

# Effects of cyclic AMP-related modulators on cell proliferation and transformation of rat hepatic stellate cells in culture

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 清水, 恵理奈 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1084">http://hdl.handle.net/10271/1084</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 231号	学位授与年月日	平成 9年 3月26日
氏名	清水 恵理奈		
論文題目	Effects of cyclic AMP-related modulators on cell proliferation and transformation of rat hepatic stellate cells in culture (ラット培養伊東細胞の増殖および形質変換に及ぼす、サイクリック AMP 関連試薬の影響)		

博士(医学) 清水 恵理奈

## 論文題目

Effects of cyclic AMP-related modulators on cell proliferation and transformation of rat hepatic stellate cells in culture

(ラット培養伊東細胞の増殖および形質変換に及ぼす、サイクリック AMP 関連試薬の影響)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

肝線維化は、アルコール性肝障害、ウイルス肝炎などにより引き起こされ、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスが沈着する病態である。この細胞外マトリックスの産生に最も重要な役割を果たしている細胞が伊東細胞であり、その機能を制御することが肝線維化の治療につながるものと考えられる。伊東細胞は分離後、血清存在下にてプラスチックプレート上で培養すると活性化、すなわち  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) を発現する筋線維芽細胞への形質変換、増殖、細胞外マトリックスの産生を認める。この過程は、*in vivo* における肝線維化過程を再現していることから、培養伊東細胞を用いて肝線維化機序に関する研究がなされている。一方、サイクリック AMP (cAMP) は生体内に広く存在する細胞内情報伝達物質で、adenylate cyclase や phosphodiesterase (PDE) により調節されている。また種々の細胞において、細胞内 cAMP の上昇が細胞増殖を抑制することが報告されている。そこでわれわれは、伊東細胞の増殖および形質変換に及ぼす cAMP 関連試薬の影響を検討した。

### [材料ならびに方法]

SD 雄性ラット正常肝をプロナーゼ・コラゲナーゼ灌流消化し、ナイコデンツ比重遠心法にて分離した。細胞は、20%血清を含む M-199培地にて培養し、増殖能および細胞内 cAMP 濃度の検討には培養72時間後より、形質変換の指標である  $\alpha$ -SMA の発現量の検討には培養24時間後より、50  $\mu$  M forskolin (adenylate cyclase 刺激剤)、500  $\mu$  M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (非選択的 PDE 阻害剤)、1 mM 8-bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-bromo-cAMP) (cAMP アナログ) および対照群として0.1% DMSO をそれぞれ添加培養した。また、PDE I、III、IV型に対する選択的阻害剤として、8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine (8MMX)、quazinsonone、Ro-201724 をそれぞれ同様に添加培養した。細胞増殖能は、 $[^3\text{H}]$  thymidine の取り込みにて評価し、形質変換に及ぼす影響は、伊東細胞の形質変換の指標である  $\alpha$ -SMA の発現量を、ウェスタンブロット法にて解析した。細胞内 cAMP は、ラジオイムノアッセイにて測定した。

### [結果]

細胞増殖能は、50  $\mu$  M forskolin、500  $\mu$  M IBMX、1 mM 8-bromo-cAMP により、細胞内 cAMP の有意な上昇を伴い、それぞれ対照群の81.2%、34.1%、16.9%に抑制された。 $\alpha$ -SMA の発現量は、IBMX により対照群の48.1%に抑制されたが、forskolin、8-bromo-cAMP により抑制作用は認められなかった。一方、選択的 PDE 阻害剤による細胞増殖能は、PDE III阻害剤である quazinsonone により濃度依存性の抑制作用が認められ、60  $\mu$  M 濃度にて対照群の76.6%に抑制されたが、8MMX および Ro-201724による抑制作用は認められなかった。また、これらの選択的 PDE 阻害剤は、 $\alpha$ -SMA の発現量に影響を及ぼさなかった。

### [考 察]

ラット培養伊東細胞において、細胞内 cAMP の増加により、細胞増殖が抑制されることが示された。一方、形質変換に対する IBMX の抑制作用は、forskolin、8-bromo-cAMP により認められなかったことから、細胞内 cAMP の上昇によるものだけでなく、IBMX の他の調節作用による可能性が考えられた。選択的 PDE III 阻害剤により細胞増殖が抑制されたことより、ラット培養伊東細胞には、少なくとも PDE III アイソザイムが存在し、細胞増殖の調節に関与している可能性が考えられた。

