. 実験結果 -----27

- 3-1. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸による肝再生促進作用の経時的変化の検討
- 3-2. 70 % 部分肝切除 (PH)後 3 日目における SAC とその他の含硫アミノ酸の用量-反応関係の検討
- 3-3. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用の経時的変化の検討
- 3-4. 70%部分肝切除 (PH)ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性の経時的変化に及ぼす SAC とその他の含硫アミノ酸の作用の検討
- 3-5. 70%部分肝切除 (PH)ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性の経時的変化に及ぼす SAC とその他の含硫アミノ酸の作用の検討
- 3-6. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける SAC 投与による血清 growth hormone (GH) 濃度の経時的変化の検討
- 3-7. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける SAC の ERK1/2 および Akt リン酸化活性促進作用の検討

4. 考察 -----43

- 4-1. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の肝再生促進作用の検討
- 4-2. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用の検討
- 4-3. 70%部分肝切除 (PH)ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性に及ぼす SAC とその他の含硫アミノ酸の作用の経時的変化の検討
- 4-4. 70 %部分肝切除 (PH)ラットにおける種々の成長因子の mRNA 発現に及ぼす SAC の影響および SAC の ERK1/2 および Akt リン酸化活性促進作用の検討

5. 小括	-----49
第2章 成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する SAC の細胞増殖促進作用とその作用機構 に関する検討	-----50
1. 諸言	
2. 実験材料及び実験方法	-----52
2-1. 実験動物	
2-2. 肝実質細胞の単離と培養	
2-3. 肝実質細胞の核数計測	
2-4. 肝実質細胞の細胞周期の測定	
2-5. IGF-1 受容体チロシンキナーゼリン酸化活性の測定	
2-6. MAP キナーゼリン酸化活性の測定	
2-7. p70S6 キナーゼリン酸化活性の測定	
2-6. 実験材料	
2-7. データの統計処理	
3. 実験結果	-----57
3-1-1. SAC による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化	
3-1-2. SAC による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係	
3-1-3. SAC の肝実質細胞増殖促進作用における播種時の細胞密度の影響	
3-1-4. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の薬理学的検討	
3-1-5. SAC の初代培養肝実質細胞に対する細胞周期における S 期移行性に関する検討	

- 3-2-1. SAC の初代培養肝実質細胞における RTK のリン酸化活性促進作用の経時的変化の検討
- 3-2-2. SAC の初代培養肝実質細胞における MAPK のリン酸化活性促進作用の経時的変化の検討
- 3-2-3. SAC の初代培養肝実質細胞における p70S6K のリン酸化活性促進作用の経時的変化の検討
- 3-3-1. SAC の初代培養肝実質細胞における RTK のリン酸化活性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
- 3-3-2. SAC の初代培養肝実質細胞における ERK2 のリン酸化活性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
- 3-3-3. SAC の初代培養肝実質細胞における p70S6K のリン酸化活性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

- 4. 考察 -----79
 - 4-1. SAC の成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する効果
 - 4-2. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討
 - 4-3. 肝実質細胞における SAC による p95-kDa RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化活性化作用の基礎的検討
 - 4-4. 肝実質細胞における SAC の p95-kDa RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化活性促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構の検討

- 5. 小括 -----

第3章 SACの肝実質細胞増殖促進作用におけるオートクリン因子分泌促進作用機構に関する検討	-----87
1. 諸言	
2. 実験材料及び実験方法	-----89
2-1. 実験動物	
2-2. 肝実質細胞の単離と培養	
2-3. 肝実質細胞の核数計測	
2-4. 増殖因子および増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体を用いた中和実験	
2-5. 肝実質細胞内 IGF-I の蛍光免疫染色法	
2-6. 培養液中における IGF-I 濃度の測定	
2-7. SAC の growth hormone receptor (GHR) への結合実験	
2-8. 実験材料	
2-9. データの統計処理	
3. 実験結果	-----92
3-1. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子抗体および抗増殖因子受容体抗体の効果に関する検討	
3-2. 初代培養肝実質細胞における SAC の IGF-I の分泌促進作用に関する検討	
3-3. 初代培養肝実質細胞における SAC による IGF-I の自己分泌促進作用に関する検討	
3-4. 初代培養肝実質細胞における SAC の IGF-I 分泌促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構の検討	

3-5. SAC 及びその他の含硫アミノ酸の GH 受容体に対する結合性の検討	
4. 考察	-----102
4-1. 初代培養肝実質細胞における SAC のオートクリン因子分泌促進作用に関する検討	
4-2. SAC の肝実質細胞に対する IGF-I 分泌促進作用のシグナル伝達機構の検討	
5. 小括	-----105
第3編 結論	-----106
謝辞	-----109
参考文献	-----110

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

SAC	S-allyl-L-cysteine
EGF	epidermal growth factor
HGF	hepatocyte growth factor
TGF- α	transforming growth factor alpha
IGF-I	insulin-like growth factor-I
IL-6	interleukin-6
PBS	phosphate-buffered saline
MEM	minimum essential medium
ERK	extracellular signal-regulated kinase
AC	adenylate cyclase
DG	diacylglycerol
IP ₃	inositol triphosphate
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
p70S6K	70-kDa ribosomal protein S6 kinase
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
RTK	receptor tyrosine kinase

②特異的シグナル伝達因子阻害薬及び活性化薬

AG1478

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

(RTK inhibitor)

LY294002

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

(PI3K inhibitor)

PD98059

2'-Amino-3'-methoxyflavone

(MEK inhibitor)

U-73122

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

(PLC inhibitor)

U-73343

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

(Inactive analog of U-73122)

H-89

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

(PKA inhibitor)

GF109203X

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

(PKC inhibitor)

BAPTA/AM

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

(membrane-permeable Ca²⁺ chelator)

第1篇 序論

生体肝移植は、末期肝疾患における治療法として確立しており、肝疾患患者の増加や移植技術の進歩に伴い、その例数は1989年の開始以降、右肩上がりに増加し、ここ数年は400～500例/年で推移している¹⁾。しかし、生体肝移植ドナーに関する調査報告書によると、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²⁾。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、人体の右上腹部に位置し、人体における最大の腺臓器である。肝臓の主な機能としては、胆汁酸および血漿タンパクの合成・分泌、異物の解毒、糖新生やグリコーゲン代謝による血糖調節、脂質の合成・分解、尿酸合成などがあり、生体の恒常性維持に必要不可欠である。これらの機能は、主に肝臓の細胞数の約70%（重量比で約90%）を占める肝実質細胞が担っている。残りの約30%を、星細胞、クッパー細胞および類洞上皮細胞などが占めており、これらは肝非実質細胞と呼ばれている。肝非実質細胞は免疫系に関するものや肝類洞壁の構成など、それぞれ特有の働きをしている。また、肝臓の解剖学的特徴として、血管に富んでいることが挙げられる。肝臓に流入する血管は門脈と肝動脈の2種類であり、肝実質細胞及び肝非実質細胞は、門脈から80%、肝動脈から20%の栄養を受けている。

一方、肝臓は、特有の自己増殖能を有しており、この現象は肝再生と呼ばれている。成熟した哺乳類の肝臓は、通常、細胞周期におけるG₀期（静止期）にあり、増殖反応は停止しており、上記に示した機能を営んでいる。しかし、肝臓になんらかの損傷が生じた時に肝再生が起こる。例えば、ラットの肝臓を外科的に切除した場合や四塩化炭素などによって肝障害が誘発されて、肝臓の一部が欠損した際には、約10日間で元の肝重量にまで回復し、増殖は自動的に停止する³⁾。これは、肝切除後に体内に残存した残りの肝臓の細胞が分裂・増殖して肥大することによるものである。この肝再生は、生物学的な「再生」とは全く異なったプロセスで進行すると考えられており、肝再生における「再生」は、「代償性発育」という

呼ぶ方が適切であると Fausto らは述べている⁴⁾。

この肝再生という現象は古くから知られており、古代ギリシャ神話にも登場する。オリンポスから火を盗んだプロメテウスが生きながらにして、鳥に肝臓をついばまれるという罰を受けたという話である。プロメテウスの肝臓は、翌日には再生していたとされている⁵⁾。このように、肝再生は古来より知られていた現象であると考えられる。この肝再生のメカニズムを解明するために、多くの科学者によって様々な研究が行われてきた。この肝再生現象が科学的に証明されたのが 20 世紀の初めである。その研究を行ったのが、Higgins と Anderson である³⁾。彼らは肝臓の 70%を外科的に切除すると、マウスやラットでは 10 日ほどで元の容積にまで回復することを報告した。Higgins と Anderson が発表した 70%部分肝切除術 (partial hepatectomy : PH) は、肝再生の *in vivo* 実験系モデルとして、今日でもよく採用されている。

その後の研究において、肝再生の引き金を引く物質が液性因子であることが示され、肝再生中の動物の血液中や組織中から、多くの成長因子やサイトカインが単離・精製された⁶⁾。その例として、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor : HGF) が挙げられる。HGF は肝障害に応答して著しく濃度が上昇する。実際に Ishiki らによって、肝臓を外科的に除去したマウスに HGF を投与すると肝臓の再生が促進されることが報告されている⁷⁾。上記のように、単独で肝実質細胞の増殖を促進する因子を増殖因子 (mitogen) という。

肝再生は、まず肝実質細胞が増殖し、その後に肝非実質細胞が増殖すると考えられている。その開始と終了においては、細胞密度などの物理的因子、様々な液性因子の生化学的因子など、複数の因子が複雑に関与していると考えられている。肝再生を経時的に観察すると、初期段階では、クッパー細胞から腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α :TNF- α)やインターロイキン 6 (interleukin-6:IL-6)などが、開始因子として分泌され、これらが肝実質細胞の細胞周期を G₀期から G₁期へと移行させる。これらの細胞分裂開始因子の分泌により、肝実質細胞の転写因子が活性化されるとともに、続いて、その他の様々な増殖因子も生産・分泌される

8)。例えば、十二指腸からは上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) が、星細胞からは HGF がそれぞれ分泌される (Fig. 1)。また、肝実質細胞自身からは、インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor-I : IGF-I) やトランスフォーミング増殖因子 α (transforming growth factor- α : TGF- α) などの増殖因子が自己分泌され、G₁期から S 期、さらには G₂期から M 期へと細胞周期が移行することにより、肝実質細胞が分裂・増殖すると考えられている。また、肝臓が元の容積にまで回復すると、増殖抑制因子 (inhibitory mitogen) である transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) などが肝実質細胞から分泌され、肝実質細胞は G₀ 期に戻り増殖が自動的に停止する (Fig. 2)。

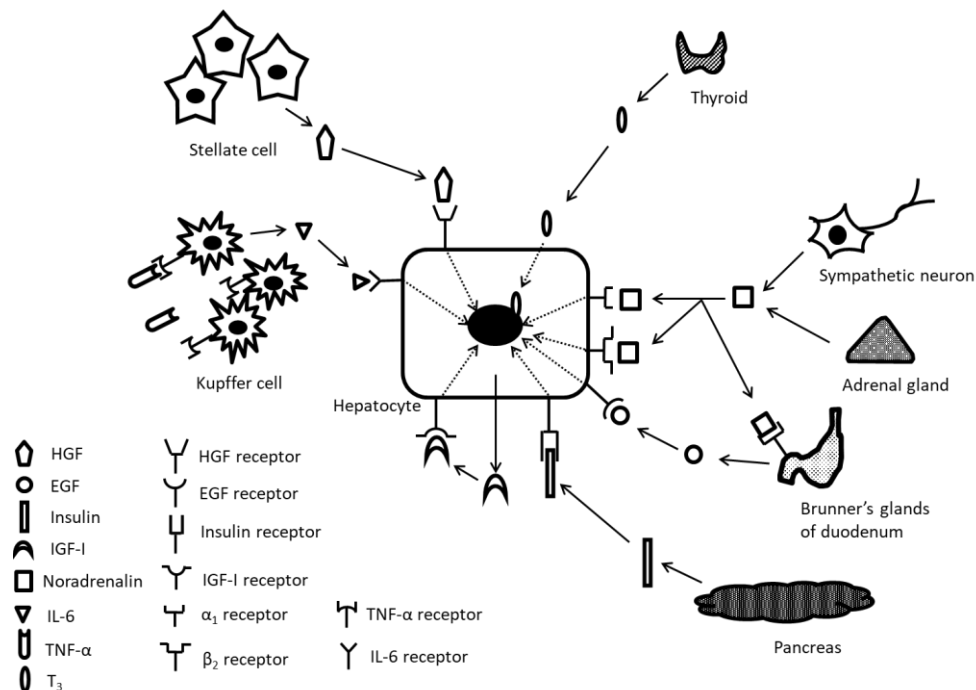


Fig. 1 肝再生に関わる液性因子

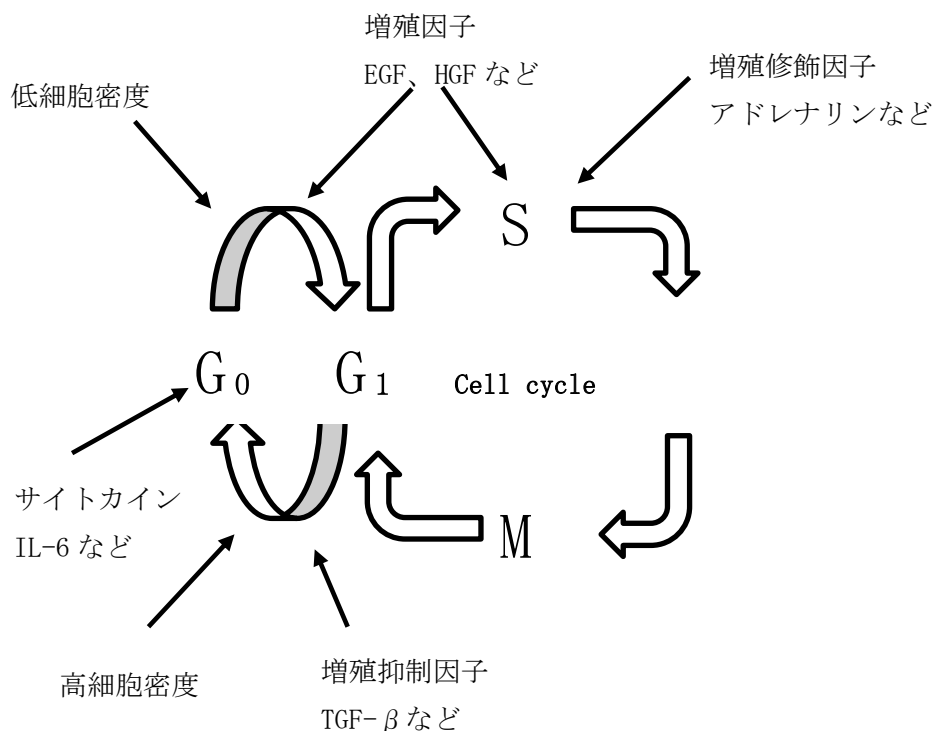


Fig. 2 肝実質細胞の細胞分裂モデル

さらに、肝再生は、これら増殖因子やサイトカインの他、インスリンや甲状腺ホルモン、ノルアドレナリンなどの影響も受けることが知られている⁹⁾。インスリンを例に挙げると、PH 施行動物において、膵臓からのインスリンの供給を断つと、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再び供給することで、肝再生の抑制が解除され、肝細胞の増殖能が回復したとの報告もされている⁹⁾。さらに肝再生は甲状腺ホルモン (triiodothyronine: T₃, thyroxine: T₄) の影響も受けるとされている。特に T₃ は肝細胞の DNA 合成能を促進させ、肝再生を促進させたとの報告がある¹⁰⁾。また、カテコールアミン類は単独では肝細胞増殖促進作用を示さないが、EGF や HGF などの成長因子と併用すると肝実質細胞増殖促進作用を増強させるため、増殖修飾因子 (co-mitogen) と呼ばれる。

このように肝再生現象には、様々な因子が複雑に関与しており、全身性の反応であると言える。よって、*in vivo* 実験系で肝再生のメカニズムを解明するのは極めて困難だと考えられる。一方で、肝細胞の単離・精製の方法や高い生物学的活性もった細胞を培養する技術が進

歩したことにより、*in vitro* 実験系である初代培養肝実質細胞実験系が確立された。この実験系は、*in vivo* 実験系で問題となっていた様々な因子の介在を回避することが可能である。つまり、個々の成長因子やサイトカインの作用機構を解明するには最適な実験系であると考えられる。その中でも、*in situ* コラゲナーゼ還流法によって単離される初代培養肝実質細胞実験系は、再現性、収率、生存率、代謝活性ともに高く、肝機能を長時間維持することが可能な肝実質細胞実験系である。Kimura らは、この初代培養肝実質細胞実験系を独自に開発し、様々な増殖因子やサイトカイン、ホルモンなどの肝実質細胞に対する増殖促進（抑制）作用とそのメカニズムを詳細に検討してきた^{11,12)}。その結果、以下のことが明らかになってきた。

無血清培地において、肝実質細胞の増殖因子などによる肝実質細胞の細胞増殖では、

- 1) 肝実質細胞の播種時の密度が関与する。
- 2) 細胞内シグナル伝達経路にはかなりの共通性がある。
- 3) 分裂・増殖促進作用は、従来報告されていた時間よりもかなり早期に発現させることができる。
- 4) 増殖修飾因子には、カテコールアミン（アドレナリン α 、 β 受容体作動薬）などがあり、これらは単独では増殖促進作用を示さない。
- 5) セロトニン、プロスタグランジン類は、内因性増殖因子の分泌を促進し、間接的に肝細胞を増殖させる。

このように、*in vivo* 実験系および *in vitro* 実験系における肝再生モデルを用いた研究を統合することで、肝再生現象の実態が明らかになりつつある。

これらの知見は、生体肝移植におけるドナー（提供者）およびレシピエント（受容者）における肝機能の早期回復や創傷治癒に用いられる肝再生促進薬などの臨床応用に発展させ

ることも可能と考えられる。すなわち、これらの薬物の開発によってドナーおよびレシピエントの quality of life (QOL) の向上または改善が期待できる。

SAC は、生ニンニクの熟成過程において、 γ -glutamyl transpeptidase により、 γ -glutamyl-S-allyl-L-cysteine から生合成される含硫アミノ酸の 1 種である。肝再生の促進因子として、上記の因子以外にも栄養素（アミノ酸など）が挙げられる。肝再生を促進させるアミノ酸として、現時点では、分岐鎖アミノ酸 (branched-chain amino acid : BCAA) が報告されている¹³⁾。また、側鎖にチオール基をもつ還元型の含硫アミノ酸である cysteine (Cys) においては、様々な公害物質に対する解毒作用、肝再生促進作用、抗炎症作用などが数多く報告されている^{14, 15)}。これまでに、SAC には、さまざまな薬理作用が報告されている。例えば、抗炎症作用やがん抑制作用及び SAC の抗酸化作用に基づく、動脈硬化予防効果¹⁶⁾や四塩化炭素やアセトアミノフェンにより誘発された肝障害に対する肝保護作用¹⁷⁾、さらには、肝臓におけるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase : GST) の活性を高め、解毒作用を亢進させる作用などがある¹⁸⁾。また、SAC のがん抑制作用に関しては、消化器系のがんに対する予防効果が報告されている。例えば、Velmurugan らは、SAC が肝臓中あるいは血漿中のグルタチオン濃度とグルタチオンに依存的な酵素の活性を上昇あるいは増強することで胃がんを抑制したと報告している¹⁹⁾。一方で、SAC の正常細胞に対する増殖促進作用は、Nam らの神経芽細胞に対する報告のみである²⁰⁾。これは SAC がセロトニン 1A 受容体の発現量の増加を介して、細胞分裂関連タンパク質である ki-67 の発現量を大幅に増加させることに起因するものである。即ち、SAC はその対象細胞の状態によって、細胞増殖の「抑制作用」と「促進作用」の相反する作用を示している。

このように、SAC による肝障害に対する効果については多種多様な報告がさしているが、SAC の正常な肝実質細胞の増殖に対する作用やメカニズムに関する報告はほとんどない。そこで、本研究では *in vivo* における SAC の肝再生における影響を検討し、その詳細なシグナル伝達機構について、より単純で明確な実験系である *in vitro* 初代培養肝実質細胞を用い

て解明することとした。これにより、肝機能促進薬や肝再生促進薬の開発の基礎とすることを目的とした。

第2編 本論

第1章 70%部分肝切除ラットに対する S-allyl-L-cysteine の肝再生促進作用の検討

1. 緒言

ニンニクは、古来より人々の健康増進あるいは維持、疾病の治療や予防のために食されてきた²⁰⁾。このため、現在では、サプリメントや健康食品など様々なニンニク製剤が開発され、市販されている。また、生ニンニクの熟成過程において生合成が促進される熟成ニンニク抽出物 (age garlic extract : AGE) には、様々な薬理作用が報告されている。なお、熟成とは、食品自身がつ酵素によって、自身のタンパク質がアミノ酸、ペプチドなどに分解・変成される過程である。例えば、AGE に特徴的な成分の一つである SAC が挙げられる (Fig. 3)。SAC は AGE の活性を発現するための重要な成分であると考えられており、SAC は生ニンニク中に前駆体として存在する γ -glutamyl-S-allyl-cysteine が浸漬処理中の加水分解によって生成する。AGE は、15%~20%のエタノール中で最大20ヵ月熟成することで得られ、サプリメントとしても利用されている。また、熟成過程における SAC の濃度は、熟成0ヵ月目と比較すると24ヵ月後には36倍にもなる²¹⁾。

SAC は98%と高いバイオアベイラビリティでよく吸収されることが知られている。加えて、経口投与可能で高い消化管吸収性があることも報告されている²²⁾。消化管吸収後、SAC は、主に3つの代謝物に代謝される。それは S-allyl-L-cysteine sulfoxide (SACS)、N-acetyl-S-allyl-L-cysteine (NAc-SAC) および N-acetyl-S-allyl-L-cysteine sulfoxide (NAc-SACS) である²⁰⁾。

また、SAC は flavin-containing monooxygenase (FMOs) の基質で

あり、*in vivo* において、SAC は FMOs によって代謝され、SACS

に変換される。一方で、N-acetyl transferase によって NAc-SAC

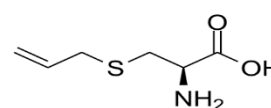


Fig. 3 S-allyl-L-cysteine

が生成する。その後、SACS は N-acetyl transferase によって NAc-SACS になり、NAc-SACS は FMOs によって NAc-SACS へと変換される (Fig.4)。

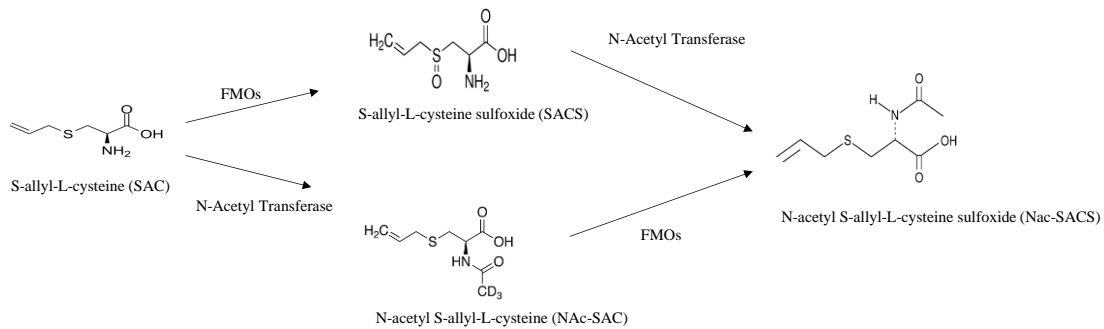


Fig. 4 SAC の代謝

SAC は、AGE の薬効を担う主な成分の一つとされ、これまでに、様々な作用が報告されている。例えば、SAC の抗酸化作用に基づく、動脈硬化予防効果¹⁶⁾や四塩化炭素やアセトアミノフェンによる肝障害に対する肝保護作用¹⁷⁾、さらには、肝臓における GST の活性を高め、解毒作用を亢進させる作用などが報告されている¹⁸⁾。さらに、Hsu らは、アセトアミノフェンによる肝障害モデル動物を用いた実験において、SAC が IL-6、IL-10 や TNF- α などの炎症性サイトカインの分泌を抑制し、加えて、グルタチオンペルオキシダーゼの活性を上昇させることにより、アセトアミノフェンによる aspartate aminotransferase (AST) と alanine aminotransferase (ALT) の上昇を抑制したと報告している²⁴⁾。これらの知見は SAC が、脂質の過酸化や血漿中のマロンジアルデヒドの増加を用量依存的に抑制したことに起因することが明らかとなっている。さらに、Shin らは、SAC が心血管系の緊張や収縮の調整を行う硫化水素 (H₂S) を生成する pyridoxal-5-phosphate-dependent enzyme である cystathionine- γ -lyase (CSE) の活性の増強を介して心筋梗塞ラットモデルに対して心臓保護作用を示すと報告している²⁵⁾。

また、SAC は、アメリカの国立がん研究所 (NCI) のデザイナーフーズ計画の研究で、がん

を予防する効果がある可能性の高い物質として、着目されている。がん抑制作用に関しては、消化器系や生殖器系のがん化したハイブリット型細胞に対して報告されている。Velmurugan らは、N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine および塩化ナトリウム誘発胃がんに対する SAC の予防効果について報告しており¹⁹⁾、これは、SAC が肝臓中あるいは血漿中のグルタチオン濃度とグルタチオンに依存的な酵素の活性を、上昇あるいは増強することによるものであると考えられている。また、Liu らは、SAC によるヒト前立腺がん細胞に対するアポトーシスを誘導し、この作用は、Bcl2 の発現量減少および Bax の発現量の増加作用などを介し、SAC が細胞をアポトーシスに導く酵素であるカスパーゼの発現量を、時間依存的に増加させることによると考えられている²⁰⁾。さらに、Feng らは SAC が E-cadherin の調節を介して悪性口腔癌の進行を阻害すると報告している²¹⁾。これは、ヒト口腔がん細胞株 CAL-27 細胞において SAC が濃度依存的に MAPK/ERK 経路を阻害したことに起因している。このように、SAC の抗酸化作用による抗炎症作用やがん抑制作用について、数多くの報告がある。その一方で、SAC の正常な細胞に対する増殖促進作用（又は抑制作用）に関する報告は、Nam らの神経芽細胞に対する報告のみである²⁰⁾。これは、SAC がマウスの海馬歯状回におけるセロトニン 1A 受容体の発現量の増加を介して、ki-67 の発現量を大幅に増加させることにより、神経芽細胞の増殖を促進したと考えられている。しかし、肝実質細胞に対する細胞増殖促進（あるいは抑制）作用 やそのメカニズムなどに関する報告は未だにない。

