

氏 名	おく やま ひろ あき 奥 山 裕 照
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2559 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Regulation of Cell Growth by Redox-mediated Extracellular Proteolysis of Platelet-derived Growth Factor Receptor β (レドックスを介した PDGF 受容体の細胞外分解による細胞増殖制御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 淀 井 淳 司 教 授 成 宮 周 教 授 山 岡 義 生

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内の酸化還元バランスは、細胞のさまざまな機能に大きな影響を与える。N-アセチルシステインなどの還元剤は活性酸素ラジカルを消去することにより細胞内のシグナル伝達および増殖を制御することが知られている。肝星細胞は肝臓における主要なコラーゲン産生細胞であり、肝線維化の起因細胞であることが分かってきた。従って、その増殖を抑制することは線維化治療につながる。本研究では、NAC が星細胞の PDGF 増殖シグナルに与える影響について検討し、さらに、ラット肝線維化モデルで NAC が抑制しうるかを合わせて検討した。

まず、ラット肝からプロナーゼ、コラーゲナーゼ灌流にて肝星細胞を分離、培養した。星細胞に PDGF を投与すると3倍に増殖能が上昇するが、NAC 前処理で濃度依存性に増殖が抑制された。PDGF の細胞内シグナル (PDGF 受容体, ERK, Akt のリン酸化) も NAC 前処理で濃度依存性に抑制された。さらに、PDGF 受容体自体のタンパク量が減少することを明らかにした。¹²⁵I-PDGF 結合実験により PDGF シグナルの抑制は PDGF 受容体の減少による PDGF 結合阻害によって起こることが判明した。

ノーザンブロットおよび ³⁵S-メチオニンラベル実験から、NAC による PDGF 受容体減少は分解の亢進によることが示唆された。さらに、カテプシン B 阻害剤でのみ PDGF 受容体の減少が阻害されることから、PDGF 受容体はカテプシン B によって分解されることが示唆された。In vitro タンパク分解実験でも、同様の結果を得た。また、PDGF 受容体はグルタチオン、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノールのような NAC 以外のチオール化合物でも分解された。

さらに、星細胞はカテプシン B を分泌しており、細胞膜を通過しないタイプのカテプシン B 阻害剤を用いても PDGF 受容体分解が阻害されることから、細胞外で分解されていることが示唆された。

以上の結果から、星細胞はカテプシン B を分泌しており、NAC などのチオール化合物により細胞外レドックス環境を還元状態へ変化させると、カテプシン B の酵素活性が上昇し、PDGF 受容体が分解され、PDGF シグナルを抑制し、星細胞の増殖を抑制していることが判明した。

つぎに、ラット肝線維化モデルにおける NAC の肝線維化抑制効果を検討した。チオアセトアミドを6週間投与すると肝線維化が起きるが、NAC を同時投与しておくと線維化が抑制された。腹腔内投与でも、経口投与でも抑制効果を認めた。NAC 投与群で星細胞の増殖が抑制されていることを星細胞のマーカーである alpha-smooth muscle actin の免疫染色にて証明した。さらに、NAC 投与群で PDGF 受容体が減少することも Western blot にて証明した。

以上の結果から、NAC は肝線維化モデルで改善効果を示し、その機序として、PDGF 受容体分解を介した星細胞の増殖抑制が一因をなしていることが判明した。

これらの結果をまとめると、NAC は PDGF 受容体分解を介して星細胞の増殖を抑制し、さらに、ラット線維化モデルでも、NAC は同様の機序を介して線維化を抑制することが証明され、レドックス制御による肝線維化治療の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝星細胞は肝臓における主要なコラーゲン産生細胞であり、肝線維化を起こす。よって、その増殖抑制は線維化治療につながる。本研究では、N-アセチルシステイン（NAC）による星細胞のPDGF増殖抑制の新たな機序について解析し、さらに、NACがラット肝線維化モデルを抑制しうるか検討され、以下の事実が明らかにされた。

NAC処理で星細胞のPDGF依存性増殖およびそのシグナル（PDGF受容体、ERK、Aktのリン酸化）を抑制した。その際、PDGF受容体が減少していた。¹²⁵I-PDGF結合実験からPDGFの結合阻害が起こることが判明した。ノーザンブロットおよび放射性ラベル実験から、NACによるPDGF受容体減少は分解の亢進によることが示唆された。カテプシンB阻害剤でのみPDGF受容体の分解が阻止されることから、NACの効果はカテプシンBを介することが示唆された。細胞膜非通過型カテプシンB阻害剤を添加しても分解が阻止され、星細胞はカテプシンBを分泌することから、細胞外分解が示唆された。

つぎに、ラット肝線維化モデルにおけるNACの効果が検討された。NAC投与にてチオアセトアミドによる線維化が抑制され、NAC投与肝では星細胞数が減少し、PDGF受容体が減少していることも明らかにされた。

以上の研究はN-アセチルシステインによる新たな星細胞増殖抑制機序の解明に貢献し、肝線維化の治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は平成14年12月11日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。