### [結 論]

ラット培養伊東細胞の細胞増殖は、PDE III を介した、cAMP の増減により調節され得る可能性が示された。また、cAMP により細胞増殖が抑制されたことから、PDE 阻害剤が肝線維化の抑制に有用である可能性が考えられた。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

肝硬変は全ての慢性肝障害の終末像であるが、その生化学的、病理形態学上の特徴は細胞外マトリックス、とくにコラーゲンの増加である。したがって、コラーゲン産生の抑制は肝硬変への進展予防にもっとも重要な因子となるが、現在の確な方法はない。

一方、1951年に伊東により肝類洞壁の脂肪摂取細胞として報告された伊東細胞は、その後細胞外マトリックス産生にもっとも重要な役割を果たしていることが明らかにされ、その機能を抑制することが肝線維化の抑制につながるものと考えられている。また、cyclic AMP (cAMP) およびその関連物質は様々な細胞においてその増殖を抑制することが知られている。本研究はラット伊東細胞を用い、cAMP 関連物質が起す伊東細胞の増殖が、あるいはその形質変換を介して、肝線維化の抑制にいかなる影響を及ぼすかを検討したものである。

SD 雄性ラット肝をプロナーゼ・コラゲナーゼで灌流した後、ナイコデンツ比重遠心法で、約75%~85%の伊東細胞を含む上層を分離した。分離細胞はさらに20%血清を含む M-199培地にて培養した。この処理による培養3日後の伊東細胞の純度は95%以上であった。培養24時間後より形質変換の指標である  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現量の検討を、また72時間後より増殖能、細胞内 cAMP の検討を、forskolin、8-bromo-adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-bromo-cAMP)、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) および選択的 phosphodiesterase (PDE) 阻害剤等を用いて検討した。細胞増殖能は [<sup>3</sup>H] thymidine の取り込みで、また  $\alpha$ -SMA の発現量はウエスタンブロッティング法で評価した。

結果として、50  $\mu$  M forskolin、500  $\mu$  M IBMX、1 mM 8-bromo-cAMP により細胞内 cAMP の有意な増加とともに、細胞増殖能はそれぞれ対照群の81.1%、34.1%、16.9%に抑制された。 $\alpha$ -SMA の発現量は、IBMX により48.1%に抑制されたが、forskolin、8-bromo-cAMP では抑制されなかった。さらに選択的 PDE 阻害剤による細胞増殖能は、PDE III 阻害剤である quazinone により濃度依存性に抑制作用が認められ、60  $\mu$  M にて76.6%に達したが PDE I 阻害剤 8-methoxymethyl-3-isobutyl-1-methylxanthine (8MMX)、あるいは PDE IV 阻害剤 Ro-201724 等では抑制作用は認めなかった。またこれら選択的 PDE 阻害剤は、 $\alpha$ -SMA の発現量に影響を及ぼさなかった。

これらの成績から、ラット伊東細胞は、細胞内 cAMP の増加によりその増殖が抑制されることが明らかとなった。一方、形質変換に対する IBMX の抑制作用は、forskolin、8-bromo-cAMP では認めら

れなかったことから、細胞内 cAMP の上昇によるものだけでなく、IBMX の他の作用による可能性が示された。選択的 PDE III 阻害剤で細胞増殖が抑制されたことから、ラット伊東細胞には少なくとも PDE III アイソザイムが存在し、細胞増殖の調節に関与している可能性が示唆された。

以上本研究では、cAMP が伊東細胞の形質変換によりコラーゲン増生を直接抑制する成績は得られなかったが、細胞増殖を抑制することを明らかにし、PDE 阻害剤が肝線維化の抑制に有用である可能性を示した点が高く評価された。

申請者の発表に対し次のような質疑が行われた。

- 1) 伊東細胞の形態的特徴について
- 2) 伊東細胞におけるコラーゲン産生の過程について
- 3)  $\alpha$ -smooth muscle actin を細胞外マトリックス産生の指標とすることの妥当性について
- 4) 伊東細胞増殖と線維化との関連について
- 5) Phosphodiesterase のアイソフォームとそれぞれの特性について
- 6) 線維化を促進するサイトカインについて
- 7) 慢性肝疾患における伊東細胞の変化について
- 8) Isoproterenol、adrenomedullin、cafein 等の肝線維化予防効果について

以上の質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、研究内容も博士（医学）の学位論文としての水準に達しているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 金子 榮 蔵

副査 教授 中 島 光 好 副査 助教授 中 村 達