

氏名(本籍)	芋瀬基明(愛知県)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 549号
学位授与日付	平成15年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt is Essential for Massive Hepatocytes Apoptosis Induced by Tumor Necrosis factor $\alpha$ in Mice
審査委員	(主査) 教授 森脇久隆 (副査) 教授 藤原久義 教授 中島茂

### 論文内容の要旨

劇症肝炎は、広範かつ急激に生じる肝細胞死に基づいた高度の肝細胞機能障害による肝性昏睡をはじめとした肝不全症状を呈する極めて予後不良な疾患である。一方、通常の急性肝炎は、劇症肝炎とは病因が同じでありながらその予後は良好であり、両者間の相違は肝細胞死進展の程度と肝再生不全の有無によるが、そのメカニズムは不明である。

近年、細胞死の機構にアポトーシスの概念が導入され、Fasリガンドやtumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ といったdeath factorが、どのように細胞内で伝達され、細胞死を調節しているのかが明らかになりつつある。劇症肝炎の発症機構においてもアポトーシスの関与が明らかにされているが、TNF受容体はアポトーシスのシグナルを伝えながら、同時に生存シグナルを伝えるように、肝細胞死のメカニズムには不明な点が多い。正常マウスや正常の肝細胞はTNF- $\alpha$ に対して抵抗性であり、このことは、TNF- $\alpha$ がアポトーシスのシグナルを伝えると同時に、抗アポトーシスシグナルを伝える為と考えられている。

NF- $\kappa$ BはTNF- $\alpha$ によって活性化される転写因子であり、TNF- $\alpha$ や他の刺激によって誘導されるアポトーシス反応を抑制することが知られている。NF- $\kappa$ Bはおそらく何らかの抗アポトーシス遺伝子を合成することでその生存シグナルを誘導していると考えられているが、その機序については十分解明されているとは言い難い。また、NF- $\kappa$ Bの経路に加え、TNF- $\alpha$ が、他の抗アポトーシスシグナル経路を活性化することが報告されている。phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)とその下流に存在するAktの経路は細胞生存に重要である。我々は以前にヒト肝細胞Huh-7とHc細胞がNF- $\kappa$ BとPI3Kの活性を抑制することによってTNF誘導アポトーシスに感受性を示したことを報告した。しかしながら、これまで細胞死のメカニズムにおける抗アポトーシスシグナルに関する研究は、ほとんどが*in vitro*で行われてきた。今回、我々は、NF- $\kappa$ BやPI3K/AktがTNF誘導肝細胞障害の抑制に果たす役割を*in vivo*で検討した。

### 研究方法

I $\kappa$ B mutant adenovirus (Ad5I $\kappa$ B)を293細胞に感染させて増殖させ、塩化セシウムによる比重分離を行い精製した。その後精製したAd5I $\kappa$ Bのウイルス力価を測定した。対照としてEscherichia coli  $\beta$ -galactosidase遺伝子を含むAd5LacZを上記と同様に増殖・精製して用いた。BALB/cマウスに(1) Ad5I $\kappa$ B群:NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制する目的でAd5I $\kappa$ Bを $2.0 \times 10^9$  PFU/mouse尾静脈より投与した。(2) Wortmannin群:PI3-kinase inhibitorであるWortmanninを1mg/kg/日、12日間経口投与した。(3) Ad5I $\kappa$ B+Wortmannin群: Wortmanninを1mg/kg/日、12日間経口投与し、かつAd5I $\kappa$ Bを $2.0 \times 10^9$  PFU/mouse尾静脈より投与した。この3群に対してTNF- $\alpha$ を0.5mg/mouseを尾静脈より投与し、8時間後に犠牲死させ血清、肝組織を採取した。血清トランスアミナーゼ値、HE染色による肝障害の程度、TUNEL染色による肝細胞アポトーシス、凍結肝組織の懸濁液よりカスパーゼ活性を比較検討した。またWestern Blot法にてAktの活性を、Gel Shift法にてNF- $\kappa$ Bの活性化を検討した。また、Bcl-2 family memberの発現をWestern Blot法およびRibonuclease Protection Assay(RPA)によって、それぞれ蛋白レベル、mRNAレベルで解析した。

### 研究結果

Ad5I $\kappa$ B投与によりTNF- $\alpha$ 投与後のNF- $\kappa$ B活性の上昇は、Wortmanninの投与によってAktのリン酸化は