SAC の肝実質細胞に対する細胞増殖促進（あるいは抑制）作用のメカニズムが明らかになれば、SAC の正常な肝細胞に対する細胞増殖に関する作用という全く新しい知見を提供できると考えられる。さらに、本研究で得られた基礎的データは、肝再生現象の解明のみならず、臓器の形成の解明など様々な研究分野への応用が期待できる。また、肝再生を促進する新たな治療薬の開発に極めて貢献できると思われる。そこで、第 1 章では *in vivo* 実験系の肝再生モデルである PH 施行ラットを用いて、SAC が肝再生にどのような影響を与える

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 (170-200 g) を用いた。実験動物は、実験前に少なくとも 3 日間、湿度、温度管理及び 12 時間明暗周期の飼育舎で通常の食餌及び水を自由摂取させ、馴化飼育した。尚、実験動物の飼育と取り扱いは、城西大学実験動物実験規定 (動物管理委員会) に準拠した。さらに、以下の動物を用いた実験は、城西大学動物実験管理委員会に承認された後、城西大学動物実験規定に基づいて行った (承認番号:JU19032, JU20035)。

2-2. 70 %部分肝切除モデル動物の作製および薬物投与

70 %部分肝切除術は Higgins と Anderson の方法に基づいて施術した³⁾。イソフルラン麻酔下で腹部を正中切開し、肝臓の 70 %にあたる左葉と中葉を開腹部から露出させ、それらの根本の血管を結紮し、切除したのち、開腹部を縫合して閉腹した。生理食塩水 (control) 、 S-allyl-L-cysteine (SAC, 300 mg/kg) 、 S-methyl-L-cysteine (SMC, 300 mg/kg) および L-cysteine (Cys, 300 mg/kg) を 1 日 1 回ラットに経口投与し、肝切除日を 0 日目として 12 日間、1 匹ずつ個別のケージで飼育した。

2-3. 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 免疫組織化学的染色

残余肝の DNA 合成能を評価するために BrdU 免疫組織化学的染色を用いて評価した。開腹 2 時間前に 50 mg/kg BrdU を腹腔内投与した後、イソフルラン麻酔下で開腹・開胸し、残余肝を摘出した。摘出肝をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS, pH 7.4) で洗浄し、10 %緩衝ホルマリン液で固定した。3 日間の固定後、肝臓を 1-2 mm の厚さに切り、PBS で洗浄後、エタノール脱水、キシレン置換、パラフィン包埋させ、マイクロトームで 5 µm に薄切した。得られた組織切片を水浴 (40°C) に浮かべ約 10 min 伸展さ

せ、アミノシラン (APS) コートされたスライドガラスにのせ、インキュベーターで 60 min 乾燥させた。切片が付着したスライドガラスを乾燥させた後に脱パラフィンし、20 mM Tris-HCl buffer (pH9.0) 中で 60 °C、40 min、抗原の賦活化を行った。その後、BrdU immunohistochemistry Kit (Exalpha Biologicals)を用いて組織染色した。それを元に、一つの組織切片に対し、顕微鏡下で任意に 3 ヲ所を撮影し、BrdU 抗体で染色された褐色の核数と、ヘマトキシリンで対比染色された全核数をカウントした。なお、核数は以下の式を用いて標識細胞率 (Labeling Index : LI)を算出し、その平均値より求めた。

$$\text{LI}(\%) = \frac{\text{染色により暗褐色に標識された核数}}{\text{一視野(倍率 200 倍)の全核数}} \times 100$$

2-4. 血清トランスアミナーゼ活性の測定

PH 施行後、一定期間飼育したモデル動物をイソフルラン麻酔下で開腹・開胸し、下大静脈より採血した。採血した血液は 5,000 rpm、10 min で遠心分離し、血清を採取して、血清トランスアミナーゼを測定した。測定には、トランスアミナーゼ C II テストワコーを使用し、血清トランスアミナーゼ活性値は国際単位 (IU/L) として算出した。

2-5. RNA 抽出および定量的 real-time (RT) -PCR

PH ラットの肝臓における様々な増殖因子の遺伝子の発現を TaqMan[®] assay に基づいて定量的 RT-PCR を用いて調べた。TRIZOL[®]試薬を用いてトータル RNA を抽出した。その後、200 μ l のクロロホルムを加え、サンプルを遠心分離し、上清を採取した。次に、得られた上清にイソプロピルアルコールを加え RNA を沈殿させ、得られた RNA を 75 %エタノールで洗浄した。その後、cDNA に逆転写し、RT-PCR を行った。

2-6. 血清中の growth hormone (GH) 濃度の測定

血清中の GH 濃度は、GH ELISA kit を用いて測定した。PH 施行後、一定期間飼育したモデル動物をイソフルラン麻酔下で開腹・開胸し、下大静脈より採血した。採血した血液は 5,000 rpm、10 min で遠心分離し、血清を採取し、サンプルとした。GH ポリクローナル抗体固相化 96 ウェルマイクロプレートへ回収したサンプルまたは標準液を加え、室温で 2 h 静置した。その後、ウェルを洗浄し、ビオチン結合抗 GH 抗体を加え、室温で 2 h 静置した。洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、室温で 30 min 静置した。再度、洗浄した後、ウェルに残存したペルオキシダーゼを発色液と反応させた。次に、測定波長 450 nm で吸光度をマイクロプレートリーダー (TECAN, WAKO) で測定し、血清 GH 濃度を定量した。

2-7. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) および Akt リン酸化活性の測定

MAPK および Akt のリン酸化活性は、抗リン酸化 p44 kDa/p42 kDa MAPK (extracellular signal-regulated kinase (以下、ERK と略す)1、ERK2) および抗リン酸化 Akt モノクローナル抗体を用いて、Western blot 解析法により測定した^{52,53}。

TRIZOL[®]試薬を用いて肝臓をホモジナイズし、200 μ l のクロロホルムを加え、サンプルを遠心分離した後、上清を採取した。得られたタンパク質サンプルからイソプロピルアルコールにより高分子タンパク質を沈殿させ、0.3 M 塩酸グアニジンを含む 95 %エタノールで洗浄した。これによって、上層には mRNA、中層には低分子および中分子タンパク質、下層には高分子タンパク質がそれぞれ分離した。

得られたサンプルを 3 min 超音波にかけ、遠心分離 (16,300 \times g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた上清画分を 5 min 煮沸した。そのサンプル (20 μ g/lane) を 10% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membrane に転写させた。その後、抗リン酸化 MAPK

および Akt モノクローナル抗体と反応させ、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて標識した。そして、リン酸化 MAPK およびリン酸化 Akt を ECL kit を用いて測定及び解析を行った。尚、リン酸化 MAPK (P-p44 kDa /P-p42 kDa (Thr202/tyr204)) およびリン酸化 Akt (P-Akt (Ser473)) は、非リン酸化 MAPK モノクローナル抗体 (total p44 kDa/p42 kDa) および非リン酸化 Akt モノクローナル抗体 (total Akt) を用いて基準化補正を行った。

2-8. 実験材料

- Wistar 系雄性ラットは、三協ラボサービス (株) (Tokyo, Japan) から購入した。
- SAC、SMC、Cys は、東京化成工業(株) (Tokyo, Japan)から購入した。
- BrdU Immunohistochemistry Assay kit は Exalpha Biologicals (Shirley, MA, U.S.A.)から購入した。
- CII Test Wako kit は富士フィルム和光純薬工業 (株) (Osaka, Japan) から購入した。
- GH enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit は富士フィルムワコーシバヤギ (株) (Gunma, Japan)から購入した。
- TRIZOL[®] 試薬 は Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.) から購入した。
- Highcapacity cDNA reverse transcription kit は Applied Biosystems (Foster City, CA, U.S.A.) から購入した。
- 抗リン酸化 MAPK 抗体、抗 MAPK 抗体、抗リン酸化 Akt 抗体および抗 Akt 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, 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。

2-9. データの統計処理

データは、平均値 \pm S.E.M. で表した。また、有意差検定は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、post hoc 検定として、Dunnett の多重比較検定を用いて、比較を行った。尚、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. 70%部分肝切除 (PH) ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸による肝再生促進作用の経時的変化の検討

In vivo 実験系の PH 施行ラットを用いて、SAC およびその他の含硫アミノ酸の肝再生促進作用を検討した。肝再生促進作用は、体重 100 g あたりの肝重量 (LW/100 g BW) で評価した。Fig.5-I に PH 後の肝重量変化 (LW/100 g BW) を、Fig.5-II には、体重変化を示した。また、薬物は経口投与した。

疑似手術 (Sham) 群における PH 後 12 日間の LW/100 g BW は、 3.08 ± 0.09 g/day であった。一方で、各群において体重変化の大きな差はみられなかった。Control 群は PH 後 3 日に急激な LW/100 g BW の増加がみられた。その後、PH 後 7 日目では LW/100 g BW の減少がみられ、PH 後 12 日目にかけて LW/100 g BW が再び増加した。これに対して、300 mg/kg SAC 投与群では control 群と同様に PH 後 3 日に急激な LW/100 g BW の増加がみられた。その後、PH 後 12 日目まで増加傾向であった。また、control 群における LW/100 g BW のピークは PH 後 5 日目に認められたのに対し、300 mg/kg SAC 投与群では PH 後 3 日目に認められた。PH 後 3 日目における LW/100 g BW は、SAC 投与群では control 群と比べて、約 1.2 倍高かった。LW/100 g BW の 2 つめのピークは PH 後 10 日目にみられ、PH 前とほぼ同等であった。また、PH 後 1 日目から 12 日目の間で、3 日目および 5 日目以外では有意な差はみられなかった。対照的に、SMC 投与群および Cys 投与群は、PH 後 1 日目から 12 日目の間で control 群と比較して肝重量の変化はみられなかった。

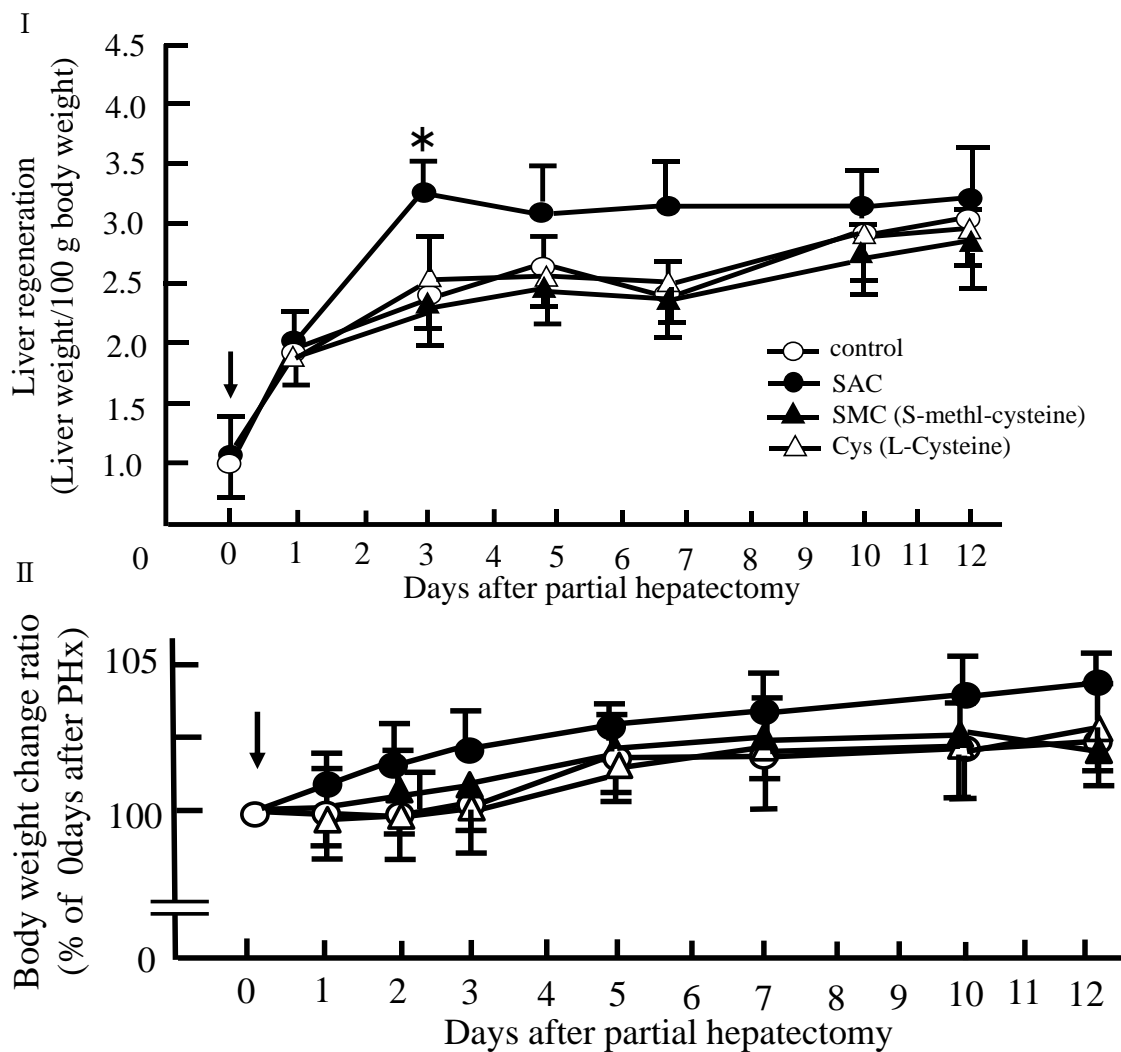


Fig.5 70 %部分肝切除ラットにおける SAC とその他含硫アミノ酸の肝再生促進作用の経時的変化

薬物処理 : control (saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg), SMC (300 mg/kg), Cys (300 mg/kg)

矢印 : 70 %PH および薬物投与

値 : 平均値±S.E.M. (n=5~8)

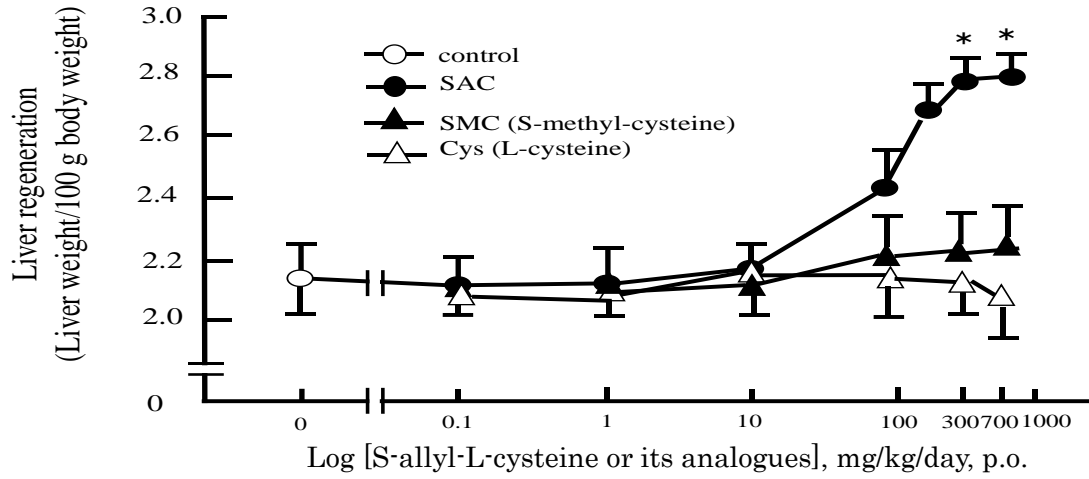
有意差 : control に対する有意差 (*P<0.05)

3-2. 70 % 部分肝切除 (PH) 後 3 日目における SAC とその他の含硫アミノ酸の用量-反応関係の検討

3-1 の結果より、PH 施行ラットにおける SAC の肝再生促進作用は、PH 後 3 日目に認められた。そこで、PH 後 3 日目における LW/100 g BW の変化と SAC 投与量との関係を SMC および Cys 投与群と比較し、検討した。PH 後 3 日目において、SAC (1-700 mg/kg) は、用量依存的に肝再生促進作用を示した (Fig.6-I)。また、最大反応は 300 mg/kg SAC でみられた。対照的に、SMC (1-700 mg/kg) と Cys (1-700 mg/kg) は LW/100 g BW に対して影響を及ぼさず、肝再生促進作用を示さなかった。

尚、各群において体重変化に有意差はみられなかった (Fig.6-II)。

I



II

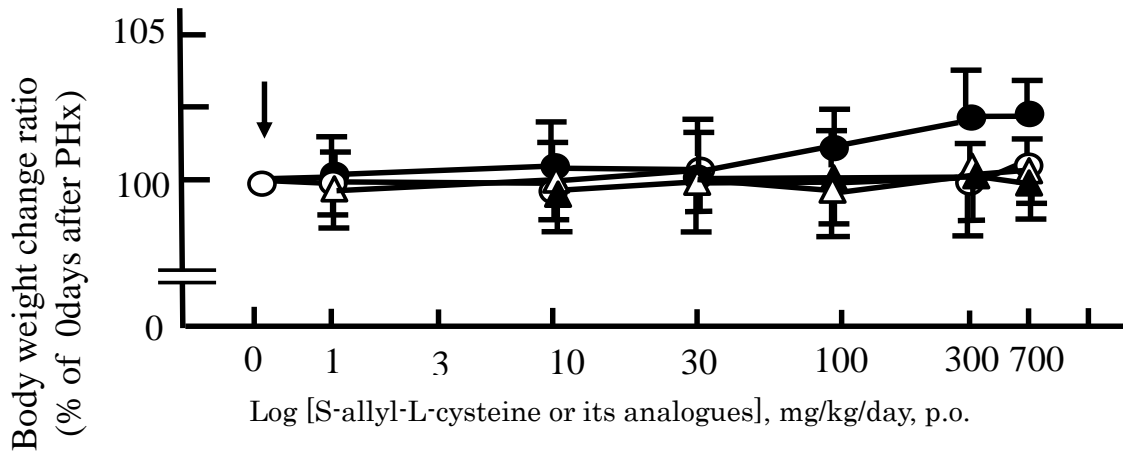


Fig. 6 70% 肝切除後3日目におけるSACとその他の含硫アミノ酸の用量-反応関係

肝切除 後：3日目

矢印：70%PH および薬物投与

値：平均値±S.E.M. (n=5~8)

有意差：control に対する有意差 (*P<0.05)

3-3. 70 %部分肝切除 (PH) ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用の経時的変化の検討

70%PH 施行ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用の経時的変化を BrdU 免疫化学的染色法を用いて検討した。

Fig.7 に PH 後 1 日目における control(I)、300 mg/kg SAC(II)、300 mg/kg SMC(III)および 300 mg/kg Cys(IV)の免疫組織化学染色の顕微鏡像を示した。活発な DNA 合成能を示している肝細胞核は BrdU を取り込み、茶褐色に染色された。PH 後 1 日目における BrdU 陽性核は、SMC 投与群あるいは Cys 投与群よりも SAC 投与群でより多く認められた (Fig.7)。

Fig.8 には、PH 後 0-5 日目における SAC の効果の経時的変化を BrdU labeling index (BrdU-LI)を用いて示した。BrdU-LI は、Sham 群において 0.2% 以下と少なかった。Control 群において BrdU-LI は緩やかに増加し、PH 後 1 日目にピークに達し、その後 3 日目までに control レベルまで減少した。これらに対し、300 mg/kg SAC 投与群の BrdU-LI は PH 後 1 日目において control 群と比較して、約 2.8 倍に増加し、その後、その後 3 日目までに control レベルまで減少した。一方で、SMC 投与群および Cys 投与群は control 群と比較して有意な差は認められなかった。

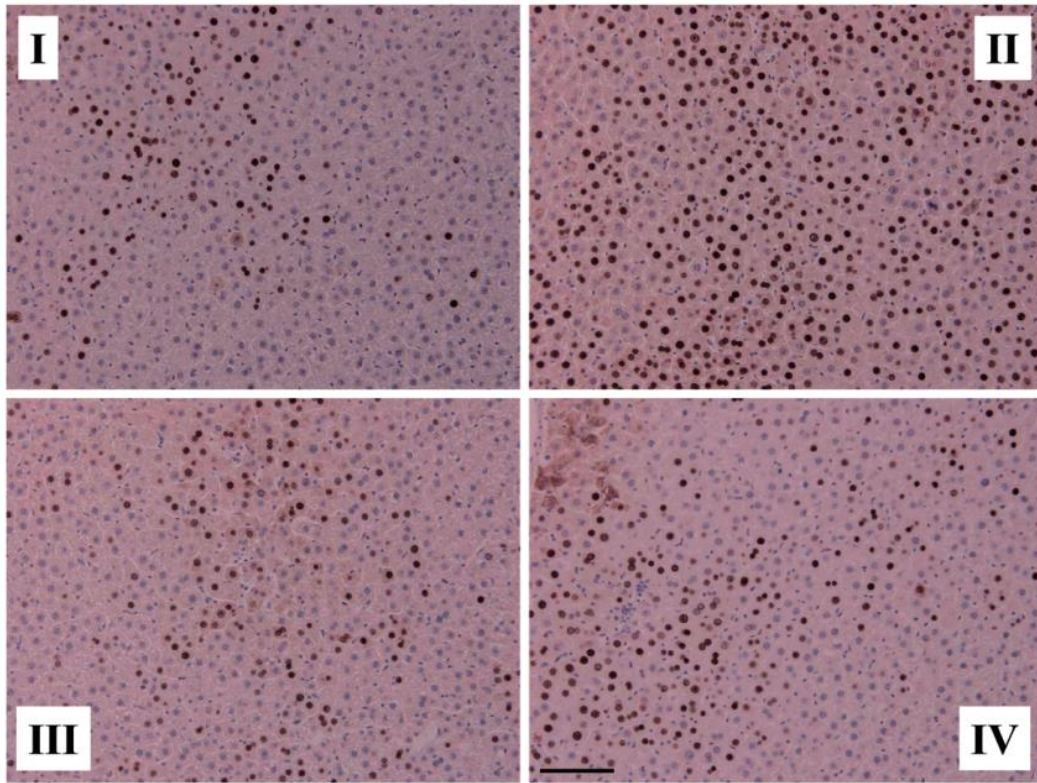


Fig.7 部分肝切除 1 日目における BrdU 免疫染色の顕微鏡像

I : control (saline 0.5 ml/kg) , II : SAC (300 mg/kg), III : SMC (300 mg/kg),

IV : Cys (300 mg/kg)

肝切除後 : 1 日目

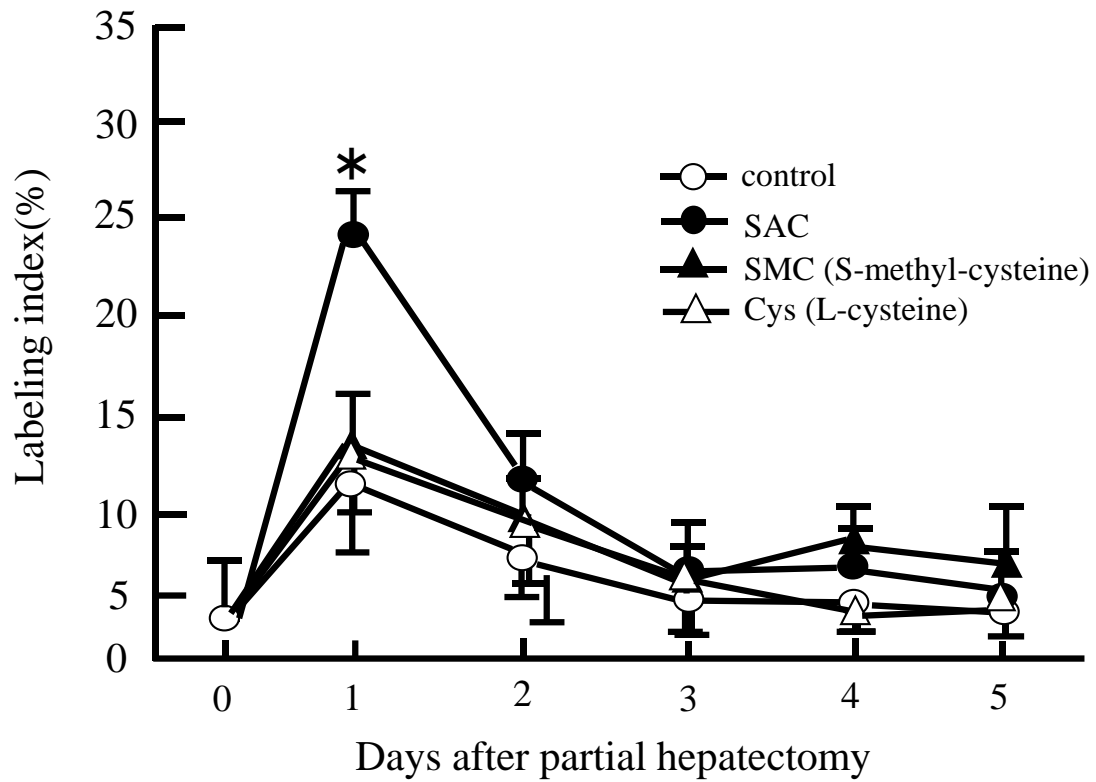


Fig.8 70 %部分肝切除ラットにおける SAC とその他含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用の経時的変化

薬物処理 : control(saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg), SMC (300 mg/kg), Cys (300 mg/kg)

肝切除後 : 1-5 日目

値 : 平均値 ± S.E.M.(n=3)

有意差 : control に対する有意差 (*P<0.05)

3-4. 70 %部分肝切除 (PH) ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性の経時的変化に及ぼす SAC とその他の含硫アミノ酸の作用の効果の検討

SAC が PH 後の肝機能に作用するかを血清トランスアミナーゼ活性 (ALT および AST) を測定することで評価した。Control 群において血清 ALT 活性値のピークは肝切除後 1 日目にみられた (Fig.9-I)。肝切除後 3 日目において、血清 ALT 活性値は部分肝切除前の値まで急激に減少し、部分肝切除後 5 日目まで持続した。対照的に、部分肝切除後 1 日目における SAC 投与群および SMC 投与群の血清 ALT 活性値は control 群と比較して減少がみられた。Cys 投与群では control 群と比較して、血清 ALT 活性値の有意な差は認められなかった。

Control 群では PH 後の血清 AST 活性の急激な増加がみられ、部分肝切除後 1 日目においてピークがみられた。SAC、SMC および Cys は control 群と同様の挙動を示し、血清 AST 活性に影響を及ぼさなかった (Fig.9-II)。

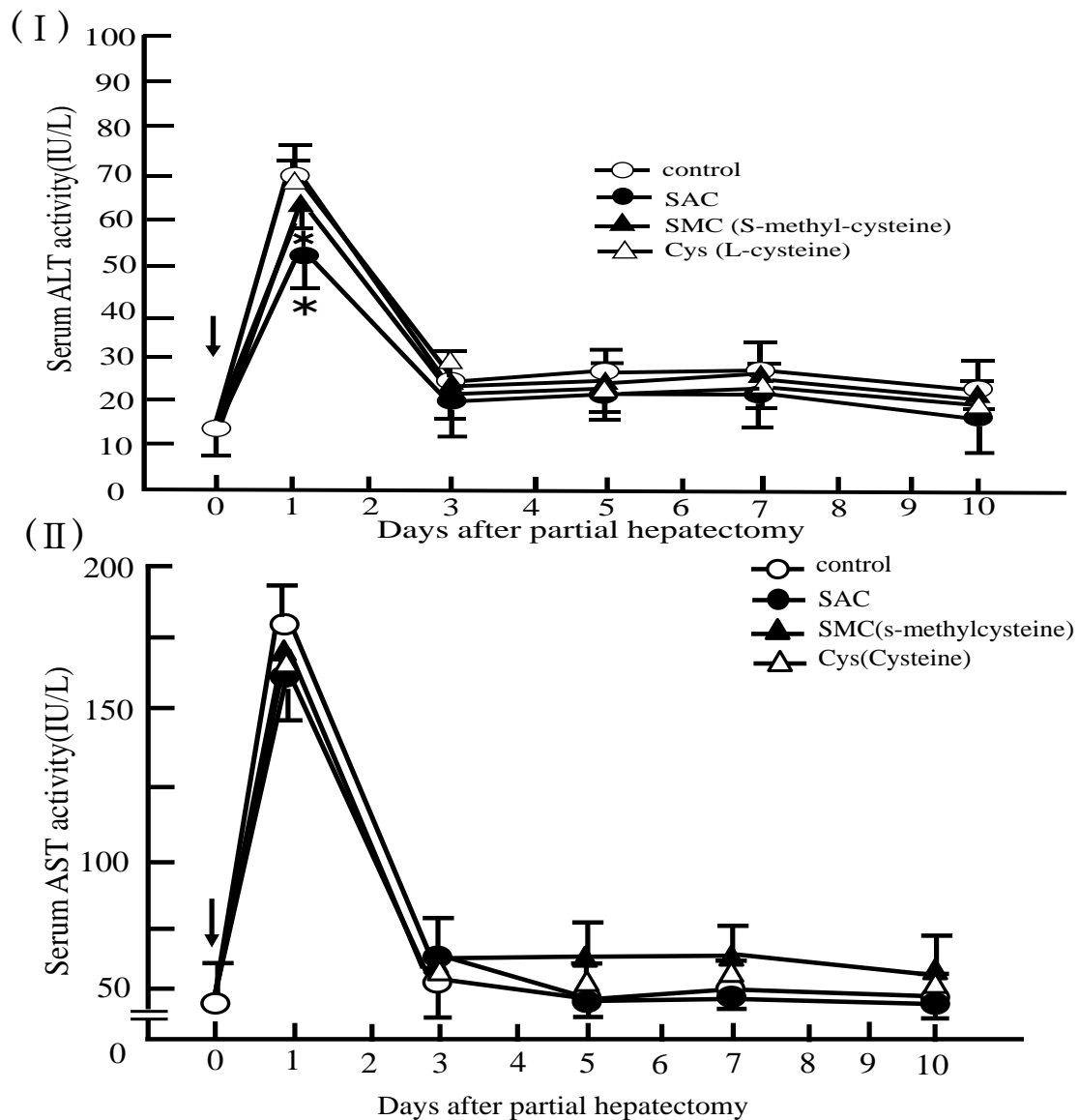


Fig.9 70%部分肝切除ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性に及ぼすSACとその他の含硫アミノ酸の作用の経時的変化

薬物処理 : control (saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg), SMC (300 mg/kg),

Cys (300 mg/kg)

肝切除後 : 1-10 日目

値 : 平均値±標 S.E.M. (n=3)

有意差 : control に対する有意差 (*P<0.05)

3-5. 70 %部分肝切除 (PH) ラットにおける種々の成長因子の mRNA 発現に及ぼす SAC の作用の検討

SAC の肝再生促進作用は、成長因子を介しているのではないかという仮説を立て、どの成長因子が関与しているのかを調べるために、種々の成長因子およびそれらの受容体をコードする mRNA の残余肝中の発現量の変化を RT-PCR を用いて検討した。その結果、IGF-1 mRNA が SAC 投与後、control 群と比較して約 1.6 倍と急速に増加し、PH 後 1 時間でピークに達した。その後、IGF-1 mRNA は急速に減少し、PH 後 6 時間で control レベルに戻った。(Fig.10 I-II) また、IGF-1 受容体 mRNA は、IGF-1 mRNA よりはやや弱いものの、control 群と比較して約 1.3 倍と有意に上昇した (Fig.10-II)。対照的に、HGF、TGF- α 、HGF 受容体および TGF- α 受容体の mRNA は control 群と比較して変化はみられなかった (Fig.10 III-VI)。

一方、SMC および Cys は、PH 後 1 時間において、IGF-1 およびその受容体の mRNA レベルに有意な影響を及ぼさなかった (Fig.11 I-II)。

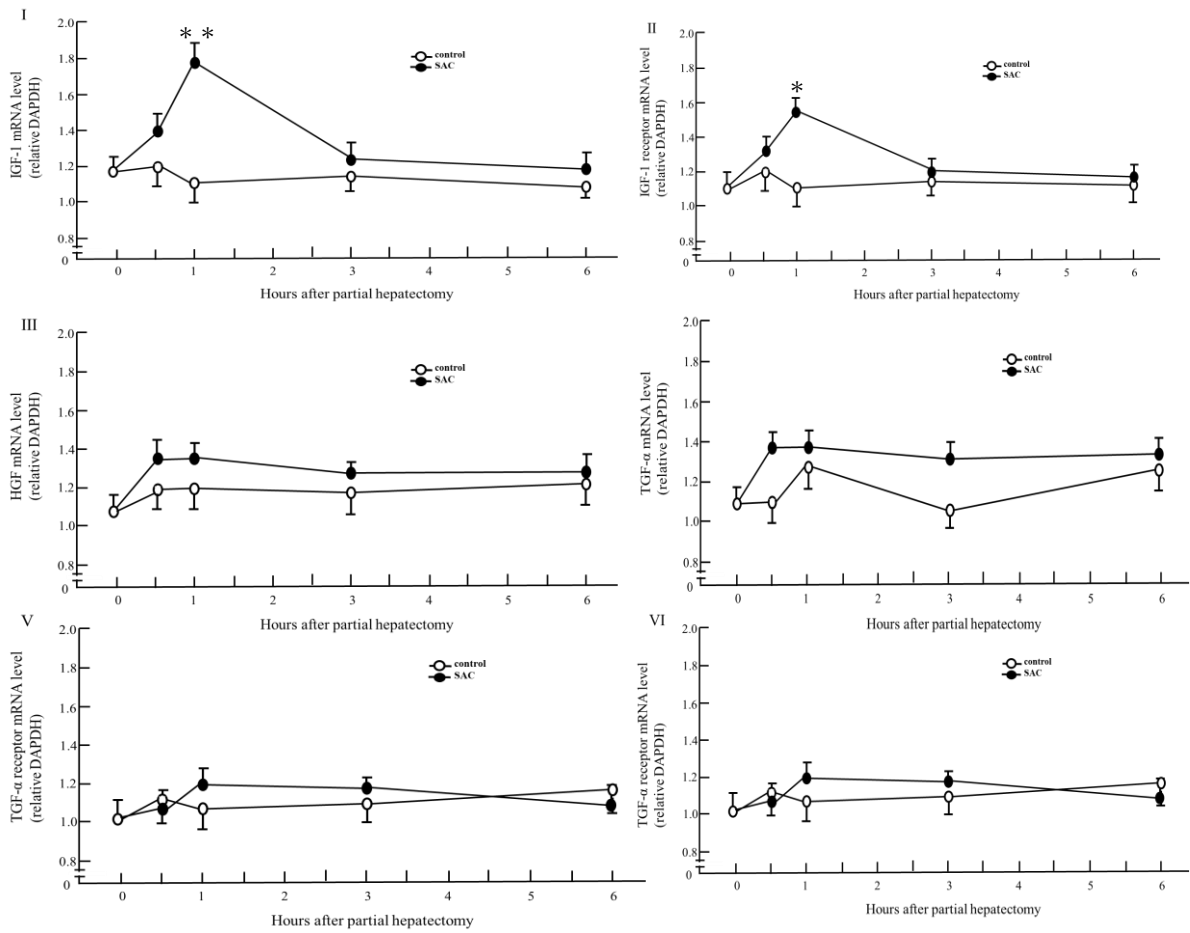


Fig. 10 70%部分肝切除ラットにおける種々の成長因子の mRNA 発現に及ぼす SAC の作用

I : IGF-1, II : IGF-1 receptor, III : HGF, IV : Met, V : TGF- α , VI : TGF- α receptor

薬物処理 : control (saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg)

肝切除後 : 1~6 時間

値 : 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

有意差 : control に対する有意差 (* $P < 0.05$)

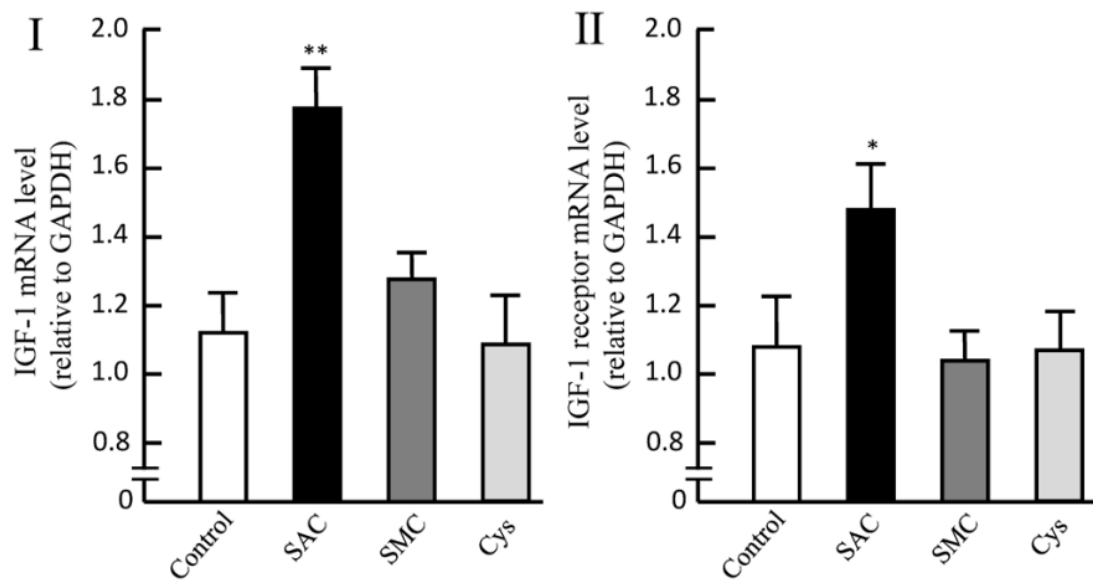


Fig. 11 70%部分肝切除ラットにおける IGF-1 および IGF-1 receptor mRNA 発現に及ぼす

SAC とその他の含硫アミノ酸の作用

薬物処理 : control (saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg), SMC (300 mg/kg),

Cys (300 mg/kg)

肝切除後 : 1 時間

値 : 平均値 ± S.E.M. (n=3)

有意差 : control に対する有意差 (*P<0.05)

3-6. 70 %部分肝切除 (PH) ラットにおける SAC 投与による血清 growth hormone (GH) 濃度の経時的変化の検討

3-5. より SAC の投与によって IGF-I mRNA の発現量の増加に増加が認められた。一方で IGF-I mRNA の発現量の増加させる因子として、GH が挙げられる^{37,38)}。

そこで、SAC 投与による IGF-I 発現量の増加が、血清 GH 濃度の上昇を介しているかを GH ELISA kit を用いて検討した。

PH 後 0~3 時間において、control 群および 300 mg/kg SAC 投与群では、有意な差はみられず、SAC は、血清 GH 濃度の変化に影響を及ぼさなかった。

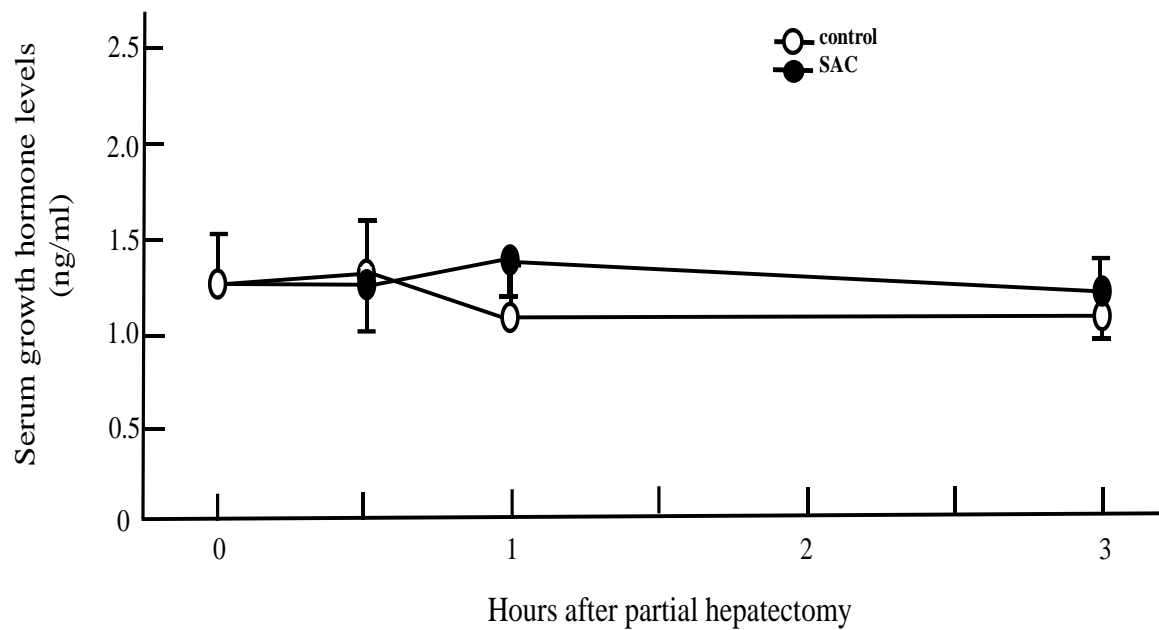


Fig. 12 70%部分肝切除ラットにおける SAC 投与による血清 Growth hormone (GH) 濃度の経時的变化

薬物処理 : control (saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg)

肝切除後 : 1~3 時間

値 : 平均値 ± S.E.M. (n=3)

有意差 : control に対する有意差 (*P < 0.05)

3-7. 70 %部分肝切除 (PH) ラットにおける SAC の ERK1/2 および Akt リン酸化活性促進作用の検討

ERK1/2 (p44 ERK1, p42 ERK2) および Akt のリン酸化活性を測定することで、SAC の投与によって誘発された IGF-1 mRNA が細胞内シグナル伝達因子を介するかどうかを調べた。PH 後 1 時間において、control 群では p42 ERK2 リン酸化活性が増加した (Fig.13-I)。その後、PH 後 3 時間で PH 前のレベルまで減少した。対照的に、300 mg/kg SAC 投与群における p42 ERK2 リン酸化活性は PH 後 1 時間から活性値の増加がみられ、PH 後 3 時間まで活性値の増加が持続した (Fig.13-I)。一方で、p44 ERK1 は PH および SAC 投与の影響を受けなかった (Fig. 13-II)。

Akt のリン酸化パターンは、PH 後の p42 ERK2 リン酸化パターンと類似した挙動を示した (Fig.13-III)。すなわち、SAC 投与群における Akt リン酸化活性は、PH 後 3 時間において、control 群と比較して有意に増加した。

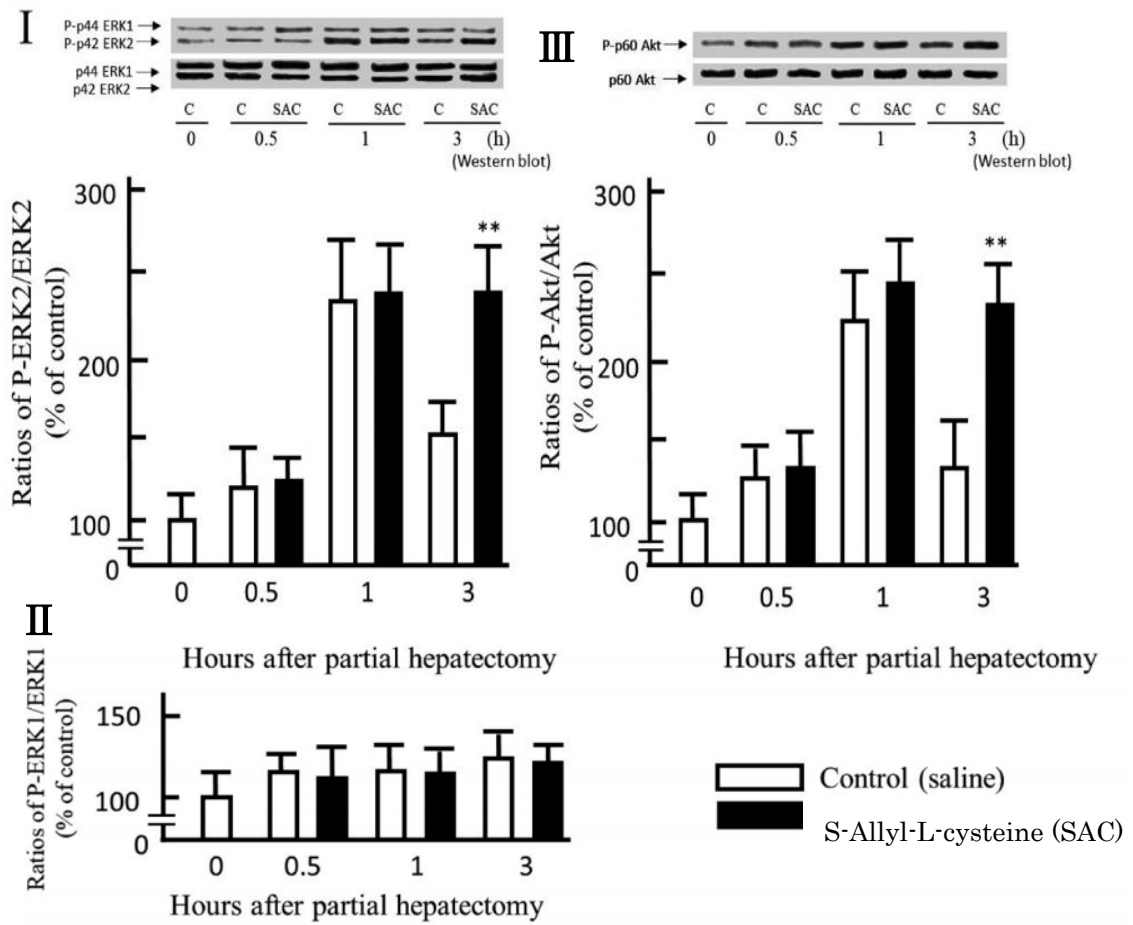


Fig. 13 70%部分肝切除ラットにおけるSACのERK1/2およびAktリン酸化活性促進作用

用

薬物処理：control (saline 0.5 ml/kg), SAC (300 mg/kg)

肝切除後：0.5~3 時間

値：平均値±S.E.M. (n=5)

有意差：control に対する有意差 (*P<0.05)

4. 考察

4-1. 70%部分肝切除ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の肝再生促進作用の検討

本研究では *in vivo* 実験系の肝再生モデルである PH ラットを用いて SAC の肝再生促進作用の経時的変化を検討した。Control 群は PH 後 12 日までに肝臓の再生がほぼ完了していた。この結果は Higgins と Anderson の報告と一致する³⁾。Fig.5-Iより PH 後 3 日目において、SAC 投与群の LW / 100 g BW は control 群と比較して有意な増加を示した。また、SAC 投与群の LW / 100 g BW は、PH 後 3 日目までに PH 前肝重量の 90 %以上に達した。即ち、SAC は PH 後の肝再生を促進させることが示された。

Fig.6-Iより、PH 後 3 日目において、SAC (1-700 mg/kg) は、用量依存的に肝再生促進作用を示し、その最大反応は SAC (300 mg/kg) であった。SAC はこれまでに様々な作用が報告されている。例えば、SAC の抗酸化作用に基づく肝細胞保護効果は、その用量が一般的に、1 - 150 mg/kg で得られることが報告されている²⁸⁾⁻³¹⁾。一方で、Nam らは、SAC (300 mg/kg) がマウスの海馬歯状回におけるセロトニン 1A 受容体発現量の増加を介して ki-67 の発現量を大幅に増加させることにより、神経芽細胞の増殖を促進したと報告している²⁰⁾。即ち、SAC は 1-150 mg/kg と低用量では抗酸化作用を示し、300 mg/kg と比較的高用量で細胞の増殖促進作用を示すことが考えられる。そして、本研究でも同様に、70%PH ラットにおける SAC の肝再生促進作用は 300 mg/kg 以上の高用量で発現することが示された。

4-2. 70 %部分肝切除ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用の検討

PH ラットにおける SAC とその他の含硫アミノ酸の DNA 合成能促進作用を BrdU 免疫化学的染色法を用いて検討した (Fig. 7)。Control 群は、70 % PH 後 1 日目に DNA 合成のピークに達した (Fig. 8)。Michalopoulos らは、ラット肝臓における DNA 合成は、PH 後 12 時間後から開始され、24 時間後にはピークに達すると報告している⁵⁾。SAC 投与群では 70 % PH 後 1 日目において、control 群と比較して、BrdU-LI の有意な増加がみられた。グリチルリチンとビタミン A 誘導体である NIK-333 が PH 後の肝再生を促進し、この時の肝細胞の DNA 合成のピークが 70 % PH 後 1 日目にみられたとの報告がある^{32,33)}。これらと同様に、PH ラットにおける SAC 投与は、肝細胞の DNA 合成を有意に促進し、それに伴い、肝細胞増殖促進作用を増強したと考えられる。

4-3. 70 %部分肝切除ラットにおける血清トランスアミナーゼ活性に及ぼす SAC とその他の含硫アミノ酸の作用の経時的変化の検討

SAC が PH 後の肝機能に影響を及ぼすかどうかを血清トランスアミナーゼ活性 (ALT および AST) を測定することで評価した。Control 群において、PH 後 1 日目に ALT および AST の急激な増加がみられ、PH 後 1 日目にピークに達し、PH 後 3 日目までに control レベルに戻った (Fig. 9-IおよびII)。これらの一時的な増加は、肝臓の切除部位あるいは結紮部位の損傷に応答している可能性が考えられた。

PH 後 1 日目における血清 ALT 活性は、SAC 投与群と SMC 投与群で control 群と比較して有意に低かった (Fig. 9-I)。Cys は血清 ALT 活性値および血清 AST 活性値のどちらにも影響を与えなかった。ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスやアセトアミノフェン誘発肝障害マウスにおいて、SAC や SMC が炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 の生合成を阻害することで抗炎症作用を示すことが証明されている³⁴⁾。一方で、TNF- α や IL-6 は肝再生の開始因子としても知られており、これらのノックアウトマウスでは肝再生が開始されなかったことが報告されている^{35,36)}。これらに対し、本研究では Fig. 5 および Fig. 6 に示したように、SAC や SMC 投与によって、肝再生は阻害されなかった。TNF- α や IL-6 などの肝再生開始因子の生合成を抑制しながらも、肝再生を促進する化合物にグリチルリチンが挙げられる。例えば、Kimura らは、PH ラットにおいて、グリチルリチンが肝再生を促進し、血清トランスアミナーゼ活性を低下させることを報告している³⁶⁾。一方で、Wang らは PH ラットにおいてグリチルリチンが TNF- α や IL-6 の生合成を阻害することを報告している³⁷⁾。このように肝再生に関して相反する作用を持つ化合物は SAC 以外にも存在する。