肝臓において抑制された。血清ALT値は正常マウスで $84 \pm 26$  IU/l, TNF- $\alpha$ 単独投与群で $37 \pm 3$  IU/lであったが, Ad5I $\kappa$ B群で $1408 \pm 407$  IU/l ( $p < 0.05$ ), Wortmannin群で $909 \pm 122$  IU/l ( $p < 0.05$ )と軽度上昇し, NF- $\kappa$ BまたはPI3K/Aktの活性を抑制されたマウス肝細胞はTNF- $\alpha$ に対し感受性を示すようになった。ところが一方, NF- $\kappa$ BまたはPI3K/Aktの活性が同時に抑制されたAd5I $\kappa$ B+Wortmannin群では $13014 \pm 343$  IU/l( $p < 0.01$ )と著明な肝障害が認められた。肝組織像においてもAd5I $\kappa$ B+Wortmannin群は他の2群に比し, 肝障害の像は著明であり, TUNEL法による検討でもアポトーシス細胞の有意な増加が認められた。実際にこのモデルにおいて観察される肝障害がアポトーシスを介しているかどうかを確かめるため, Caspase 活性を測定したところ, Caspase-3および9の活性が, Ad5I $\kappa$ B群で軽度の上昇, Ad5I $\kappa$ B+Wortmannin群で著明な上昇がみられた。Caspase-8の活性はAd5I $\kappa$ B群のみで上昇がみられたが, 軽度であった。結果としてCaspase-3および9の活性化が優位に認められたことから, このモデルにおけるシグナル伝達がミトコンドリアを経由することが示唆された。そこで, ミトコンドリアが関与する経路の上流においてアポトーシスを調節しているBcl-2 family memberの発現も調べた。Bcl-2 family memberの発現はBfl-1などmRNAレベルで変化の認められたものもあったが, 蛋白レベルではどの分子についても各群間に有意な差は見いだせなかった。またミトコンドリア上でBcl-X<sub>L</sub>と結合しアポトーシスを誘導するBadやCaspase-8によって切断され, その結果産生されたtBidが細胞質からミトコンドリアへ移行して, やはりアポトーシスを誘導するBidといったBcl-2 familyの中でもBH3ドメインのみを有するBH3-onlyタンパクについても検討したが, Badのリン酸化やBidのcleavageはどの群でもみられなかった。近年, AktがNF- $\kappa$ Bの活性を制御していることが報告されている。そこで各々の生存シグナルの相互関係を検討する目的で, Wortmannin投与マウスでのNF- $\kappa$ B活性を測定したが, TNF- $\alpha$ 投与後の肝NF- $\kappa$ B活性には影響がなかった。

#### 考案, 結語

我々はこれまでにTNF- $\alpha$ 受容体を介したNF- $\kappa$ Bの活性化が, TNF- $\alpha$ 自身の細胞へのアポトーシス誘導シグナルに対して抑制的に働くことを報告してきた。今回の研究で, TNF- $\alpha$ によって誘導される劇症肝炎様の広範な肝細胞アポトーシスはNF- $\kappa$ BとPI3K/Aktの両方の抗アポトーシスシグナルが抑制されると始めて惹起されることを*in vivo*で初めて証明した。このことからNF- $\kappa$ BばかりでなくPI3K/AktもTNF- $\alpha$ 誘導細胞障害性に対する肝細胞の生存に重要な役割を果たしていることが示された。またこれら2つの生存シグナルはPI3K/Akt経路の抑制がTNF- $\alpha$ 刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性に影響を及ぼさなかったことから, 2つの経路は互いに独立しているものと考えられた。Caspase-8の活性に比べてCaspase-3および9の活性が著明に上昇していることから, その細胞内シグナルはtype II cell death signaling pathwayに依存し, ミトコンドリアを介していることが示唆された。そこでNF- $\kappa$ BやPI3K/Aktがその下流で, ミトコンドリアにおいて抗アポトーシス作用を示すことが知られているBcl-2 familyに影響していないかをmRNA並びに蛋白レベルで検討した。しかし, NF- $\kappa$ BやPI3K/Aktの抑制のBcl-2 family member発現への影響は認められなかった。TNF- $\alpha$ によって誘導される肝細胞アポトーシスでは生と死のシグナルがクロストークしており, NF- $\kappa$ BとPI3K/Aktを介したシグナル伝達は, TNF- $\alpha$ アポトーシスに対する肝細胞sensitizationに重要な役割を果たしていると考えられた。本来, アポトーシスはウイルスなどが感染した生体に不必要な肝細胞を排除するには有効な機構である。しかし, それが, 過剰に起こった場合, 肝臓は劇症肝炎に陥るに違いない。肝細胞アポトーシスにおけるアポトーシス感受性(sensitization機構)ならびに肝細胞の生死を決定するメカニズムの分子機構の解明は有効な治療法の開発に繋がると思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

申請者 芋瀬基明は, 劇症肝炎の発症機序としてNF- $\kappa$ BとPI3K/Aktを介したシグナル伝達の関与を想定し, それをマウスを用いて, 初めて, *in vivo*で証明した。この研究成果は劇症肝炎の発症機序を解明する可能性を開き, 肝臓病学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

#### [主論文公表誌]

Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B and Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt is Essential for Massive Hepatocyte Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  in Mice

2003年 liver International: in press