また、NSAIDs 誘発急性胃障害に対して、ニンニクから抽出された SAC である PMK-S005 が IL-1 β などの炎症性サイトカインの減少を介して胃保護作用を発揮したとの報告がある³⁸⁾。即ち、SAC および SMC の作用は、炎症性メディエーターの合成を阻害している可能性

が考えられる。

SAC および SMC が血清 AST 活性値を減少させなかった明確な理由は不明であるが、AST は ALT とは異なり、肝臓以外の臓器にも多く存在していることがわかっている。即ち、SAC および SMC は肝特異的に作用することによって、血清 ALT 活性値のみを減少させたと考えられる。

4-4. 70 %部分肝切除ラットにおける種々の成長因子の mRNA 発現に及ぼす SAC の影響

および SAC の ERK1/2 および Akt リン酸化活性促進作用の検討

RT-PCR を用いて、SAC の肝再生促進作用に関わる成長因子の mRNA の発現を測定することにより検討した。SAC 投与群において PH 後 1 時間で血中ならびに肝臓中の IGF-I および IGF-I 受容体の mRNA の発現量が有意に増加した (Fig. 10-I および II)。IGF-I は増殖と生存に関与する成長因子の 1 つであり、その細胞内シグナル伝達経路には MAPK (p44 MAPK、ERK1、p42 MAPK、ERK2) 経路と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) -Akt1 経路が含まれる。以前、*In vitro* 初代培養肝実質細胞実験系において、IGF-I が PI3K を介して ERK2 による肝細胞の増殖を促進したことが報告されている³⁹⁾。本研究結果より、SAC の増殖促進作用は、IGF-I とその受容体をコードする mRNA の発現増加、および二次性の IGF-I 合成による ERK2 と Akt の活性化を介していることが示唆された。

IGF-I の合成は下垂体前葉から分泌される GH によって促進される⁴⁰⁾。GH は、肝細胞における Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) 経路の活性化を介して、IGF-I およびその受容体の mRNA の発現を促進することがわかっている^{41,42)}。以上のことから、SAC による IGF-I mRNA の発現量の増加が GH の分泌によって促進されている可能性が考えられた。そこで、SAC 投与による IGF-I 発現量の増加が、血清 GH 濃度の上昇を介しているのかどうかを検討した。Fig. 12 より、SAC 投与群における血清 GH 濃度は、control 群と比較して有意な増加を示さなかったことから、SAC は肝細胞において GH 受容体/JAK/STAT 経路を直接的に刺激して IGF-I および IGF-I 受容体の mRNA の発現量を増加する可能性が考えられた。

SAC 投与群における HGF、TGF- α およびそれらの受容体の mRNA レベルは、control 群と比較して有意な増加は認められず、PH 後 6 時間以内ではそれらの mRNA の上昇はみられなかった。Michalopoulos と DeFrances は、HGF および TGF- α mRNA 発現レベルが、

control と同じ条件下において PH 後 12 時間でピークに達すると報告している⁵⁾。さらに、HGF は、PH 後直ちにウロキナーゼ/プラスミノゲンアクチベーター (uPA) の増加によって、不活性型である一本鎖 HGF (pro-HGF) から活性化され、HGF の血清レベルは PH 後 1 時間以内に 10~20 倍に増加することがわかっている⁶⁾。しかし、これらに対し、本実験では SAC を投与した場合、HGF、TGF- α およびそれらの受容体の mRNA レベルは、PH 後 6 時間以内に上昇しなかった。即ち、SAC の肝再生促進作用は IGF-1 およびその受容体の mRNA の増加を介している可能性が示唆された。

SMC および Cys の投与が、PH 後 1 時間で IGF-I とその受容体をコードする mRNA の発現を増加させるかどうかを調べたところ、SMC および Cys の投与は、IGF-I およびその受容体をコードする mRNA の発現に影響を与えなかった。したがって、SMC 投与群でみられた血清 ALT 活性値の低下は、IGF-I またはその受容体を介していないと考えられた。

小括

第1章では、SACの肝再生促進作用を *in vivo* 実験系モデルであるPHラットを用いて検討した。SACの肝再生促進作用は、用量依存的であり、DNA合成促進作用に伴って肝重量を増加させることを見出した。SACは、その構造にアリル基を含む含硫化合物である。アリル化合物は、SMCやS-propylcysteineなどの非アリル化合物よりも強力なスカベンジャー活性を有している^{42,43)}。さらに、Nrf2の活性化に関与することも知られている⁴³⁾。Nrf2は活性酸素などで活性化される転写因子であり、細胞保護効果や抗炎症作用をもつことが知られている。SACはNrf2-keap1複合体のシステイン残基を修飾することによってNrf2を活性化する⁴³⁾。また、Nrf2活性化作用はallyl isothiocyanateやallyl methyl trisulfideなどの含硫化合物でも報告されている^{44,45)}。一方で、その構造中にアリル基をもたないSMCやCysは、IGF-1およびその受容体をコードするmRNAを増加させなかった。したがって、アリル基を有するSACは、*in vivo* 実験系モデルであるPHラットにおいて、少なくともIGF-1およびその受容体をコードするmRNAの発現を増加させることを介して、肝再生を促進させる働きを示す可能性が考えられる。

第2章 成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する SAC の細胞増殖促進作用とその機構に関する検討

1. 諸言

第1章では、SACがPHラットに対して、肝再生促進作用を示すことを見出した。また、SACは、(1)PHラットにおいて早期にIGF-1およびその受容体をコードするmRNAの発現を増加させること、(2)SACの肝再生促進作用には、ERKおよびAktの活性化が関与しているということが示唆された。そこで、本章では、SACの肝実質細胞に対する増殖促進作用とそのシグナル伝達機構に関して、*in vitro* 実験系である初代培養肝実質細胞実験系を用いて、細胞増殖の主要なシグナル伝達因子であるp95-kDa IGF-I受容体(p95-kDa IGF-I receptor)とERK、さらに、肝実質細胞の増殖に関与しているとされるp70S6キナーゼ(p70S6K)のリン酸化活性を測定することでより詳細な検討をすることを目的とした。

肝再生は、肝切除や化学物質などによって肝臓に何らかの損傷が生じた時に起こり、ホルモンやサイトカイン、成長因子などによって制御されている。例えば、部分肝切除後では、種々の細胞から放出されたホルモンやサイトカイン、成長因子などが肝実質細胞等のRTKやERKといった細胞内シグナル伝達因子を活性化することが知られている。RTKは、細胞外のリガンドの情報を細胞内へと伝達する役割を担っている。例えば、p95-kDa IGF-I受容体を介した細胞内シグナル伝達は、細胞の生存維持、発がん性や腫瘍の成長などを促進する。また、ERKは、肝実質細胞における増殖関連シグナル伝達因子であることがわかっており、成長因子などによって活性化されたERKは遺伝子発現などを調節し、細胞の分化、生存および増殖において重要な役割を担うことが知られている⁴⁶⁾。p95-kDa IGF-I受容体とERKの関連性についても報告がなされており、例えば、Fuらは骨格筋の肥大と再生に必要な骨格筋芽細胞の増殖過程において、その細胞内のERKの活性化がp95-kDa IGF-I受容体

によって制御されていると報告している⁴⁷⁾。また、SAC と ERK の関連性について、第 1 編の本論でも述べたように Feng らは SAC がヒト口腔がん細胞株 CAL-27 細胞において濃度依存的に MAPK/ERK 経路を阻害する結果、悪性口腔がんの進行を抑制したと報告している²⁵⁾。このように p95-kDa IGF-I 受容体と ERK は細胞増殖において非常に重要なシグナル伝達因子であると考えられる。そして、第 1 章で明らかになったように、SAC の肝再生促進作用においても、RTK や ERK やその下流に存在するシグナル伝達因子の関与が予想される。

そこで、第 2 章では、*in vitro* 実験系である初代培養肝実質細胞実験系を用いて、SAC の肝実質細胞に対する増殖促進作用を明らかにし、細胞増殖に関連する細胞内シグナル伝達因子のリン酸化活性を検出することで、肝実質細胞に対する SAC の増殖促進作用の詳細なシグナル伝達機構の解明を試みた。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験動物

第1章の「実験動物」の項目に準じた。

2-2. 肝実質細胞の単離と培養

ラット肝実質細胞の単離は、*in situ* コラゲナーゼ還流法により行った⁴⁹⁾。Wistar系雄性ラットに対し、ペントバルビタール (45 mg/kg) を腹腔内投与し麻酔した後、開腹し、門脈と下大静脈にカニューレーションを行い、前還流液及びコラゼナーゼ還流液を用いて、それぞれ一定時間還流し、肝臓の結合組織を消化させた。その肝臓を取り出し、Ca²⁺-free-Hanks液中で十分に肝細胞を分散させ、遠心分離 (600 rpm, 1 min×2 times) した。更に、肝細胞を5%ウシ新生児血清 (newborn bovine serum: NBS) 含有の minimum essential medium 液 (以下、MEM と略す) に分散し、遠心分離 (600 rpm, 1 min×2) を行い、肝実質細胞を単離した。単離した肝実質細胞は、トリパンブルー排除試験により細胞の生死を判断し、生存率 97%以上のものを実験に用いた。

単離した肝実質細胞を5% NBS 及び 10⁻¹⁰ M dexamethasone 含有 MEM に細胞播種密度が 3.3×10⁴ cells/cm² となるように調製し、それを 6-well collagen-coated plastic culture dish (35 mmφ) に播種した。その後、37 °C、5% CO₂ 存在下で3時間培養し、ディッシュに肝実質細胞を接着させた⁴⁷⁾。肝実質細胞接着後、培地を無血清 MEM に交換し、SAC や特異的シグナル伝達因子阻害薬などの薬物を添加し、一定時間培養した。

2-3. 肝実質細胞の核数計測

核数の計測は、Nakamura らの方法を一部改変して行った⁴⁹⁾。肝実質細胞を単離し、接着させ、無血清 MEM に交換後、種々の薬物で刺激し、一定時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、1% Triton X-100 含有 0.1 M クエン酸水溶液を 0.3 mL 加え、37°C で 5 分間静置し、細胞膜を溶解し裸核を得た。この液に同量の 0.3% trypan blue 含有 PBS を加え、核を染色し、血球計算盤を用いて核数を計測した。

2-4. 肝実質細胞の細胞周期の測定

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

2-5. リン酸化 IGF-1 受容体チロシンキナーゼの測定

リン酸化 IGF-1 RTK (95-kDa) は、抗リン酸化 IGF-1 RTK モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた Western blot 解析法により測定した。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、ディッシュに接着させた後、無血清 MEM へ交換し、SAC などを添加し、培養した。一定時間培養した後、肝実質細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 mL の lysis buffer (20 mM Tris buffer, pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2.5 mM

tetrasodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を加え、細胞をディッシュから剥離し、採取した。これを 3 min 超音波にかけ、遠心分離 (16,300 \times g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C)し、上清画分を煮沸 (5 min) し、サンプルとした。得られたサンプル (20 μ g/lane)を 7.5% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membrane に転写させた。その後、抗リン酸化 IGF-1 RTK モノクローナル抗体と反応させ、続けて horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて標識した。次に、リン酸化 IGF-1 RTK を ECL kit を用いて発光標識し、検出した。発光強度は化学発光解析装置 (KURABO, ChemiStage CC-16) を用いて測定及び解析を行った。尚、リン酸化 IGF-1 RTK (P-p95 kDa) は、非リン酸化 IGF-1 RTK モノクローナル抗体 (total p95kDa) を用いて標準化補正を行った。

2-6. リン酸化 ERK の測定

リン酸 ERK は、抗リン酸化 42/44 kDa MAPK モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology)を用いて、MAP キナーゼのアイソフォームである ERK1 (44 kDa) 及び ERK2 (42 kDa) 各々について Western blot 解析法により測定した^{48,49)}。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、ディッシュに接着させ、無血清 MEM へ交換し、SACなどを添加し、培養した。一定時間培養した後、肝実質細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 mL の lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH7.4, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin) を加え、細胞をディッシュから剥離し、採取した。これを 3 分間超音波にかけ、遠心分離 (16,300 \times g, 30 min, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた上清画分を煮沸(5 min)した。そのサンプル (20 μ g/lane) を 10% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membrane に転写させた。その後、抗リン酸化 MAPK モノクローナル抗体と反応させ、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクロー

ーナル抗体を用いて標識した。そして、リン酸化 MAPK を ECL kit を用いて測定し、解析を行った。尚、リン酸化 MAPK (P-p44 kDa /P-p42 kDa) は、非リン酸化 MAPK モノクローナル抗体 (total p44 kDa/p42 kDa) を用いて標準化補正を行った。

2-7. リン酸化 p70S6 キナーゼの測定

リン酸化 p70S6K は、抗リン酸化 p70S6K モノクローナル抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた Western blot 解析法により測定した。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、ディッシュに接着させ、無血清 MEM へ交換し、SAC などを添加し、培養した。一定時間培養した後、肝実質細胞を冷 PBS で 2 回洗浄し、0.2 mL の lysis buffer (10 mM Tris buffer, pH 7.4, 0.1% SDS, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin) を加え、細胞をディッシュから剥離し、採取した。これを 3 分間超音波にかけ、遠心分離 (16,300×g, 30 min, 4°C) し、得られた上清画分を煮沸 (5 min) した。そのサンプル (20 µg/lane) を 10% polyacrylamide resolving gel を用いた SDS-PAGE により分離し、PVDF membrane に転写させた。その後、抗リン酸化 p70S6K モノクローナル抗体と反応させ、続いて HRP 標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体を用いて標識した。そして、リン酸化 p70S6K を ECL kit を用いて測定及び解析を行った。尚、リン酸化 p70S6K (P-p70 kDa) は、非リン酸化 p70S6K モノクローナル抗体 (total p70 kDa) を用いて標準化補正を行った。

2-8. 実験材料

- Wistar 系雄性ラットは、三協ラボサービス (株) (東京) から購入した。
 - SAC、SMC、Cys は、東京化成工業(株) (東京)から購入した。
 - U-73122、U-73343、GF109203X、H-89、AG1478、LY294002、rapamycin は、Enzo Life Sciences (Dallas,TX,U.S.A.) から購入した。
 - BAPTA/AM は、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, U.S.A.) から購入した。
 - PD98059 は、Calbiochem-Behring (La Jolla, CA, U.S.A.) から購入した。
 - Minimum essential medium (MEM)、newborn bovine serum (NBS) は、Flow Laboratories (Irvine, Scotland) から購入した。
 - Collagenase (type II) は、Worthington Biochemical Co. (Freehold, NJ, U.S.A.) から購入した。
- その他の試薬は、市販の特級品を購入して用いた。

2-7. データの統計処理

第 1 章の「データの統計処理」の項目に準じた。

3. 実験結果

3-1-1. SAC による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化の検討

In vitro 実験系の成熟ラット初代培養肝実質細胞において、SAC が肝実質細胞に対して増殖促進作用を示すかどうかを検討した。細胞を接着させるために血清含有培地で 3 時間培養後、培地を無血清 MEM に交換し、SAC (10^{-6} M) を添加した時間を培養時間の 0 時間とし、培養 21 時間後までの肝実質細胞の核数の経時的変化を検討した結果を Fig. 14 に示した。

SAC は、培養 3.5 時間後から肝実質細胞の核数を増加させ始め、培養 5 時間後には最大となり、有意な核数の増加がみられた。また、培養 5 時間後の SAC 添加群では、control と比較し、約 1.16 倍と核数の有意な増加がみられた (Fig. 14)。

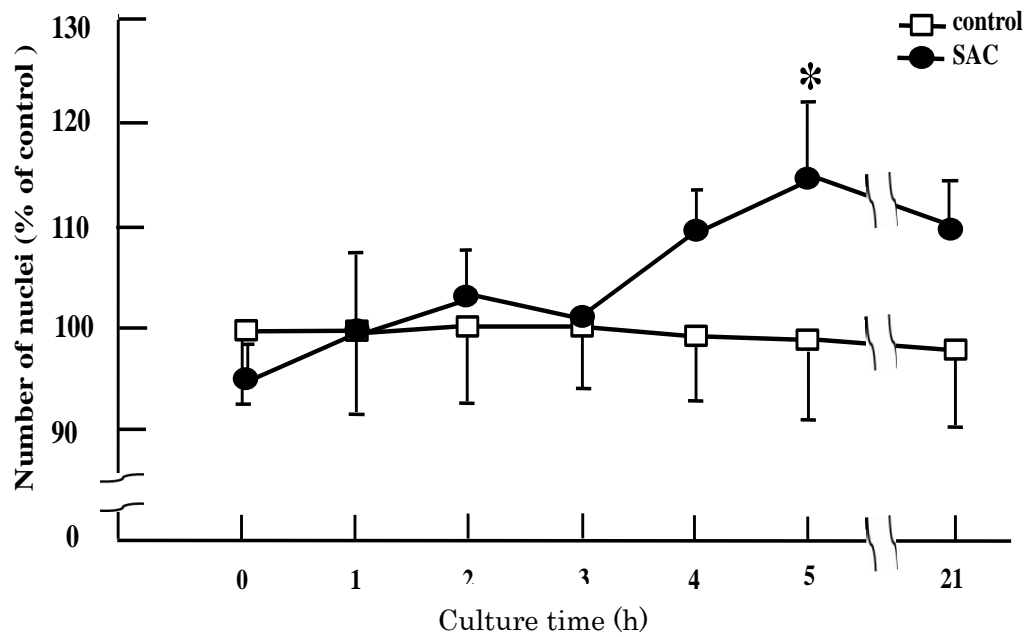


Fig. 14 SAC による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化

細胞密度 : 5.0×10^4 cells/cm²

薬物処理 : SAC (10^{-6} M)

値 : 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

有意差 : 各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-1-2. SAC による肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係

次に、SAC による増殖促進作用の用量-反応関係を検討した。経時的変化の結果より、培養時間を肝実質細胞増殖促進作用の最大反応が得られた 5 時間に設定し、種々濃度の SAC あるいは SAC の代謝物を添加し、核数の変化を検討した。

SAC は、用量依存的に肝実質細胞の核数を増加させた。SAC 3×10^{-7} M で、核数の増加がみられ、SAC 10^{-6} M で有意な核数の増加が認められた。この時、control 群と比較して約 1.2 倍となった。 10^{-6} M よりも高濃度である 3×10^{-6} M、 10^{-5} M では 10^{-6} M と比較して核数の減少が認められた。一方、SAC の代謝物である Alliin および Allicin は 10^{-8} - 10^{-5} M において、肝実質細胞の細胞増殖促進作用に対してほとんど影響を与えなかった (Fig. 15)。

尚、陽性 control として epidermal growth factor (EGF) を添加した結果、EGF 添加群は control 群と比較して 1.13 倍と核数の増加傾向がみられた (Fig. 15)。

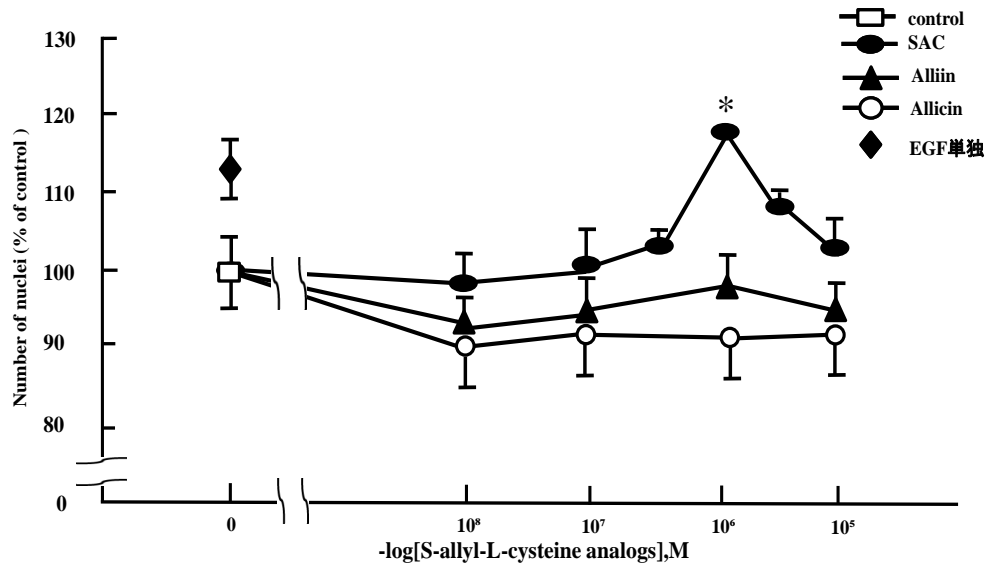


Fig 15. SAC による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

薬物処理：SAC, Alliin, Allicin, epidermal growth factor (EGF 20 ng/ml)

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-1-3. SAC の肝実質細胞増殖促進作用における播種時の細胞密度の影響の検討

初代培養肝実質細胞における SAC の増殖促進作用に対する播種時の細胞密度 ($1.0 \sim 10 \times 10^4$ cells/cm²) の影響を検討した。3-1 および 3-2 の結果より培養時間は 5 時間、SAC の濃度は 10^{-6} M に設定した。

低密度条件下 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^4$ cells/cm²) における SAC の肝実質細胞増殖促進作用は密度依存的に大きくなり、 5.0×10^4 cells/cm² で、control 群と比較して、1.26 倍の核数の増加が認められた。一方、高密度条件下 ($7.0 \sim 10 \times 10^4$ cells/cm²) における SAC の肝実質細胞増殖促進作用は密度依存的に小さくなり、コンフルエントな 10×10^4 cells/cm² では、ほとんど核数の増加は認められなかった (Fig. 16)。

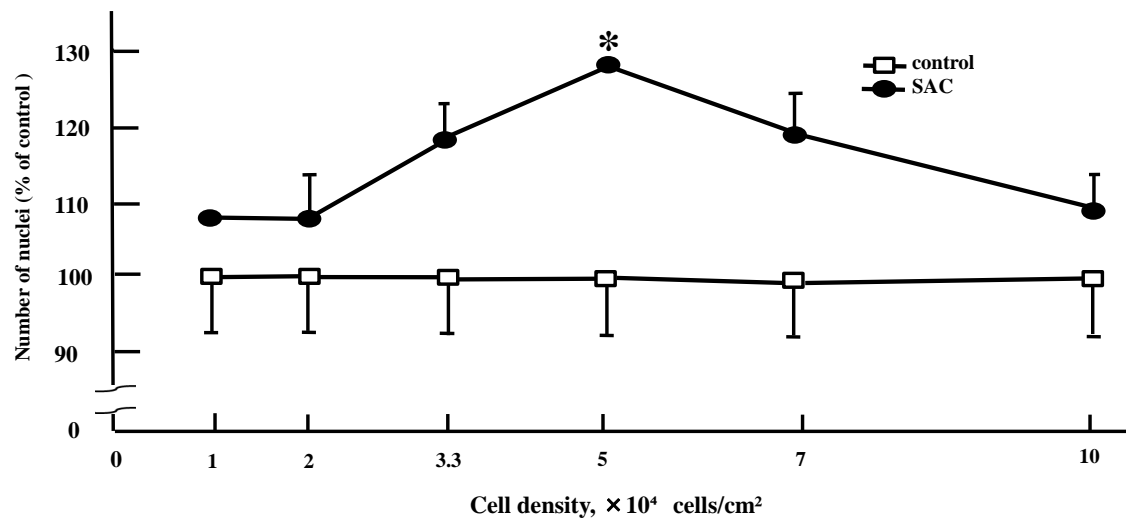


Fig 16. SAC の肝実質細胞増殖促進作用における播種時の細胞密度の影響

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

薬物処理：SAC (10⁻⁶ M)

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-1-4. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の薬理的検討

次に SAC の肝実質細胞増殖促進作用がどのような細胞内シグナル伝達経路を介して細胞増殖を果たしているのかを明らかにするために特異的シグナル伝達因子阻害薬を併用し、その効果を検討した。

本研究では、増殖関連シグナル伝達因子の特異的阻害薬として AG1478 (受容体チロシンキナーゼ阻害薬, 10^{-6} M)⁵⁴、LY294002 (PI3K 阻害薬, 3×10^{-7} M)⁵⁵、PD98059 (MEK 阻害薬, 10^{-6} M)⁵⁶、rapamycin (mTOR 阻害薬, 10 ng/mL)^{57,58}を用いた。また、2, 4-dideoxyadenosine (adenylate cyclase : AC 阻害薬, 10^{-6} M)⁵⁹、H-89 (protein kinase A : PKA 阻害薬, 10^{-6} M)⁶⁰、U-73122 (phospholipase C : PLC 阻害薬, 10^{-6} M)、GF109203X (protein kinase C : PKC 阻害薬, 10^{-6} M)⁶¹、BAPTA/AM (細胞膜透過性 Ca^{2+} キレート剤, 10^{-7} M)⁶²を、TG101209 (janus kinase 2 : JAK2 阻害薬 10^{-6} M) 用いた。

その結果、SAC (10^{-6} M) により誘発された肝実質細胞増殖促進作用は、AG1478、LY294002、PD98059 および rapamycin により control レベルまで抑制された (Fig. 17)。これらのことから、SAC による細胞増殖促進作用は少なくとも受容体チロシンキナーゼ、PI3K、MEK、mTOR といったシグナル伝達因子を介していることが示唆された。さらに、U-73122、BAPTA/AM、TG101209 によっても細胞増殖促進作用が抑制されたことから、JAK2/PLC/ Ca^{2+} 経路の関与も示唆された。一方、AC 阻害薬である 2, 4-dideoxyadenosine、PKA 阻害薬である H-89、PKC 阻害薬である GF109203X、STAT (signal transducer and activator of transcription) 阻害薬である SH-4-54 は、それぞれ SAC による細胞増殖促進作用に対して影響を与えなかった。尚、本実験で用いた特異的シグナル因子阻害薬は、用いた濃度では単独で肝実質細胞の細胞増殖促進作用に対し、影響を与えなかった。

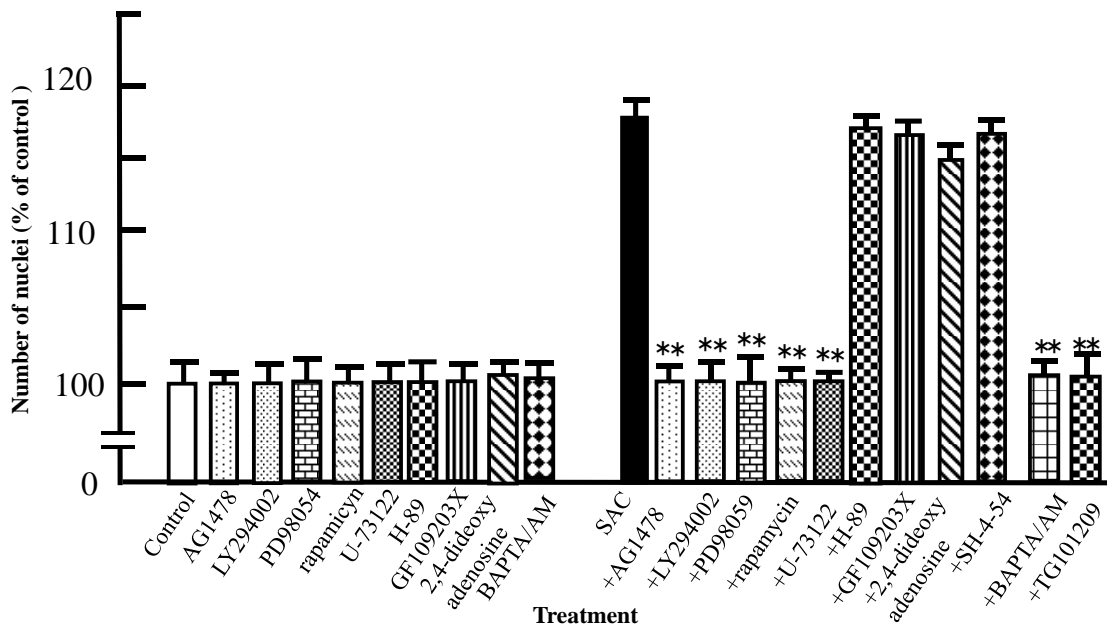


Fig 17. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に関する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

薬物処理：SAC (10^{-6} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (10^{-6} M), PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml), U-73122 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M), TG101209 (10^{-7} M), SH-4-54 (10^{-6} M)

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：SAC 単独添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-1-5. SAC の初代培養肝実質細胞に対する細胞周期の S 期移行性に関する検討

次に、実際に SAC により肝実質細胞の細胞周期の S 期への移行が促進しているか否かを検討した。SAC を添加した時間を培養時間の 0 時間とし、培養 5 時間後までの S 期の割合を測定した。

その結果、肝実質細胞の S 期の割合は、control では培養 0 時間と比較し、培養 5 時間後までの間で有意な変化はなかった。一方、SAC (10^{-6} M) は、control 群と比較して時間依存的に S 期への移行を促進した。培養 1 時間以降では control 群と比較し、S 期の増加がみられ、培養 3 時間後では約 2 倍と S 期の割合が増加した。その後、培養 5 時間後で control レベルまで戻った (Fig. 18)。

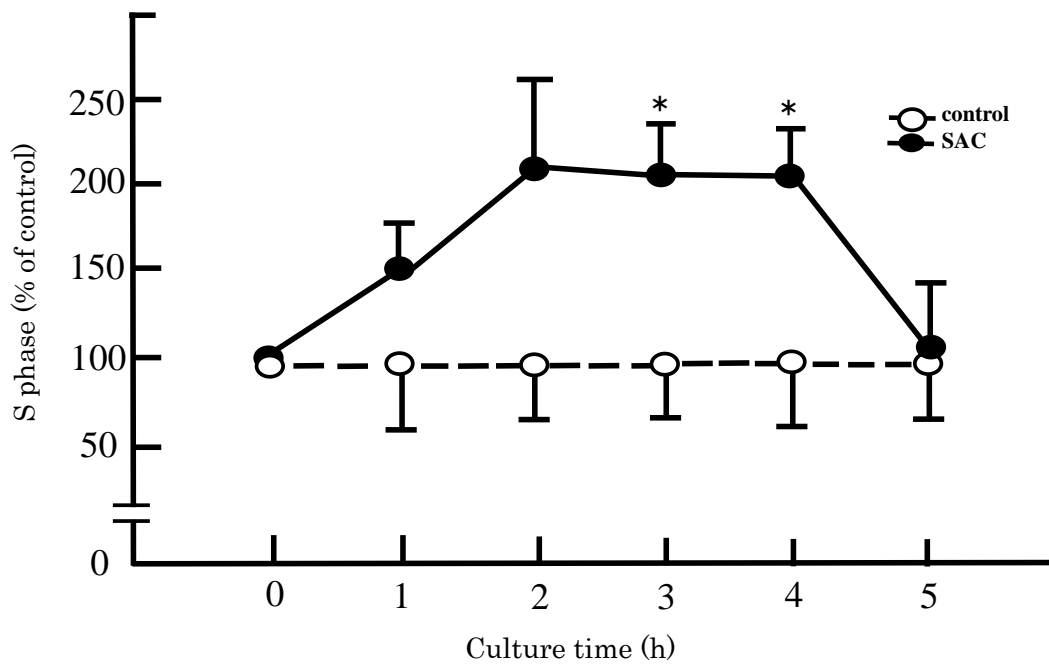


Fig 18. 初代培養肝実質細胞に対する SAC の S 期移行性の経時的変化

薬物処理：SAC (10^{-6} M)

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-2-1. SAC の初代培養肝実質細胞におけるリン酸化 RTK の経時的变化の検討

3-1-4 の結果から、SAC の初代培養肝実質細胞増殖促進作用は RTK/ERK 経路を介している可能性が示唆された。そこで RTK/ERK 経路に関して、より詳細な細胞内シグナル伝達機構を調べるために、SAC によるリン酸化 RTK の経時的变化を検討した。

培地を無血清培地に交換し、SAC (10^{-6} M) を添加した時の時間を培養 0 min とし、培養 45 min までの肝実質細胞における p95-kDa RTK リン酸化活性の経時的变化を検討した。SAC (10^{-6} M) による p95-kDa RTK リン酸化活性は、培養 5 min 後には上昇がみられ、培養 10 min 後には有意な上昇ピークを示した。その後は、培養 30 min までリン酸化活性の緩やかな減少を示し、培養 45 min にはほぼ control レベルとなった (Fig. 19)。

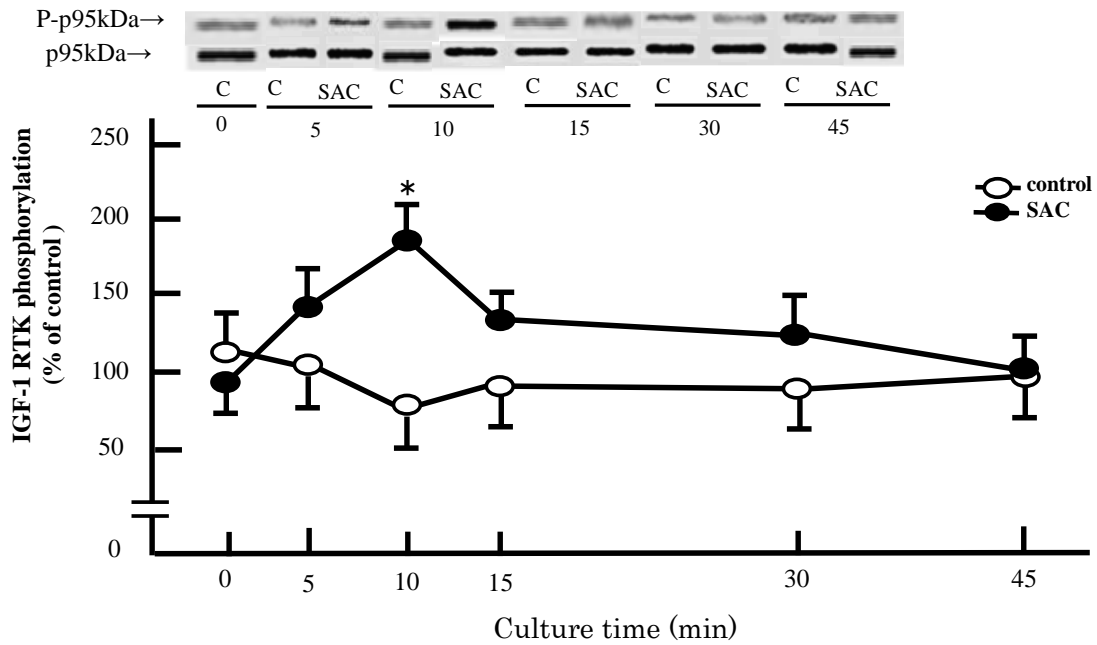


Fig 19. SAC の初代培養肝実質細胞における RTK のリン酸化活性促進作用の経時的変化

薬物処理：SAC (10^{-6} M)

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-2-2. SAC の初代培養肝実質細胞におけるリン酸化 ERK の経時的変化の検討

培地を無血清培地に交換し、SAC (10^{-6} M) を添加した時の時間を培養 0 分とし、培養 60 分までの肝実質細胞におけるリン酸化 ERK の経時的変化を検討した。

MAPK には ERK1 (p44-kDa) と ERK2 (p42-kDa) の 2 つのアイソフォームが存在するが、SAC (10^{-6} M) 刺激による MAPK リン酸化活性は ERK2 のみに認められ、ERK2 リン酸化活性は培養 30 min に一過性の上昇ピークが認められ、この時の活性は、control 群と比較して、約 2 倍であった。その後、ERK2 リン酸化活性は培養 60 min 後まで高い値を示した。一方、SAC 刺激による ERK1 リン酸化活性は培養 60 min 間では認められなかった (Fig. 20)。

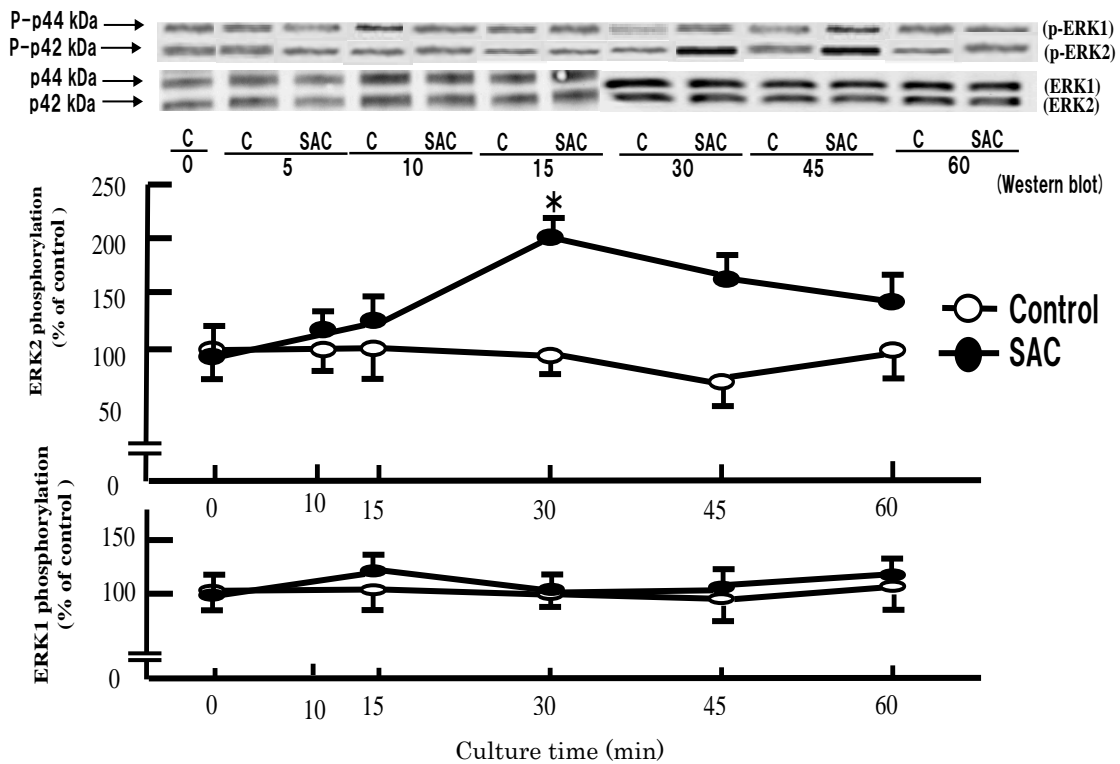


Fig 20. SAC の初代培養肝实质細胞における MAPK のリン酸化活性促進作用の経時的変化

薬物処理：SAC (10^{-9} M)

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-2-3. SAC の初代培養肝実質細胞におけるリン酸化 p70S6K の経時的変化の検討

培地を無血清培地に交換後、SAC (10^{-6} M)を添加したときの時間を培養 0 時間とし、培養 60 分までの肝実質細胞におけるリン酸化 p70S6K の経時的変化を検討した。

その結果、SAC 刺激による p70S6K リン酸化活性は培養 15 分後から上昇し、培養 30 分後にピークとなった。この時の活性は、control と比較して約 1.4 倍であった。また、培養 30 分以降、SAC 刺激による p70S6K リン酸化活性は、control 付近まで減少した (Fig. 21)。

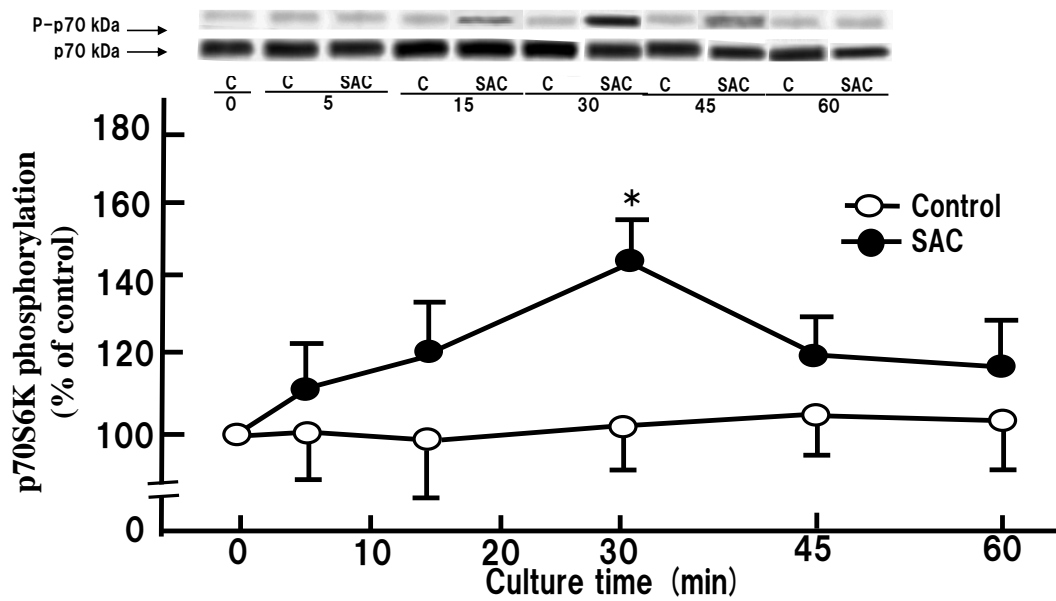


Fig 21. SAC の初代培養肝実質細胞における p70S6K のリン酸化活性促進作用の経時的変化

薬物処理：SAC (10^{-6} M)

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：無血清培地へ交換後 5 時間

値：平均値±S.E.M. (n=3)

有意差：各々の control に対する有意差 (*P<0.05)

3-3-1. SAC の初代培養肝実質細胞におけるリン酸化 RTK に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

3-2-1. の結果から、SAC によるリン酸化 RTK の経時的変化は、SAC 添加後 10 分後で最大となることが判明した。そこで、培養時間を 10 分に固定し、SAC による RTK のリン酸化活性がどの特異的シグナル伝達因子を介しているのかを推測するために、特異的シグナル伝達因子阻害薬 (分子標的薬) を用いて薬理的検討を行った。尚、特異的シグナル伝達因子阻害薬は、3-1-4. の実験と同様である。さらに本実験では、ベラパミル (Ca^{2+} チャネル阻害薬 10^{-6} M) と somatostatin (分泌顆粒分泌阻害薬 10^{-7} M) も用いた。

SAC 添加後 10 分における RTK のリン酸化活性は、AG1478 (10^{-6} M)、U-73122 (10^{-6} M)、BAPTA/AM (10^{-7} M)、verapamil (10^{-6} M)、somatostatin (10^{-7} M) によって、各々 control レベルまで抑制された。一方、LY294002 (10^{-7} M)、PD98059 (10^{-6} M)、rapamycin (10 ng/ml)、U-73343 (10^{-6} M)、H-89 (10^{-6} M)、GF109203X (10^{-6} M)、2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M) はいずれも、SAC 誘発 RTK リン酸化活性に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 22)。

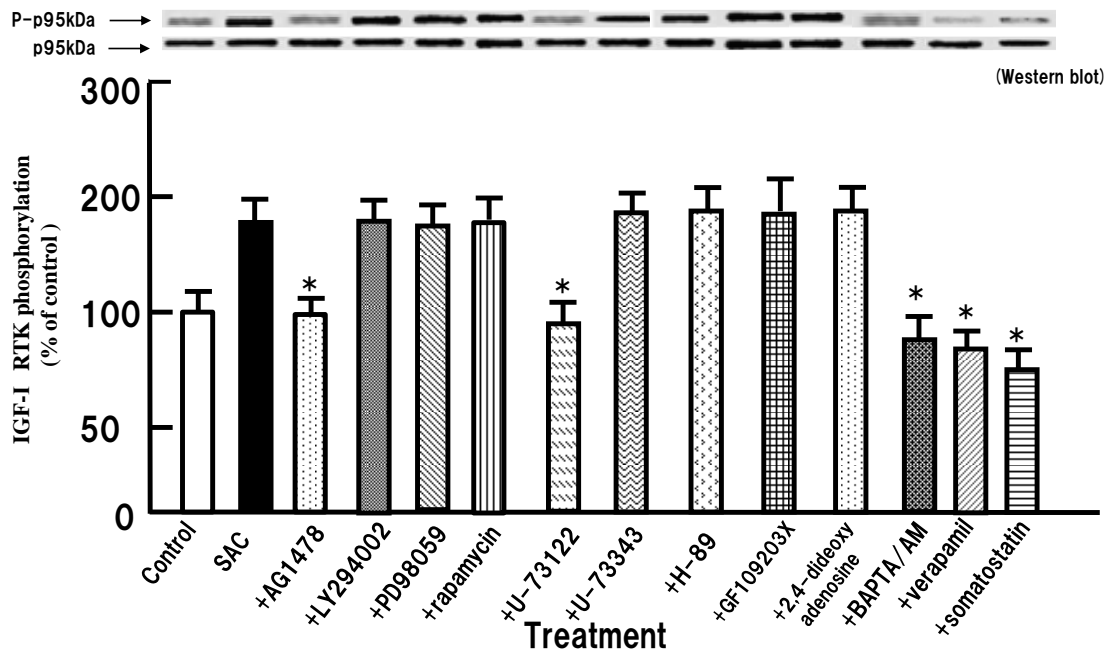


Fig 22. SAC の初代培養肝実質細胞における RTK のリン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

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

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間： SAC 添加後 10 分

値： 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

有意差： SAC 単独添加群に対する有意差 (*P<0.05)

3-3-2. SAC の初代培養肝実質細胞におけるリン酸化 ERK2 に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

3-2-2. の結果から、SAC によるリン酸化 ERK2 経時的変化は、SAC 添加後 30 分後で最大となることが判明した。そこで、培養時間を 30 分に設定し、肝実質細胞における SAC 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検討した。尚、本実験で用いた特異的シグナル伝達因子阻害薬は 3-3-1. と同様である。

SAC 誘発 ERK2 リン酸化活性は、AG1478 (10^{-6} M)、LY294002 (10^{-7} M)、PD98059 (10^{-6} M)、U-73122 (10^{-6} M)、BAPTA/AM (10^{-7} M)、verapamil (10^{-6} M)、somatostatin (10^{-7} M)によって、各々 control レベルまで抑制された。一方、rapamycin (10 ng/ml)、U-73343 (10^{-6} M)、H-89 (10^{-6} M)、GF109203X (10^{-6} M)、2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M) はいずれも SAC 誘発 ERK2 リン酸化活性に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 23)。

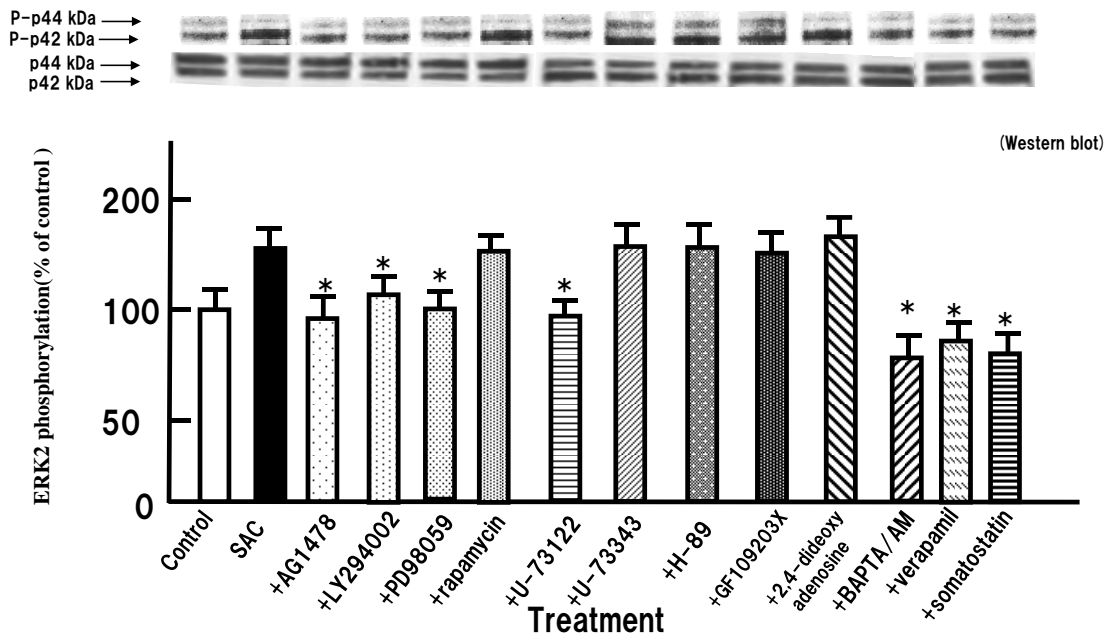


Fig 23. SAC の初代培養肝实质細胞における ERK2 のリン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

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

細胞密度 : 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間 : SAC 添加後 10 分

値 : 平均値±S.E.M. (n=3)

有意差 : SAC 単独添加群に対する有意差 (*P<0.05)

3-3-3. SAC の初代培養肝実質細胞におけるリン酸化 p70S6K に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果

3-2-3. の結果から、SAC によるリン酸化 p70S6K の経時的変化は、SAC 添加後 30 分後で最大となることが判明した。そこで、培養時間を 30 分に設定し、肝実質細胞における SAC の p70S6K リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬の効果を検討した。尚、本実験で用いた特異的シグナル伝達因子阻害薬は 3-3-1. と同様である。

その結果、SAC 誘発 p70S6K リン酸化活性は、AG1478 (10^{-6} M)、LY294002 (10^{-7} M)、PD98059 (10^{-6} M)、rapamycin (10 ng/ml)、U-73122 (10^{-6} M)、BAPTA/AM (10^{-7} M)、verapamil (10^{-6} M) および somatostatin (10^{-7} M) によって、各々 control レベルまで抑制された。一方、U-73343 (10^{-6} M)、H-89 (10^{-6} M)、GF109203X (10^{-6} M) と 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M) はいずれも SAC 誘発 ERK2 リン酸化活性に対して影響を及ぼさなかった (Fig. 24)。

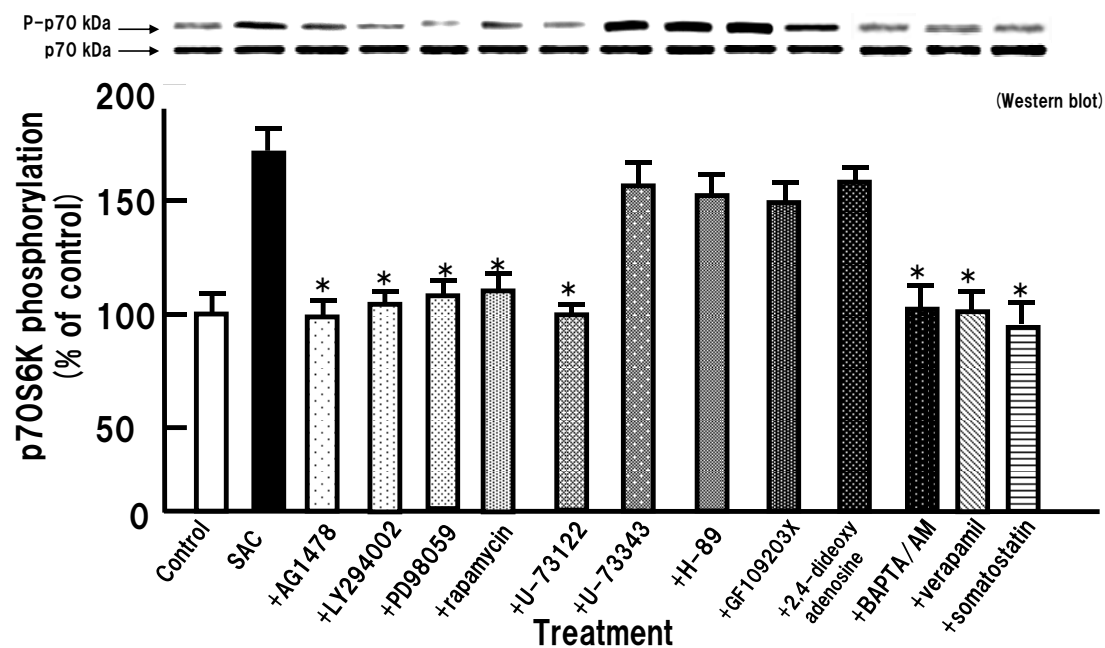


Fig 24. SAC の初代培養肝実質細胞における p70S6K のリン酸化活性に対する特異的シ
薬物処理： SAC (10^{-6} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (10^{-7} M), PD98059 (10^{-6} M),
rapamycin (10 ng/ml), U-73122 (10^{-6} M), U-73343 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M),
GF109203X (10^{-6} M), 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M),
verapamil (10^{-6} M), somatostatin (10^{-7} M)

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間： SAC 添加後 30 分

値： 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

有意差： SAC 単独添加群に対する有意差 (*P<0.05)

4. 考察

4-1. SAC の成熟ラット初代培養肝実質細胞に対する効果

本研究では、*in vitro* 実験系の肝再生モデルである初代培養肝実質細胞実験系において SAC の肝実質細胞増殖促進作用について検討を行った。

Fig. 14 では、SAC による肝実質細胞増殖促進作用の経時的変化を検討した。その結果、SAC (10^{-6} M) 添加後の培養時間に依存した細胞増殖促進作用が認められた。SAC (10^{-6} M) 添加後 3.5 時間で、肝実質細胞の核数が増加し始め、培養 5 時間後には最大反応を示した。これは、従来報告されていた肝実質細胞増殖促進作用より早期に細胞増殖が起こったことになる⁴⁸⁾。この早期の細胞増殖促進作用は EGF や HGF といった増殖因子でも同様の傾向がみられている^{49,53)}。細胞増殖が早期に起こった原因としてはいくつか考えられる。その1つとして、細胞播種時の細胞密度が挙げられる。肝実質細胞の増殖機構には、細胞密度が関係していると考えられている。*In vitro* 実験系において、肝実質細胞は高細胞密度条件下では培養約 40 時間以上経過しないと DNA 合成能の上昇がみられないのに対し、低細胞密度条件下では培養 5 時間程度で DNA 合成能の有意な上昇がみられた⁵¹⁾。さらに、*in vivo* 実験系では、肝切除後ラットの腹腔内スペースを制限することで肝再生が遅延するといった報告がある⁵⁵⁾。肝再生機構では詳しくは判明していないが、cell-to-cell communication や cell-to-cell contact といった細胞間での情報伝達が行われていると考えられている⁵⁵⁾。肝実質細胞増殖促進作用が早期に起こった2つ目の理由として、培養液中に含まれる dexamethasone の濃度が挙げられる。dexamethasone は初代培養肝実質細胞に対してその用量に依存して、HGF や EGF による肝実質細胞増殖促進作用を遅延させることがわかっている^{56,57)}。本研究の条件では、dexamethasone の濃度は 10^{-10} M であり、従来の研究と比較して低濃度であったため、細胞増殖が早期に起こった可能性がある。3つ目としては、本実験で肝実質細胞の単離に用いたコラゲナーゼ還流法の影響である。通常の肝細胞は G_0 期であり、細胞周期が静止

している状態であるが、コラゲナーゼによる還流を行い、結合組織を消化し、肝実質細胞を単離した場合、G₀期からG₁期への移行が始まる⁵⁸⁾。そして、血清含有培地で肝実質細胞を接着させるために3時間要しているため、肝実質細胞の細胞周期はS期へ移行する手前まである程度進行していると推測される。そのため、薬物の刺激に対して素早い反応を示し、DNA合成期であるS期へ早期に移行したと考えられる。

SACによる肝実質細胞増殖促進作用の用量-反応関係の検討において、SAC (10^{-8} - 10^{-6} M) は、用量依存的な肝実質細胞増殖促進作用を示した (Fig. 15)。SACにより誘発された細胞増殖促進作用の最大反応 (約1.2倍) は、既存の増殖因子であるEGFやTGF- α 、IGF-Iなどと同程度であった^{61,63)}。一方で、 10^{-6} Mよりも高濃度である 3×10^{-5} Mおよび 10^{-5} Mでは、 10^{-6} Mと比較して核数の減少が認められた。SACは高濃度で肝癌細胞の増殖を抑制するとの報告があり²⁴⁾、正常細胞においても、SACは高濃度で増殖を抑制する作用があるのではないかと考えられる。

4-2. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達機構の検討

SAC がどのようなシグナル伝達機構により、肝実質細胞増殖促進作用を示したのかを明確にするため、特異的シグナル伝達因子阻害薬 (分子標的薬) を用いて薬理的検討を行った。特異的シグナル伝達因子阻害薬を用いた実験は、何らかの増殖因子やサイトカインにより誘発された細胞増殖が、どのようなシグナル伝達因子を介するのかを調査するうえで非常に有用である。

Fig. 17 において明らかになったように、SAC 誘発肝実質細胞増殖促進作用は、RTK 阻害薬の AG1478、PI3K 阻害薬の LY294002、MEK 阻害薬の PD98059、mTOR 阻害薬の rapamycin によって各々コントロールレベルまで抑制された。これらの結果は、少なくとも SAC による肝実質細胞増殖促進作用が、それぞれの阻害薬の標的である受容体チロシンキナーゼ、PI3K、MEK および mTOR を介していることを示唆している。肝実質細胞では、多くの増殖因子 (HGF、TGF- α 、IGF-1 など) において、受容体チロシンキナーゼ \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow PI3K \rightarrow MAP キナーゼ \rightarrow mTOR といったシグナル伝達が行われ、細胞増殖が誘発されることがわかっている^{54,58,59)}。Fig. 17 に示すように SAC による肝実質細胞増殖促進作用もこれらの増殖因子と同様のシグナル伝達因子を介している可能性が高い。さらに、JAK2 阻害薬である TG101209、PLC 阻害薬である U-73122 および細胞膜透過性 Ca²⁺キレート剤である BAPTA/AM によって、SAC による肝実質細胞増殖促進作用が抑制されたことから、上記の増殖関連シグナル伝達因子に加え、JAK2/PLC/Ca²⁺経路を介している可能性が考えられた。即ち、細胞内の Ca²⁺濃度が上昇したことで、増殖因子受容体の受容体チロシンキナーゼを活性化したか、あるいは肝実質細胞からの何らかの増殖因子の自己分泌を促進させたということが考えられる。実際、肝実質細胞は TGF- α や IGF-I といった増殖因子を自身の細胞内に貯蔵しており、自己分泌する能力を持つ。また、growth hormone (GH) が肝実

質細胞からの IGF-1 の分泌を促進したという報告が既になされている⁶²⁾。

以上のことから、SAC は肝実質細胞に対して増殖促進因子として働くことが判明した。さらに、そのシグナル伝達の一部に受容体チロシンキナーゼ (RTK) /PI3K/MEK/mTOR/PLC/Ca²⁺を介することが示唆された。

4-3. 肝実質細胞における SAC による p95-kDa RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化作用の経時的変化の検討

3-2-1.、3-2-2. 及び 3-2-3. では初代培養肝実質細胞における SAC による p95-kDa RTK/MAPK 及び p70S6K リン酸化活性に対する影響の基礎的検討を行った。SAC 誘発 p95-kDa RTK のリン酸化活性は SAC 添加後、培養 10 分後で一過性の上昇を示した (Fig. 19)。同様の実験系において、EGF や TGF- α などの成長因子を添加した場合、EGF/TGF- α -RTK のリン酸化は、添加後約 3~5 分ほどで一過性のピークを示す^{59,61)}。即ち、SAC による p95-kDa RTK リン酸化作用は、成長因子と比較して数分のタイムラグが生じていた。また、SAC 誘発 MAPK リン酸化活性は、SAC 添加後 30 分後で一過性のピークを示した (Fig. 20)。通常、初代培養肝実質細胞に増殖因子を添加した場合、およそ 5 分で MAPK リン酸化活性の最大反応を得られることがわかっている。

EGF や TGF- α などの成長因子は直接受容体を刺激するため、RTK リン酸化活性は約 5 分と素早い反応になる。これに対し、SAC 誘発 p95-kDa RTK および MAPK リン酸化活性が、従来の報告と比較してタイムラグを生じたことは、SAC によって p95-kDa RTK/MAPK 経路が何らかの因子により間接的に刺激されたことによると考えられる。

SAC による肝実質細胞の MAPK リン酸化は ERK2 のみに認められた。ERK1 は主に細胞の生存・維持に関与しており、ERK2 は細胞増殖を調節していると考えられており、実際に PH 施行動物において ERK2 の活性化が報告されている^{63,64)}。

SAC による肝実質細胞の p70S6K リン酸化は、SAC 添加後、培養 30 分後で一過性のピークが認められた (Fig. 21)。SAC 添加後の p95-kDa RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化活性が最大反応を示す時間を比較すると、各タンパク質のリン酸化の順番が予想できる。少なくとも、p70S6K の上流に p95-kDa RTK 及び MAPK が存在すると考えられた。

4-4. 肝実質細胞における SAC の p95-kDa RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化活性促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構の検討

3-3-1.、3-3-2.、3-3-3. では、SAC による肝実質細胞における p95-kDa RTK、MAPK 及び p70S6K リン酸化活性に対する特異的シグナル伝達因子阻害薬 (分子標的薬) の効果を検討した。

PLC 阻害薬 (U-73122)、細胞膜透過性 Ca²⁺キレート剤 (BAPTA/AM)、L 型 Ca²⁺チャネル阻害薬 (verapamil)、分泌顆粒分泌阻害薬 (somatostatin)、RTK 阻害薬 (AG1478) は、SAC 誘発 p95-kDa RTK、ERK2 及び p70S6K リン酸化活性をコントロールレベルまで抑制させた。即ち、SAC による p95-kDa RTK、ERK2 及び p70S6K リン酸化活性には、PLC/Ca²⁺経路が深く関与しているということが明らかとなった。さらに、これらの阻害薬に加えて、PI3K 阻害薬 (LY294002)、MEK 阻害薬 (PD98059) も SAC 誘発 ERK2 及び p70S6K リン酸化活性をコントロールレベルまで抑制した。また、mTOR 阻害薬 (rapamycin) は、p70S6K リン酸化活性のみを抑制した。以上のことから、SAC は p95-kDa RTK→ERK2→p70S6K→mTOR の順にリン酸化活性を促進させたことが考えられ、SAC の肝実質細胞増殖促進作用には、少なくとも PLC/Ca²⁺経路に加えて、p95-kDa RTK/ERK2/p70S6K 経路を介していることが明らかになった。

5. 小括

第2章では、SACの肝実質細胞増殖促進作用に関する細胞内シグナル伝達経路を詳細に検討するために、特異的シグナル伝達因子阻害薬(分子標的薬)を用いて薬理的検討を行った。その結果、SACによるp95-kDa RTK、ERK2及びp70S6Kリン酸化活性は、SAC添加後それぞれ、10分、30分、30分で一過性のピークを示した。SACはERK2のみのリン酸化活性を促進し、ERK1のリン酸化活性促進作用は認められなかった。また、ERK2のリン酸化活性には、p95-kDa RTK、PI3K、MEKの関与が明らかになった。加えて、ERK2の上流にはPLC/Ca²⁺経路の存在が示唆され、その下流にはmTORやp70S6Kなどの関与が明らかになった。分泌顆粒分泌阻害薬であるsomatostatinは、SAC誘発p95-kDa RTK、ERK2及びp70S6Kリン酸化活性をコントロールレベルまで抑制したことから、何らかのオートクリン機構が働いている可能性が示唆された。

これらの結果をまとめると、Fig. 25のようなSACによる肝実質細胞増殖促進作用のシグナル伝達機構が推測された。すなわち、SACは、PLC/Ca²⁺経路を活性化させることで、何らかのオートクリン因子の分泌を促進し、そのオートクリン因子がp95-kDa RTK/ERK2/p70S6K経路を活性化し、細胞増殖を引き起こしたと考えられた (Fig. 25)。

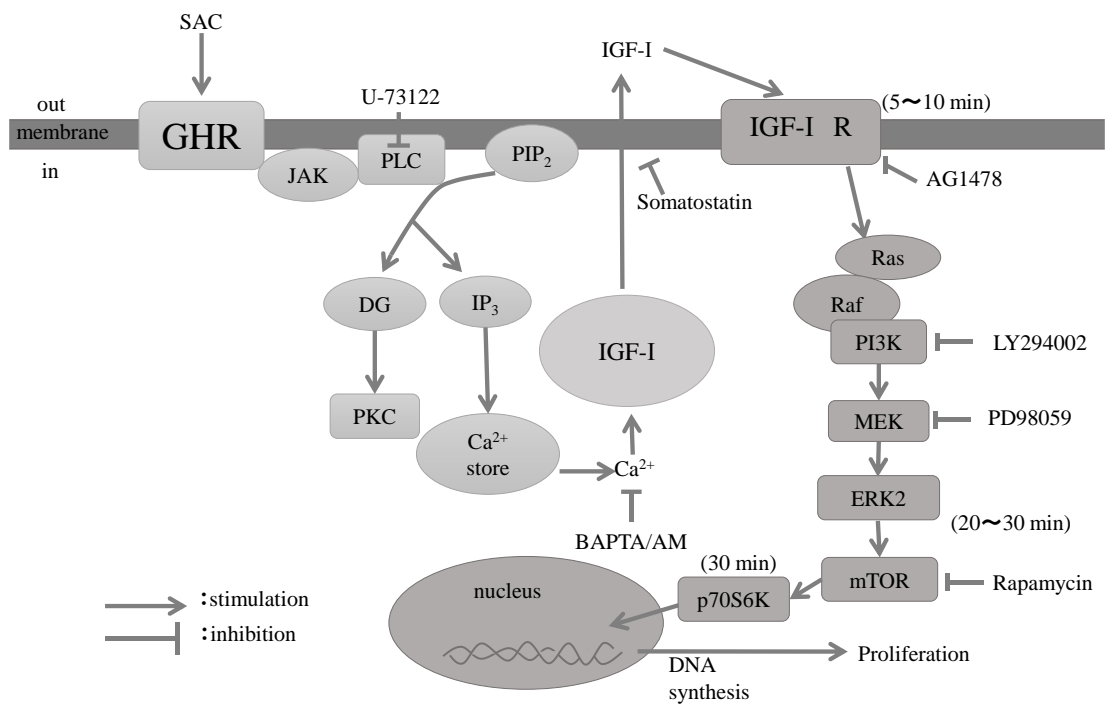


Fig. 25 SAC による初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構の推測モデル

第 3 章 SAC の肝実質細胞増殖促進作用におけるオートクリン因子分泌促進作用機構に関する検討

1. 諸言

第 1 章及び第 2 章の結果から、SAC による肝実質細胞増殖促進作用は、PLC/Ca²⁺経路および p95 kDa-RTK/ERK2/ p70S6K 経路が関与することが明らかになった。さらに、分泌顆粒からの分泌を抑制する somatostatin とその分泌の引き金となる細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を抑制する BAPTA/AM によって、SAC による p-95kDa RTK、MAPK 及び p70S6K のリン酸化活性が阻害されたことから、SAC の細胞増殖促進作用は、肝実質細胞から何らかのオートクリン因子の分泌を介していることが示唆された。

TGF- α や IGF-I は、肝実質細胞が産生・貯蔵するオートクリン因子として知られている。実際に、初代培養肝実質細胞実験系において、TGF- α (transforming growth factor- α) や IGF-I の分泌を促進する薬物が見出されている。例えば、初代培養肝実質細胞実験系において、GH が IGF-I の分泌を促進させることが確認されている⁶⁰⁾。IGF-I は、約 7.5 kDa の単鎖のポリペプチドであり、構造的にインスリンと相同性が高い⁶⁰⁾。血漿中では約 20 – 80 nM ほど存在し、IGF-I 結合タンパク質 (insulin-like growth factor binding protein : IGFBP) と結合し、血液中を循環している⁶⁷⁾。IGF-I の主な働きとして、細胞増殖促進作用やアポトーシス抑制作用などが挙げられる⁶⁸⁾。例えば、Kimura らは初代培養肝実質細胞実験系において、IGF-I が肝実質細胞増殖促進作用を示すことを報告している⁵⁹⁾。

第 1 章および第 2 章の結果から、SAC が肝実質細胞増殖促進作用を示すことが明らかとなった。肝細胞の増殖を促進するものとして、アミノ酸やホルモン、増殖因子などが挙げられる。その中でも直接、肝細胞の増殖を促進させるものの代表が EGF や TGF- α といった増殖因子である。例えば、EGF は、直接、EGF 受容体を介して、細胞増殖促進作用を発現する。EGF 受容体は、チロシンキナーゼを内蔵しており、チロシンキナーゼは細胞外で受け取

ったリガンドの情報を細胞内に伝える重要な役割を担っている。L-アスコルビン酸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ことが明らかとなっている⁶⁷⁾。また、SAC の代謝物である S-allyl-L-cysteine sulfoxide (SACS) は、epidermal growth factor receptor (EGFR) に対して高い親和性を示し、大腸がん細胞に対して、抗がん剤として有効性を示したことが確認されている⁶⁸⁾。即ち、SAC の肝実質細胞増殖促進作用も細胞膜上の何らかの受容体を介して発現していると考えられる。一方で、SAC の細胞増殖促進作用の受容体に関する報告は皆無であり、SAC 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介して、肝実質細胞増殖促進作用を示すのかは未だ不明のままである。

そこで、第3章では SAC による肝実質細胞からのオートクリン因子を特定し、その自己分泌のシグナル伝達経路と SAC 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を明らかにすることを目的とした。

2. 実験材料及び実験方法

2-1. 実験動物

第1章の「動物実験」の項目に準じた。

2-2. 肝実質細胞の単離と培養

第1章の「肝実質細胞の単離と培養」の項目に準じた。

2-3. 肝実質細胞の核数計測

第1章の「核数計測」の項目に準じた。

2-4. 増殖因子および増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体を用いた中和実験

増殖因子および増殖因子受容体に対する中和実験は、増殖因子および増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体を用いて行った。肝実質細胞を単離し、血清含有 MEM で培養し、肝細胞を接着させた後、無血清 MEM に交換し、SAC、増殖因子および増殖因子受容体に対するモノクローナル抗体を添加し、さらに培養した。一定時間培養後、2-3. に準じて肝実質細胞の核数を測定した。

2-5. 肝実質細胞内 IGF-I の蛍光免疫染色法

蛍光免疫染色法により肝実質細胞内の IGF-I を検出した。肝実質細胞を単離し、コラーゲンコートされたチャンバースライドに接着させた後、無血清 MEM に交換し、SAC およびシグナル伝達因子阻害薬を添加し、培養した。一定時間培養後、PBS で 2 回洗浄し、10 % 中性ホルマリン緩衝液中に 15 分間静置し、細胞を固定した。その後、0.1 % Triton X-100 含有 PBS により、浸透化処理を行った後、1 % BSA 含有 PBS を用い、ブロッッキングを行った。次に、抗 IGF-I マウスモノクローナル抗体 (一次抗体) を肝実質細胞内の IGF-I と反応させ、蛍光標識された抗マウス抗体 (二次抗体) を反応させることで、IGF-I を標識した。また、肝実質細胞の核をヨウ化プロピジウムにより二重蛍光標識した。蛍光顕微鏡 (Leica, DMi8) により、二次抗体による蛍光を検出した。尚、蛍光強度は、一視野中の細胞内の輝度を一視野中の細胞数で標準化した。

2-6. 培養液中における IGF-I 濃度の測定

肝実質細胞の培養液中の IGF-I 濃度は、IGF-I ELISA kit を用いて測定した。MEM には、ELISA の妨げになる成分が含まれているため、測定用培地として PBS/Ca²⁺/glucose 溶液を用いた。2-2. の方法により、肝実質細胞を単離し、MEM (+) で接着後、PBS (+) (1.0 mM CaCl₂, 5.5 mM glucose and 0.1 µg/ml aprotinin 含有) で 2 回洗浄し、交換した。この PBS (+) 中に SAC および特異的シグナル伝達因子阻害薬などを添加した。一定時間培養後、培地を 50 µL 回収し、ELISA のサンプルとした。特異的 IGF-I ポリクローナル抗体が接着しているマイクロプレートへ回収したサンプルを加え、さらにビオチン標識された IGF-I 抗体を加え、室温で 3 時間静置した。その後、ウェルを洗浄し、アビシン-ビオチン-ペルオキシダーゼを加え、室温で 1 時間静置した。次に 3, 3', 5, 5' - tetramethyl benzidine (TMB) 発色剤を加え、室温で 10 分間静置した。その後、波長 450 nm での吸光度を測定し、IGF-I を定量した。

2-7. SAC の growth hormone receptor (GHR) への結合実験

SAC の GHR に対する結合実験は、Rat Growth Hormone R ELISA Kit を用いて行った。特異的 GH 受容体ポリクローナル抗体が接着している 96 ウェルマイクロプレートへ GHR standard および SAC を添加し、一定時間静置した。ビオチン化された GHR 抗体を各ウェルに加え、室温で 1 時間静置した。その後、ウェルを洗浄し、ストレプトアビシン結合 HRP を加え、45 分間室温で静置した。次に TMB 発色剤を加え、室温で 10 分間静置し、反応停止液を加え、波長 450 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

2-8. 実験材料

第 2 章の「実験材料」の項目に準じた。

2-9. データの統計処理

第 1 章の「データの統計処理」の項目に準じた。

3. 実験結果

3-1. SAC の肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子抗体および抗増殖因子受容体抗体の効果に関する検討

これまでの結果より、SAC による肝実質細胞増殖促進作用は、何らかのオートクリン因子を介している可能性が示唆された。肝実質細胞が貯蔵する増殖に関連したオートクリン因子としては、TGF- α や IGF-I が知られている。そこで、本実験では、抗 TGF- α モノクローナル抗体 (TGF- α mAb) および抗 IGF-I モノクローナル抗体 (IGF-I mAb)、抗 TGF- α 受容体モノクローナル抗体 (TGF- α R mAb)、抗 IGF-I 受容体モノクローナル抗体 (IGF-I R mAb)、これらの他に、抗 GH モノクローナル抗体 (GH mAb)、抗 GH 受容体モノクローナル抗体 (GHRmAb)、抗 IGF-II モノクローナル抗体 (IGF-II mAb)、抗 IGF-II 受容体モノクローナル抗体 (IGF-II R mAb)、抗 EGF 受容体モノクローナル抗体 (EGFR mAb) 及び抗 hepatocyte growth factor (HGF) 受容体モノクローナル抗体 (HGFR mAb) を用いて、SAC の肝実質細胞増殖促進作用への影響を検討した。

Fig. 25 には、SAC と抗増殖因子抗体および抗増殖因子受容体抗体を併用した時の核数の変化を示した。SAC (10^{-6} M) による肝実質細胞増殖促進作用は、GHR mAb (100 ng/ml)、IGF-I R mAb (100 ng/ml) および IGF-I mAb (100 ng/ml) によって、それぞれ完全に抑制された。一方で、IGF-IIR mAb (100 ng/ml)、EGFR mAb (100 ng/ml)、TGF- α R mAb (100 ng/ml)、HGFR mAb (100 ng/ml)、IGF-II mAb (100 ng/ml)、TGF- α mAb (100 ng/ml)、GH mAb (100 ng/ml) は、全て SAC による肝実質細胞増殖促進作用に対して影響を与えなかった (Fig. 25)。

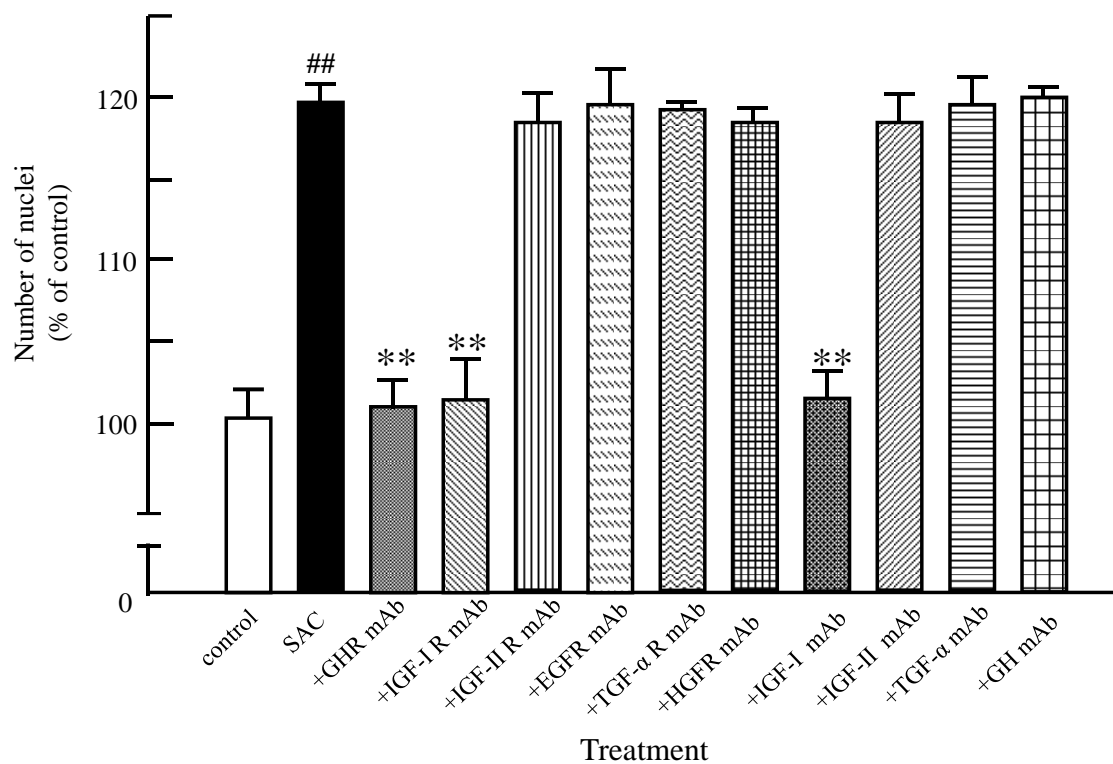


Fig. 25 SAC の肝実質細胞増殖促進作用に対する抗増殖因子抗体および抗増殖因子受容体抗体の効果

細胞密度 : 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間 : 5 時間

薬物処理 : SAC (10^{-6} M), GHR mAb (100 ng/ml), IGF-I R mAb (100 ng/ml), IGF-IIR mAb (100 ng/ml), EGFR mAb (100 ng/ml), TGF- α R mAb (100 ng/ml), HGFR mAb (100 ng/ml), IGF-I mAb (100 ng/ml), IGF-II mAb (100 ng/ml), TGF- α mAb (100 ng/ml), GH mAb (100 ng/ml)

データ : 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

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

SAC 添加群に対する有意差 : (*P<0.05, **P<0.01)

3-2. 初代培養肝実質細胞における SAC の IGF-I の分泌促進作用に関する検討

3-1 の結果より、SAC の肝実質細胞増殖促進作用は IGF-I の分泌を介していると考えられた。そこで、この仮説を検証するため、本実験では、肝実質細胞内の IGF-I を蛍光標識することで、SAC の刺激によって、実際に細胞外へ分泌されるのかを確認した。その結果を Fig. 26 および Fig. 27 に示した。Fig. 26 に示した顕微鏡像では、IGF-I を緑色で標識し、核を赤色で表している。SAC による刺激がない場合、ほぼ全ての細胞で IGF-I の細胞内における存在が確認できた (0 min : Fig. 25A)。SAC (10^{-6} M) 刺激後は、刺激時間に依存して、肝実質細胞内の IGF-I の減少が認められ、刺激 20 分後以降では、ほとんどの細胞で IGF-I の枯渇を確認できた (10 min, 20 min : Fig. 25 C, D)。

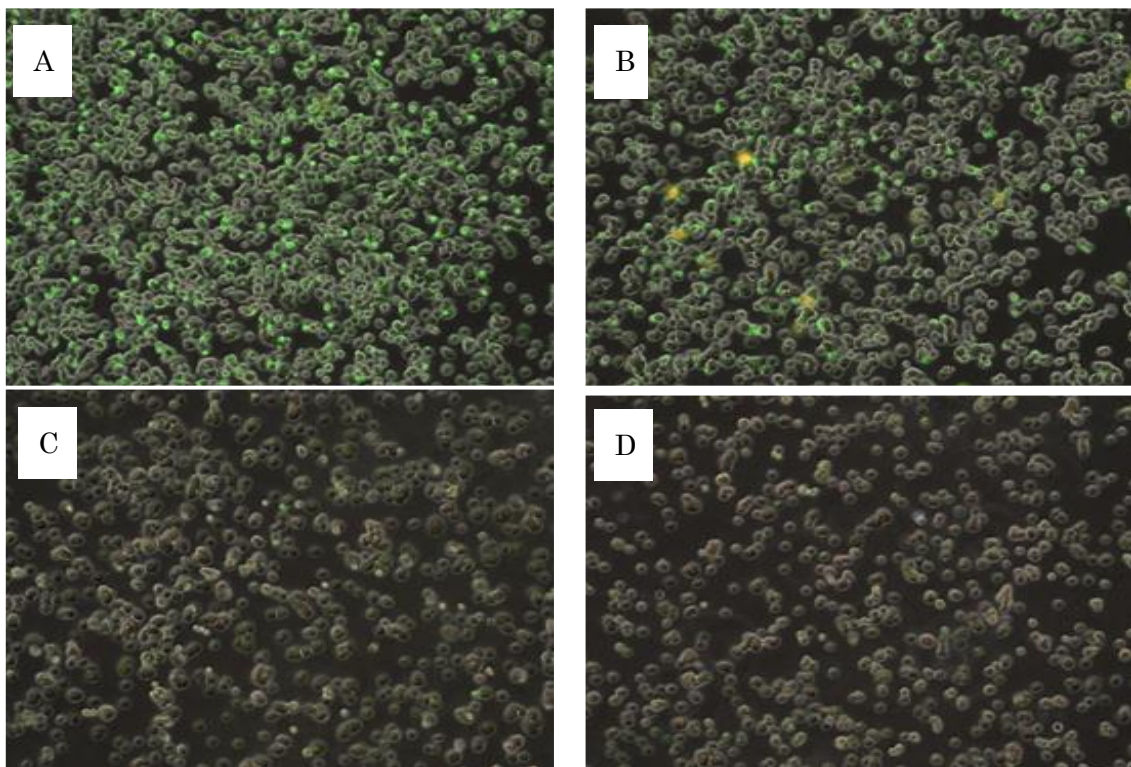


Fig. 26 SAC による肝実質細胞内 IGF-I の自己分泌促進作用

細胞密度 : 5.0×10^4 cells/cm² 培養時間 : A, 0 min, B, 10 min, C, 20 min, D, 30 min
薬物処理 : SAC (10^{-6} M) 倍率 : 100 倍

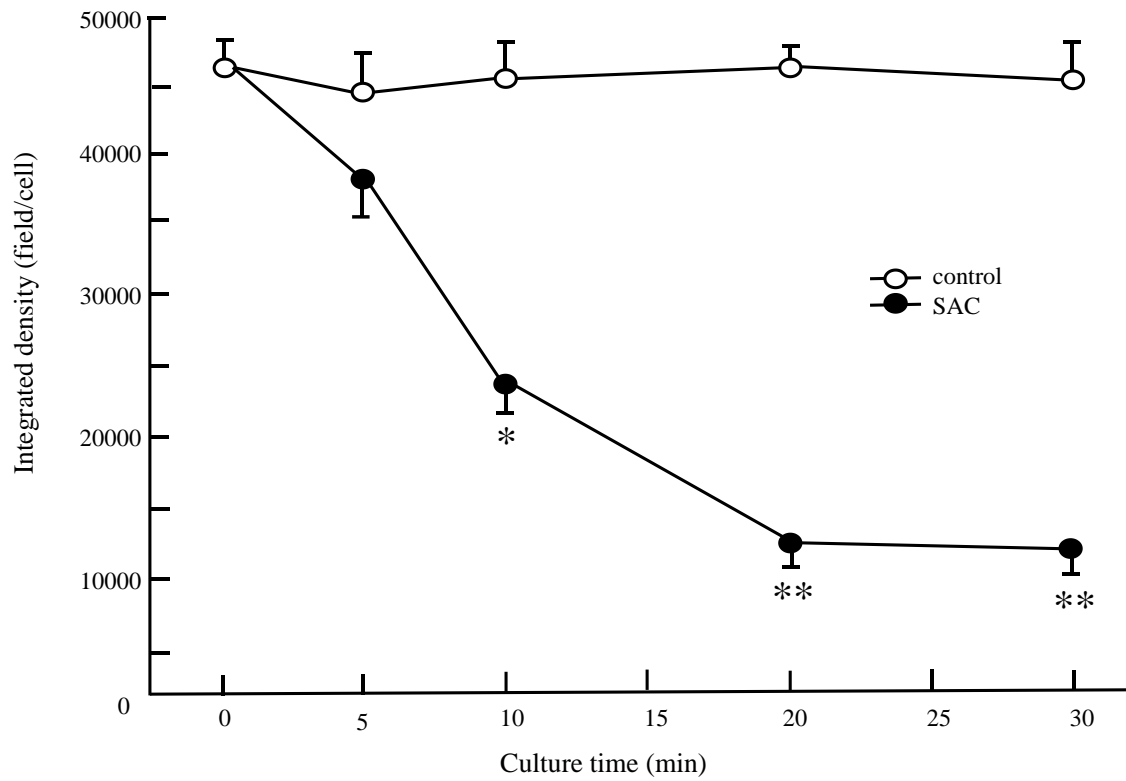


Fig. 27 SACによる肝実質細胞内 IGF-Iの自己分泌促進作用の経時的変化

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

培養時間：5 時間

薬物処理：SAC (10^{-6} M)

データ：平均値 ± S.E.M. (n=3)

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

3-3. 初代培養肝実質細胞における SAC による IGF-I の自己分泌促進作用に関する検討

3-1 の結果より、SAC の肝実質細胞増殖促進作用は IGF-I の分泌を介していると考えられた。そこで、本実験では、培養液中の IGF-I の濃度を ELISA 法により測定した。

Fig. 26 には、SAC (10^{-6} M) 添加後、0-30 分培養したときの培養液中に分泌される IGF-I 濃度の経時的変化を示した。SAC (10^{-6} M) 添加後 10 分後には、IGF-I 濃度の増加がみられ、20 分後には IGF-I 濃度が約 400 pg/ml と最大となった (Fig. 28)。

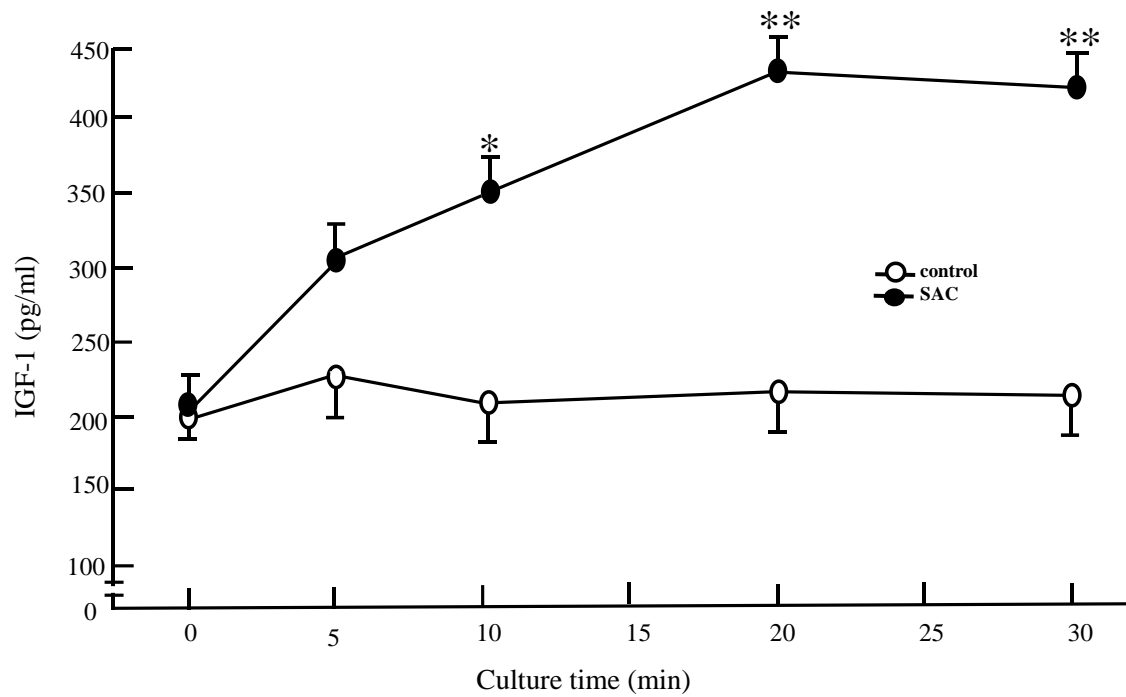


Fig. 28 SACによる肝実質細胞のIGF-Iの培養液中への分泌促進作用の経時的変化

細胞密度： 5.0×10^4 cells/cm²

薬物処理：SAC (10^{-6} M)

データ：平均値 ± S.E.M. (n=3)

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

3-4. 初代培養肝実質細胞における SAC の IGF-I 分泌促進作用に関する細胞内シグナル伝達機構の検討

Fig. 29 には、SAC と特異的シグナル伝達因子阻害薬 (分子標的薬) を併用した時の培養液中への IGF-I の分泌量を示した。SAC (10^{-6} M) による IGF-I 分泌促進作用は、PLC 阻害薬である U-73122 (10^{-6} M)、細胞膜透過性 Ca^{2+} キレート剤である BAPTA/AM (10^{-7} M)、L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬である verapamil (10^{-6} M)、分泌顆粒分泌阻害薬である somatostatin (10^{-7} M)、及び JAK2 阻害薬である TG101209 (10^{-6} M) によって、それぞれ control レベルまで抑制された。一方、AC 阻害薬である 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M)、PKA 阻害薬である H-89 (10^{-6} M)、PKC 阻害薬である GF109203X (10^{-6} M)、RTK 阻害薬である AG1478 (10^{-6} M)、PI3K 阻害薬である LY294002 (3×10^{-7} M)、MEK 阻害薬である PD98059 (10^{-6} M) 並びに mTOR 阻害薬である rapamycin (10 ng/ml) は、それぞれ SAC による IGF-I 分泌促進作用に対して影響を与えなかった (Fig. 29)。

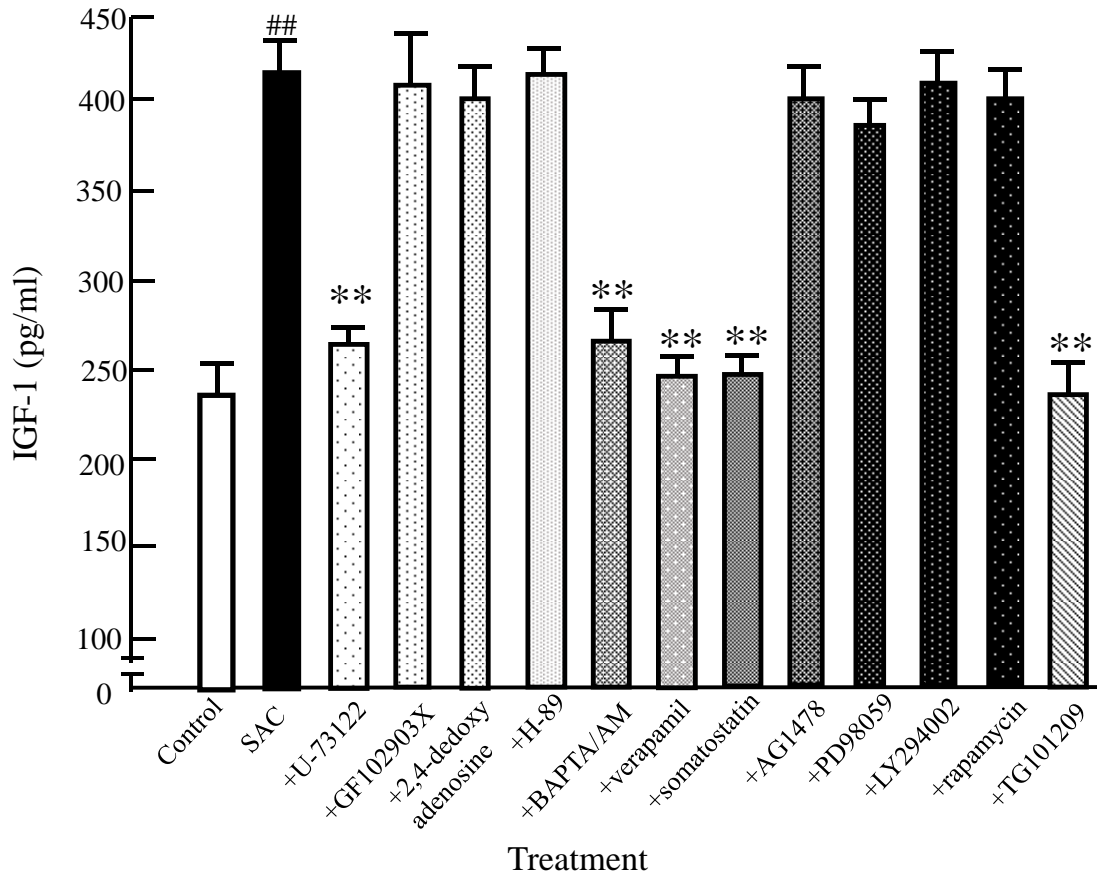


Fig. 29 初代培養肝实质細胞における SAC の IGF-I 分泌促進作用に対する特異的シグ

細胞密度 : 5.0×10^4 cells/cm² 培養時間 : 20 分

薬物処理 : SAC (10^{-6} M), U-73122 (10^{-6} M), H-89 (10^{-6} M), GF109203X (10^{-6} M),
 2,4-dideoxyadenosine (10^{-6} M), BAPTA/AM (10^{-7} M), verapamil (10^{-6} M),
 somatostatin (10^{-7} M), AG1478 (10^{-6} M), LY294002 (3×10^{-7} M),
 PD98059 (10^{-6} M), rapamycin (10 ng/ml), TG101209 (10^{-7} M)

データ : 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

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

SAC 添加群に対する有意差 (*P<0.05, **P<0.01)

3-5. SAC 及びその他の含硫アミノ酸の GH 受容体に対する結合性の検討

これまでの検討結果より、SAC は GH 受容体に結合するのではないかと考えられた。そこで、本実験では GHR ELISA kit を用いて、抗 GHR 抗体存在下で SAC と GHR standard を GH 受容体に対して競合させることで、SAC の GH 受容体に対する結合性を検討した。

Fig. 30 に示したように、SAC の GH 受容体に対する結合性は、その用量に依存して増加した。一方で、その他の含硫アミノ酸である SMC および Alliin は、GH 受容体に対して結合性を示さなかった (Fig. 29)。

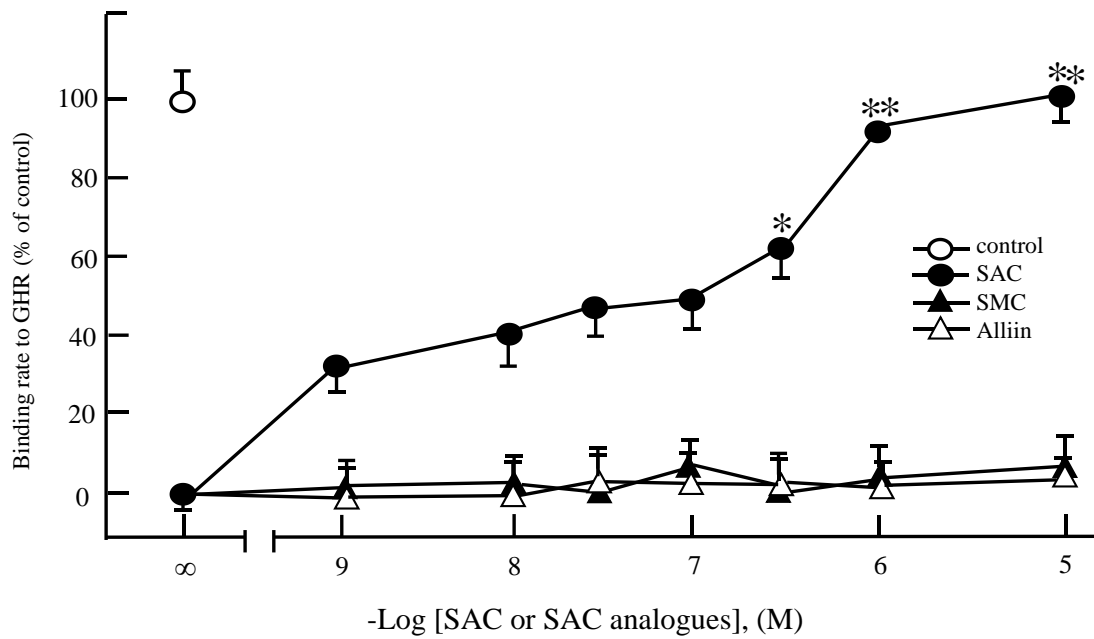


Fig. 30 SAC とその他含硫アミノ酸の GH 受容体に対する結合性

薬物処理 : SAC (10^{-9} - 10^{-5} M), SMC (10^{-9} - 10^{-5} M), Alliin (10^{-9} - 10^{-5} M)

データ : 平均値 \pm S.E.M. (n=3)

有意差 : control (GH 1.234 ng/ml) に対する有意差(*P<0.05, **P<0.01)

4. 考察

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

これまでの結果から、SAC による肝実質細胞増殖促進作用は何らかの増殖因子の自己分泌を誘発したことに起因するという仮説を立てた。オートクリン因子としての候補を TGF- α と IGF-I とし、SAC によるオートクリン因子の分泌に対する抗 TGF- α モノクローナル抗体及び抗 IGF-I モノクローナル抗体の効果を検討した。

Fig. 25 の結果より、SAC (10^{-6} M) による肝実質細胞増殖促進作用は、GH 受容体、IGF-I の分泌およびその受容体を介している可能性が考えられた。実際に、GH が GH 受容体を活性化すると、PLC- γ の活性化を介して細胞内の DG と IP₃ 量が増加し、それが引き金となり、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が起こり、IGF-I が分泌される⁶⁰⁾。細胞からのエキソサイトーシス機構にカルシウム依存性エキソサイトーシスがある。同様のメカニズムとして、例えば、膵臓の β 細胞からのインスリン分泌や神経細胞からの神経伝達物質の分泌は、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が関与することが明らかになっている^{69,70)}。

次に SAC の肝実質細胞に対する IGF-I 分泌促進作用の経時的変化を検討した。蛍光免疫染色法を用いて、細胞内の IGF-I を染色し、その局在を確認した。そして、SAC の肝実質細胞に対する IGF-I 分泌促進作用の経時的変化を検討したところ、SAC 添加 20 分後には control と比較して、多くの細胞で IGF-I の枯渇が確認できた (Fig. 26, 27)。さらに、ELISA 法による培養液中の IGF-I の分泌を測定する実験では、SAC 添加 20 分後で培養液中への IGF-I 分泌量が最大となった (Fig. 28)。このように IGF-I 分泌促進作用に関して、IGF-I が枯渇する時間と分泌量が最大となる時間が逆相関する結果が得られた。また、SAC による肝実質細胞からの IGF-I の分泌が、PLC 阻害薬である U-73122 や分泌顆粒分泌阻害薬である somatostatin との併用により、それぞれ control レベルまで抑制されたことは、SAC によ

り肝実質細胞からの IGF-I の自己分泌が惹起されたことの裏付けになった。

4-2. SAC の肝実質細胞に対する IGF-I 分泌促進作用のシグナル伝達機構の検討

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

Fig. 25 および Fig.29 の結果で示す通り、SAC による肝実質細胞に対する IGF-I 分泌促進作用は、GHR mAb、IGF-IR mAb、IGF-I mAb、U-73122 (PLC 阻害薬)、BAPTA/AM (細胞内 Ca^{2+} キレート剤)、verapamil (L 型 Ca^{2+} チャンネル阻害薬) および somatostatin (分泌顆粒分泌阻害薬)によって完全に抑制された。一方、GF102903X (PKC 阻害薬)、2,4-dideoxyadenosine (AC 阻害薬)、H-89 (PKA 阻害薬)、AG1478 (RTK 阻害薬)、PD98059 (MEK 阻害薬)、LY294002 (PI3K 阻害薬) および rapamycin (mTOR 阻害薬) は、SAC による IGF-I 分泌促進作用を抑制しなかった。即ち、肝実質細胞に貯蔵されていた IGF-I は、SAC の刺激によって上昇する細胞内 Ca^{2+} を引き金として、分泌されたと考えられる。実際に、GH が肝実質細胞からの IGF-I の分泌を、SAC の場合と同様の経時変化により促進するということが報告されている⁶⁰⁾。

Fig. 25 の結果から、SAC は GH 受容体に結合する可能性が示唆された。そこで、更なる検討を行うために GHR ELISA kit を用いて、GHR 存在下で SAC が GH 受容体に対して、どの程度、結合するのかを置換実験にて検証した。

Fig. 30 の結果に示すように、SAC は濃度依存的に GH 受容体に結合することが明らかとなった。SAC の 3×10^{-7} M 付近から GH 受容体に結合する割合が増加し、 10^{-5} M では、完全に SAC が GH 受容体に結合する結果となった。即ち、SAC の肝実質細胞増殖促進作用は、GH 受容体を介していることが明らかになった。

5. 小括

第3章では、肝実質細胞における SAC の IGF-I 分泌促進作用機構を検討した。その結果をまとめると下記のようにになると考えられる。

- (1) 肝実質細胞に対して SAC を添加すると IGF-I が分泌され、その分泌活性は、20 分で最大となる。そして、この時の培養液中の IGF-I 濃度は、約 400 pg/ml である。
- (2) SAC による IGF-I 分泌促進作用には GH 受容体/PLC/Ca²⁺経路が関与しており、肝実質細胞からの IGF-I の分泌は Ca²⁺濃度の上昇に起因する。

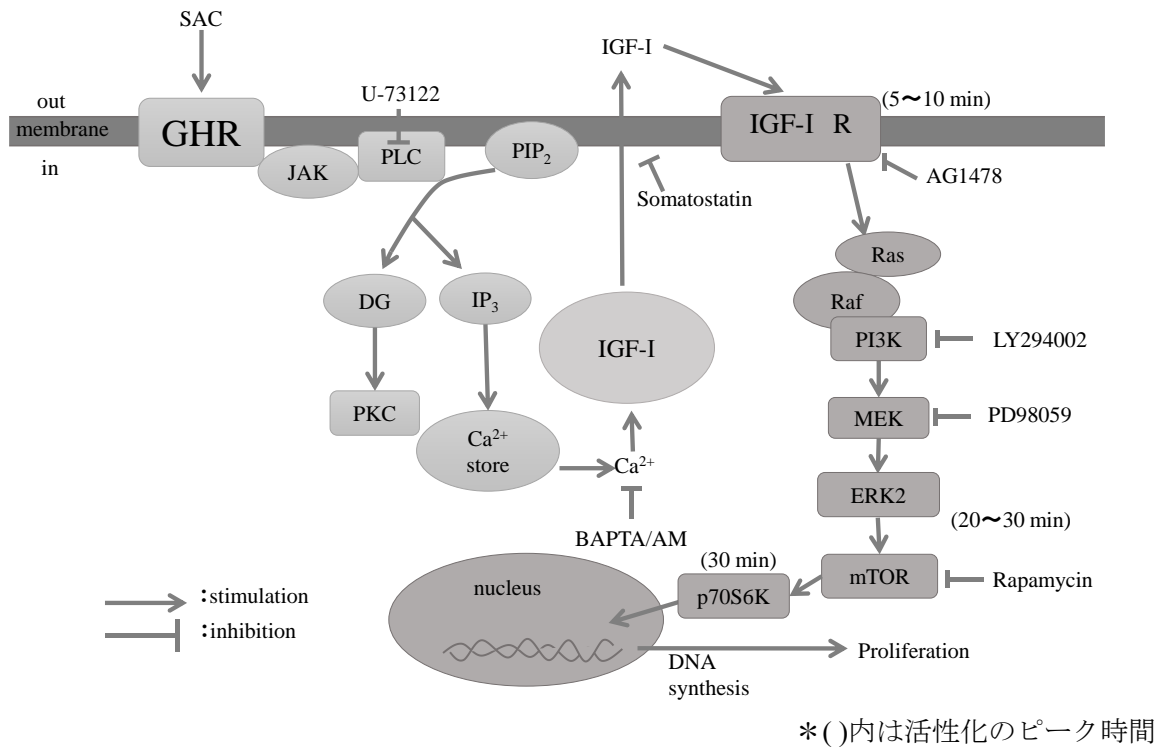


Fig. 31 SAC による初代培養肝実質細胞増殖促進機構モデル

第3篇 結論

本研究では SAC の肝実質細胞増殖促進作用とその詳細な作用機構を検討してきた。得られた結果を総合的に解釈すると、SAC の肝実質細胞増殖促進作用機構は下記の模式図のようになると考えられる (Fig. 32)。SAC は、肝実質細胞膜上に発現している GH 受容体に直接結合して、これを刺激することにより、PLC が活性化される。活性化された PLC が、PIP₂ から DG と IP₃ を生成し、その IP₃ が細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる。そして、この細胞内 Ca²⁺濃度の上昇に伴い、肝実質細胞内に貯蔵されていた IGF-I が自己分泌される。分泌された IGF-I は、IGF-I 受容体に結合し、IGF-I-RTK を活性し、その増殖シグナルが PI3K→ERK2→mTOR→p70S6K と伝達され、核内へ移行し、肝実質細胞増殖へと至ると考えられる。

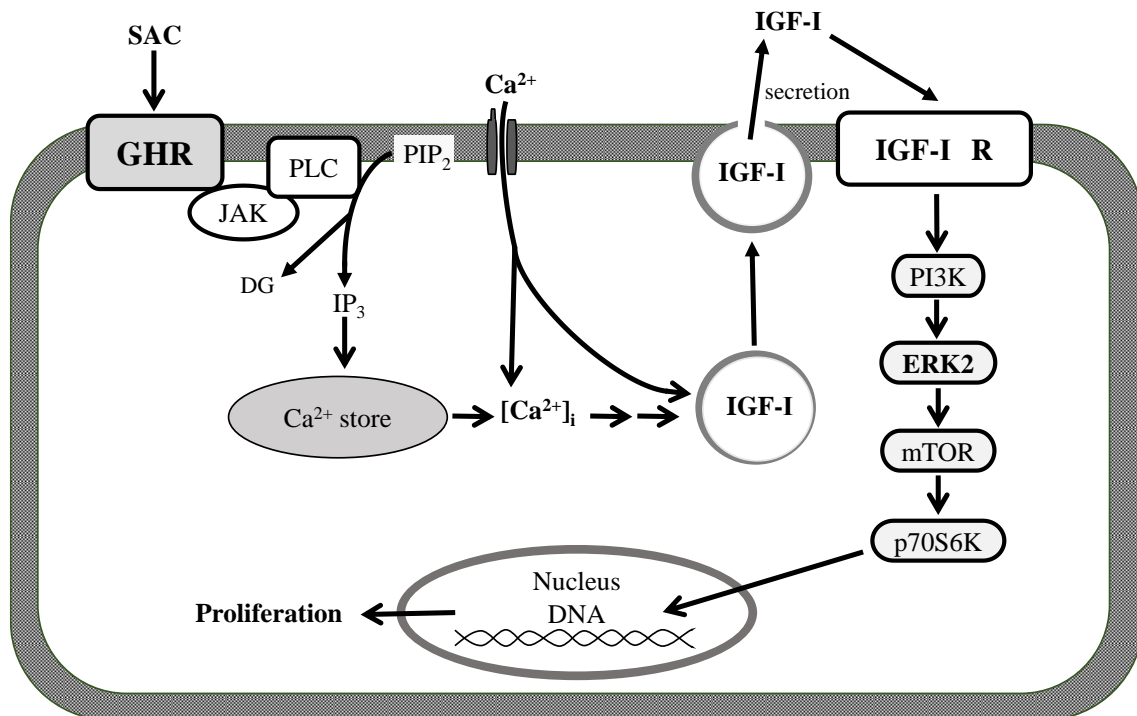


Fig. 32 SACの成熟ラット初代培養肝実質細胞増殖促進作用機構のモデル

SAC に関しては、現在でも様々な研究が行われており、その薬理作用は多岐にわたることが明らかになってきている。SAC の主な薬理作用は抗酸化作用であるが、近年、細胞増殖促進作用も報告されており¹⁸⁾、その新たな薬理作用に注目が集まっている。一方で、SAC の細胞増殖促進作用は、どの受容体に結合し、どういった細胞内シグナル伝達経路を介しているのかを明らかにした報告はなかった。本研究では、初代培養肝実質細胞における SAC の細胞増殖促進作用に注目し、その詳細な作用メカニズムを検討してきた。その結果、SAC が GH 受容体に結合し、肝実質細胞内に蓄えられている増殖因子でもあり、オートクリン因子でもある IGF-I の自己分泌を促進するという新たな知見を得ることが出来た。また、SAC は比較的低用量で初代培養肝実質細胞の増殖を促進することを見出した。本研究を通して、SAC による肝実質細胞に対する増殖促進作用やそのメカニズムを詳しく検討したことにより、肝再生現象に関わる因子やタンパク質などの作用メカニズムの一端を解明することが出来た。即ち、IGF-I は、GH 受容体の刺激により肝実質細胞内からの自己分泌されることや、元来、肝実質細胞内に蓄えられていることから肝再生にとって非常に重要な増殖因子であることは明らかである。本研究の目的でもある肝再生のメカニズムの解明という点でも、これらの研究結果が役立つと考えられる。

最後に、本研究で得られた知見の臨床的意義と社会的意義を考察する。本研究から得られた基礎的データは、癌化および臓器形成の仕組みの解明や肝障害に対する新しい治療薬の開発など様々な分野への応用が期待できる。例えば、肝炎等に対する肝庇護薬や生体肝移植手術後のドナーおよびレシピエントの肝機能を早期に回復させる新しい治療薬（いわゆる肝再生促進薬）の開発や切除肝の保存や運搬などに用いる保存液など臨床分野への応用が期待できる。特に、肝再生促進薬の開発は急務であると考えられる。現在、肝疾患の終末像として挙げられる肝硬変や肝がんに対しては、外科手術による生体肝移植がその適応であり、生体肝移植の件数は、年々増加している¹⁹⁾。しかし、ドナーの不足から生体肝移植を望む患者一人一人に移植を行うことは難しいのが現状である。また、生体肝移植後、ドナーお

よびレシピエントの肝機能が正常化し、社会復帰できるようになるまでに 2-3 か月を要し、その期間、術後の痛みや肝機能低下による倦怠感、食欲不振、吐き気などが現れる⁹⁾。つまり、ドナーおよびレシピエントの QOL の低下が起こり、これらは、生体肝移植の問題点の一つである。そこで、ドナーおよびレシピエント双方の早期回復のために肝再生促進薬の開発が求められている。昨今、増殖因子の臨床応用は進みつつあるが、いくつか問題点がある。その一つとして、増殖因子の副作用が挙げられる。増殖因子は、様々な細胞に作用する可能性があり、予期せぬ副作用が発現する可能性がある。また、増殖因子であるため、癌化のリスクの増大があると考えられる。一方で、SAC のような水溶性アミノ酸は、体内に蓄積しにくいため、副作用も少なく安全であると考えられる。さらに、SAC は熟成ニンニクに多く含有されている低分子アミノ酸であることから、増殖因子と比較すると安価であり、経済的負担を軽減することが可能である。これによって、医療費削減に貢献することが出来る。以上より、SAC は安心して安全な肝細胞増殖促進薬として臨床応用することが期待できる。本研究の成果がそれらの一助として役立つことを期待したい。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科臨床薬理学講座教授 木村 光利 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に際して、終始指導並びに多大なる御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科製剤学講座 教授 夏目 秀視 先生、城西大学大学院薬学研究科病院薬剤学講座教授 上田 秀雄 先生、城西大学大学院薬学研究科臨床栄養学講座教授 小林 順 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に関して、終始親切なる御指導、御協力を賜りました城西大学教授 荻原 政彦 先生及び城西大学大学院薬学研究科臨床薬理学講座助教 茂木 肇 先生に深く感謝の意を表します。

本論文の作成、学位論文審査にあたり、御教示と御校覧を頂きました城西大学大学院薬学研究科薬物治療学講座教授 宮本 嘉明 先生、城西大学大学院薬学研究科予防栄養学講座教授 内田 博之 先生、城西大学大学院薬学研究科薬品作用学講座教授 岡崎 真理 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に関して有益なる御指導、御助言を賜りました城西大学大学院薬学研究科栄養治療学講座教授 井上 裕 先生に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御支援、御協力を頂きました城西国際大学薬学部臨床薬理学研究室諸氏に心より感謝いたします。

また、本研究のために尊い命を頂きました動物たちに深く感謝し、追悼の意を表します。

最後に、私の長きにわたる学生生活を温かく見守り、励ましてくださいました家族に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 日本肝移植研究会、2016. 肝移植症例登録報告、移植、**51**.145-159.
- 2) 日本移植研究会、ドナー調査委員会、2005. 生体肝移植ドナーに関する調査報告書<概要版>
- 3) Higgins, G. M., Anderson, R. M., 1931. Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol.*, **12**,186-202.
- 4) Fausto, N., Campbell, J. S., Riehle1, K. J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology*, **43**, S45-S53.
- 5) Michalopoulos, G. K., DeFrance, M. C., 1997. Liver regeneration. *Science*, **276**, 60-66.
- 6) Stain, A.J., Ismail, T., Tsubouchi, H., Arakaki, N., Hishida, T., 1991. Native and Recombinant Human Hepatocyte Growth Factors are Highly Potent Promoters of DNA Synthesis in both Human and Rat Hepatocytes. *J. Clin. Invest.*, **87**, 1853-1857.
- 7) Ishiki, Y., Ohnishi, H., Muto, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., 1992. *Hepatology*, **16**, 1227-1235.
- 8) Böhm, F., Köhler, U. A., Speicher, T., Werner, S., 2010. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol. Med.*, **2**, 294–305.
- 9) Alisi, A. Demori, I., Spagnuolo, S., Pierantozzi, E., Fugassa E., Leoni, S., 2005. Thyroid status affects rat liver regeneration after partial hepatectomy by regulating cell cycle and apoptosis proteins. *Cell. Physiol. Biochem.*, **15**, 69–76.
- 10) Alvarado, T. F., Puliga, E., Preziosi, M., Poddar, M., Singh, S., Columbano, A., Nejak-Bowen, K., Monga, S. P. S., 2016. Thyroid hormone receptor β agonist induces β -catenin-dependent hepatocyte proliferation in mice: implications in hepatic regeneration. *Gene Expr.*, **17**, 19–34.
- 11) Kimura, M., Ogihara, M., 1999. Stimulation by transforming growth factor- α of DNA synthesis and proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures: modulation by α -

- and β -adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 171–180.
- 12) 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
 - 13) Kimura, M., Ogihara, M., 2005. Effects of branched-chain amino acid on DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **510**, 167-180.
 - 14) 荒木崇, 小宮佐和子, 山内眞義、2003. 慈恵医大誌 **118**, 91-99.
 - 15) 脇茂, 猪又元子, 杉本清美, 川畑信夫, 梶山静優. 1986, 薬理と治療, **14**, 4707-4715.
 - 16) Morihara, N., Nishihama, T., Ushijima, M., Ide, N., Takeda, H., Hayama, M., 2007. Garlic as an anti-fatigue agent. *Mol. Nutr. Food Res.* **51**, 1329–1334.
 - 17) Kodai, S., Takemura, S., Minamiyama, Y., Hai, S., Yamamoto, S., Kubo, S., Yoshida, Y., Niki, E., Okada, S., Hirohashi, K., Suehiro, 2007. S-, S-allyl cysteine prevents CCl(4)-induced acute liver injury in rats. *Free Radic Res.* **41**, 489-497.
 - 18) Hatono, S., Jimenez, A., Wargovich, M.J., 1996. Chemopreventive effect of S-allylcysteine and its relationship to the detoxification enzyme glutathione S-transferase. *Carcinogenesis.* **17**, 1041-1044.
 - 19) Velmurugan, B., Bhuvaneswari, V., Nagini, S., 2003. Effect of S-allylcysteine on oxidant-antioxidant status during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and saturated sodium chloride-induced gastric carcinogenesis in Wistar rats. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* **12**, 488-494.
 - 20) Nam, S. M., Yoo, D. Y., Kim, W., Yoo, M., Kim, D. W., Won, M. H., Hwang, I. K., Yoon, Y. S., 2011. Effects of S-allyl-L-cysteine on cell proliferation and neuroblast differentiation in the mouse dentate gyrus. *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 1071-1075.
 - 21) Colin-Gonzalez, A.L., Santana, R.A., Silva-Islas, C.A., Chanez-Cardenas, M.E., Santamaria, A., Maldonado P.D., 2012. The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract-

- and S-allylcysteine-induced protection. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **90**, 7162.
- 22) Amano, H., Kazamori, D., Itoh, K., 2016. Pharmacokinetics of S-Allyl-L-cysteine in rats is characterized by high oral absorption and extensive renal reabsorption. *J. nutr.*, **146**, 4546-459.
- 23) Krause, R.J., Glocke, S.C., Elfarra, AA., 2002. Sulfoxides as urinary metabolites of S-allyl-L-cysteine in rats: evidence for the involvement of flavin-containing monooxygenases. *Drug Metab. Dispos.* **30**,1137-42.
- 24) Hsu, C.C., Lin, C.C., Liao, T.S., Yin, M.C., 2006. Protective effect of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. **44**, 393-397.
- 25) Shin, C.C., Philip, K., Moore., Yi., Zhun. Zhu., 2007. S-allylcysteine mediates cardio protection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, 2693-2701.
- 26) Liu, Z., Li, M., Chen, K., Yang, J., Chen, R., Wang, T., Liu, J., Yang, W., Ye, Z., 2012. S-allyl-cysteine induces cell cycle arrest and apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cells. *Mol. Med. Rep.*, **5**, 439-443.
- 27) Feng-Yao, Tang., En-Pei, Isabel, ChiangJing-Gung, Chung., Hong-Zin, Lee., Chia-Yun, Hsu., 2009. S-Allylcysteine modulates the expression of E-cadherin and inhibits the malignant progression of human oral cancer. *Journal of biochemistry.*, **20**, 1013-1030.
- 28) Padiya, R., Beree, S.K., 2013. Garlic as an anti-diabetic agent: recent progress and patent reviews. *Recent. Pat. Food Nutr. Garlic*, **5**,105-127.
- 29) Syu, J., Tang, M.D., Tsai, S. Y., Chiang, E.I., Chiu, S.C., Chao, C.Y., Rodriguez, R.L., Tang, F.Y., 2017. S-allylcysteine improves blood flow recovery and prevents ischemic injury by augmenting neovasculogenesis. *Cell Transplant.*, **26**, 636-1647.
- 30) Zeinali, H., Baluchnejadmojarad, T., Fallah, S., Sedighi, M., Moradi, N., Roghani, M., 2018. S-

- allyl cysteine improves clinical and neuropathological features of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Biomed. Pharmacother.*, **97**, 557-563.
- 31) Brahmanaidu, P., Uddandrao, V.V.S., Sasikumar, V., Naik, R.R., Pathoni, S., Begum, M.S., Rajeshkumar, M.P., Varatharaju, C., Meriga, B., Rameshreddy, P., Kalaivani, A., Saravanan, G., 2017. Reversal of endothelial dysfunction in aorta of streptozotocin-nicotinamide-induced type-2 diabetic rats by S-allylcysteine. *Mol. Cell. Biochem.*, **432**, 25-32.
- 32) Kimura, M., Moteki, H., Uchida M., Natsume, H., Ogihara, M., 2008. L-Ascorbic acid- and L-ascorbic acid-2-glucoside accelerate *in vivo* liver regeneration and rapidly lowers serum transaminase activities in 70 % partially hepatectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **579**,357-364.
- 33) Kimura, M., Wtanabe, M., Ishibashi, N., Yanagida, S., Ogihara, M., 2010. Acyclic retinoid NIK-333 accelerates liver regeneration lowers serum transaminase activities in 70 % partially hepatectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **63**, 267-273.
- 34) Sathibabu, Uddandrao, V.V., Brahmanaidu, P., Saravanan, G., 2017. Therapeutical perspectives of S-allylcysteine: effect on diabetes and other disorders in animal models. *Cardiovasc Hematol Agents. Med. Chem.*, **15**, 1571–77.
- 35) Okamoto, H., Kimura, M., Watanabe, N., Ogihara, M., 2009. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-2-mediated DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes: The involvement of endogenous transforming growth factor- α . *Eur. J. Pharmacol.*, **604**, 12-19.
- 36) Kimura, M., Moro, T., Moteki, H., Maruyama, H., Sekine, M., Okamoto, H., Inoue, H., Sato, T., Ogihara, M., 2008. *In vivo* glycyrrhizin accelerates liver regeneration and rapidly lower serum transaminase activities in 70 % partially hepatectomized rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **579**, 357-364.
- 37) Wang, W., Luo, M., Fu, Y., Wang, S., Efferth, T., Zu, Y., 2013. Glycyrrhizic acid nanoparticles inhibit LPS-induced inflammatory mediators in 264.7 mouse macrophages compared with

- unprocessed glycyrrhizic acid. *Int. J. Nanomedicine*, **8**, 1377-1383.
- 38) Choi, Y.J., Kim, N., Lee, J.Y., Nam, R.H., Chang, H., Seo, J.H., Kang K.K., Kim, H.J., Choi, Y. J., Lee, H.S., Lee, D.H., 2014. Protective Effects of Garlic Extract, PMK-S005, Against Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs–Induced Acute Gastric Damage in Rats. *Dig. Dis. Sci.*, **56**, 2927-2934.
- 39) Kurmasheva, R.T., Houghton, P.J., 2006. IGF-1 mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochem. Biophys. Acta.*, **1766**, 1-22.
- 40) Dehkhoda, F., Lee, C.M.M., Medina, J., Brooks, A.J., 2018. The growth hormone receptor: mechanism of receptor activation, cell signaling, and physiological aspects. *Front. Endocrinol.*, **9**, 35.
- 41) Lang, C.H., Hong-Brown, L., Frost, R.A., 2005. Cytokine inhibition of JAK-STAT signaling: a new mechanism of growth hormone resistance. *Pediatr. Nephrol.*, **20**, 306-312.
- 42) Maldonado, P.D., Alvarez, A., Lirarocho, A., Jung-Cook, H., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Galano, A., 2011. Role of allyl group in the hydroxy and proxyl radical scavenging activity of S-allylcysteine. *J. Phys. Chem. B.*, **115**, 13408-13417.
- 43) Colin-Gonzalez, A.L., Santana, R.A., Silva-Islas, C.A., Chanez-Cardenas, M.E., Santamaria, A., Maldonado, P.D., 2012. The antioxidant mechanism underlying the aged garlic extract- and S-allylcysteine-induced protection. *Cxid. Med. Cell. Longv.*, **2012**, 907162.
- 44) Liu, P. Behray, M., Wang, Q., Zhou, Z., Chao, Y., Bao, Y., 2018. Anti-cancer activities of allyl isothiocyanate and its conjugated silicon quantum dots. *Sci. Rep.*, **8**, 1084.
- 45) Zhao, H-J., Li, M-J., Zhang, m-p., Wei, M-K., Shen, L-P., Jiang, M., Zeng, T., 2019. Allyl methyl trisulfide protected against acetaminophen (paracetamol) – induced hepatotoxicity by suppressing CYP2E1 and activating Nrf2 in mouse liver. *Food, Funct.*, **10**, 2244-2253.
- 46) Scaltriti, M., Baselga, J., 2006. The epidermal growth factor receptor pathway : a model for

- targeted therapy the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 5268–5272.
- 47) Fu, S., Yin, L., Lin, X., Lu, J., Wang, X., 2018. Effects of Cyclic Mechanical Stretch on the Proliferation of L6 Myoblasts and Its Mechanisms: PI3K/Akt and MAPK Signal Pathways Regulated by IGF-1 Receptor. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1649.
- 48) Balasubramanian, S., Paulose, C. S., 1998. Induction of DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes by serotonin: possible involvement of serotonin S₂ receptor. *Hepatology*, **27**, 62-66.
- 49) Braun, L., Mead, J. E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G. I., Fausto, N., 1988. Transforming growth factor β mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 1539–1543.
- 50) Kimura, M., Ogihara, M., 1997. Density-dependent proliferation of adult rat hepatocytes in primary culture by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents. *Eur. J. Pharmacol.*, **324**, 267–276.
- 51) Nakamura, T., Tomita, Y., Ichihara, A., 1983. Density-dependent growth control of adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochem.*, **94**, 1029–1035.
- 52) Moteki, H., Kimura, M., Ogihara, M., 2011. Activation of extracellular-signal regulated kinase by epidermal growth factor is potentiated by cAMP-elevating agents in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1542–1552.
- 53) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 4350–4354.
- 54) Kimura, M., Ogihara, M., 1997. Proliferation of adult rat hepatocytes by hepatocyte growth factor is potentiated by both phenylephrine and metaproterenol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 11446-1154.

- 55) Miyazaki, K., Eguchi, S., Tomonaga, T., Inokuma, T., Hamasaki, K., Yamanouchi, K., Takatsuki, M., Kamohara, Y., Tajima, Y., Kanematsu, T., 2011. The impact of the intra-abdominal space on liver regeneration after a partial hepatectomy in rats. *J. Surg. Res.*, **171**, 259–265.
- 56) Nakamura, T., Ichihara, A., 1985. Control of growth and expression of differentiated functions of mature hepatocytes in primary culture. *Cell Struct. Funct.*, **10**, 1–16.
- 57) Loyer, P. Cariou, S., Glaise, D., Bilodeau, M., Baffet, G., Guguen-guillouzo, C., 1996. Growth factor dependence of Progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 11484–11492.
- 58) Kimura, M., Ogihara, M., 1999. Stimulation by transforming growth factor- α of DNA synthesis and proliferation of adult rat hepatocytes in primary cultures: modulation by α - and β -adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **291**, 171–180.
- 59) 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.
- 60) Kurihara, K., Moteki, H., Kimura, M., Ogihara, M., 2021. Autocrine secretion of insulin-like growth factor- I mediates growth hormone-stimulates DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 891, 173753.
- 61) Moteki, H., Kimura, M., Ogihara, M., 2011. Activation of extracellular-signal regulated kinase by platelet-derived growth factor is potentiated by phenylephrine in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 980–986.
- 62) Frémin, C., Ezan, F., Guegan, J., Gailhouste L., Trotard, M., Seyec, J. L., Ragul, J., Theret, N., Langouët, S., Baffet, G., 2012. The complexity of ERK1 and ERK2 MAPKs in multiple hepatocyte fate responses. *J. Cell. Physiol.*, **227**, 59–69.

- 63) Frémin, C., Ezan, F., Boisselier, P., Bessard A., Pagès, G., Pouysségur, J., Baffet, G., 2007. ERK2 but not ERK1 plays a key role in hepatocyte replication: An RNAi-mediated ERK2 knockdown approach in wild-type and ERK1 null hepatocytes. *Hepatology*, **45**, 1035–1045.
- 64) Ullrich, A., Gray, A., Albert, Tam, A.W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Jacobs, S., Francke, U., Ramachandran, J., Fujita-Yamaguchi, Yoko., 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
- 65) Hubel, R.E., 1990. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.*, **190**, 445-462.
- 66) Lund, P.K., Mosts-Staats, B.M., Hynes, M.A., Simmons, J.G., Jansen, M., D'Ercole, A.J., Van Wyk, J.J., 1986. Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and Insulin-like growth factors-II mRNA in rat fetal and adult tissues. *J. Biol. Chem.*, **261**. 14539-14544.
- 67) 茂木 肇、2014. 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、城西大学大学院博士論文。
- 68) Roy, N., Nazeem, P.A., Babu, T.D., Abida, P.S., Narayanankutty, A., Valsalan, R., Valsala, P.A., Reghavamenon, A.C., 2018. EGFR gene regulation in colorectal cancer cells by garlic phytochemicals with special emphasis on S-Allyl-L-Cysteine Sulfoxide. *Int. Sci. Comput Life Sci.*, **10**, 686-693.
- 69) Amino, S. Itakura, M., Ohnishi, H., Tsujimura, J., Koizumi, S., Takei, N., Takahashi, M., 2002. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca²⁺-responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biochem.*, **131**, 887–894.
- 70) Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Ellis-Davies, G. C. R., Miyashita, Y., Kasai, H., 1999. Post-priming actions of ATP on Ca²⁺-dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 760–765.