

学位論文題名

Mechanism of free radical-induced oxidative injury
and activation of signal transduction in rat liver membrane
with acute hepatitis -spectroscopic observation-

(ラット肝においてフリーラジカルが誘発する膜の
酸化損傷と細胞内情報伝達活性化機序の解明)

学位論文内容の要旨

フリーラジカルは癌、心臓病、脳血管系の病気、さらに痴呆など、老化に伴う成人病の原因として知られている。しかし、フリーラジカルによる生体内作用機序に関しては未だ十分に明らかになっていない。著者は本研究で、従来の生化学的方法に加えて分光学的方法を用いることにより、フリーラジカルによる細胞膜損傷と細胞内情報伝達の活性化機序を明らかにすることを試みた。

本研究の第一章では、肝ミクロソーム/四塩化炭素反応系における脂質過酸化物生成反応を ESR (電子スピン共鳴) 及び赤外分光法により検討し、それらの生物系におけるラジカル反応の研究に対する有効性を検討した。肝ミクロソームは雌 Sprague-Dawley (SD)ラット肝臓から常法に従って調製した。NADPH の存在下、四塩化炭素を基質とする酵素反応を行った。四塩化炭素から生成するラジカル反応中間体、ミクロソーム膜成分の過酸化反応及びミクロソーム膜の構造変化を、それぞれ、スピントラップ剤 N-tert-butyl- α -phenyl nitron (PBN)を用いる ESR スペクトルの解析、TBA 試薬によるマロンジアルデヒドの測定及びミクロソーム膜から抽出した膜成分の赤外スペクトルの観測から検討した。PBN スピンアダクトの ESR スペクトルは、トリクロロメチルラジカルによるものと解析された。四塩化炭素の添加によって、ミクロソームリン脂質の脱水素ラジカル反応の進行に関する赤外スペクトルの変化が観測された。このことは TBA 試薬のよる脂質過酸化物生成量の測定からも確認された。一方、リン脂質リン酸部の赤外スペクトルには脱リン酸反応から生ずるスペクトル変化は見られなかった。以上の結果から、ESR 及び赤外分光法のフリーラジカルの生体物質に対する反応性の研究における有効性が示された。

第二章では、典型的なラジカル生成肝毒性物質である四塩化炭素をラットに投与した後、in vivo における肝臓でのラジカル生成、ジアシルグリセロール

(DAG) 生成を伴う膜構造変化及びプロテインキナーゼ C (PKC) 酵素の活性化等を検討し、ラジカルの細胞内情報伝達過程活性化の機序を明らかにすることを目的とした。雌性 SD ラットに四塩化炭素 (0.8 ml/kg b.w.) を腹腔内投与し、投与 3, 12 及び 24 時間後にラットをト殺した後、血液及び肝臓を採取して試料とした。血漿 GPT 値の測定から、四塩化炭素投与 24 時間後まで肝炎が進行していることが分かった。肝ホモジネイトの $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 抽出物の赤外スペクトルを検討し、肝細胞膜には、リン脂質の代謝物でセカンドメッセンジャーの一つでもある DAG が、膜成分の約 10-15% (重量比) も含まれていることが明らかになった。このことは、HPLC を用いた生化学的方法によっても確認された。また、ATP を用いる酵素反応活性の測定から、細胞内情報伝達において重要な役割を果たす PKC の酵素活性増加も観測された。

一方、PBN を四塩化炭素投与 30 分前に前投与した時、GPT 値の上昇が見られず、また、肝ホモジネイト中に PBN- CCl_3 アダクトの生成が観測され、肝でのトリクロロメチルラジカルの生成と、このラジカルが肝炎発症に重要な役割を果たしていることが確かめられた。一方、赤外スペクトルの観測において、四塩化炭素単独投与群で見られる膜リン酸部の脱リン酸化反応及び DAG の生成は観測されなかった。

以上の結果から、ラット肝において生成する四塩化炭素由来のフリーラジカル代謝物は、肝炎発症の原因毒性物質となると同時に、肝細胞膜に蓄積する DAG を介して PKC を活性化することが示唆された。尚、PKC の活性化は肝の修復過程の一部と考えられた。

第三章では、肝炎・肝臓癌自然発症モデル動物である Long-Evans Cinnamon (LEC) ラット肝におけるフリーラジカルが誘発する DAG の生成及び PKC 酵素の活性化を検討した。約 15 年前、北海道大学実験動物センターで発見された LEC ラットは、生後約 4 ヶ月で肝炎を起こして 40% は急性肝炎で死亡し、残りはすべて慢性肝炎症状を経て肝臓癌を発症する。経過がヒトの肝炎・肝臓癌発症のそれとよく似ていることから、それらの発症機序の研究が重ねられてきた。そして、このラットの肝臓には、週齢と共に異常に大量の銅が蓄積し、その蓄積した銅が介在して生成されるフリーラジカルが肝炎あるいは肝臓癌発症の主な原因であることが推測されている。

10 週齢、雌 LEC ラットをコントロール群、ビリルビンが高値を示す 16 週齢を肝炎発症群として、それらから採取した血液及び肝臓を試料とした。肝炎発症、肝細胞膜の構造変化そして PKC 酵素活性は、第二章で示したと同一方法により検討した。血漿 GPT 値の測定から、16 週齢 LEC ラットで肝炎が発症していることを確かめた。一方、肝ホモジネイトの $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 抽出物の赤外スペクトル及び HPLC による結果から、肝細胞膜に DAG が膜成分の

約10% (重量比) 含まれていることが明らかになった。さらに、肝炎発症と同時に PKC 活性の増加も観測された。かつて、当教室において LEC ラットの肝細胞の核タンパク中に含まれる銅量と核内転写因子の一つである血清反応要素 (SRF) 活性との間に相関関係があることが報告された。また、SRF はプロトオンコジーンである c-fos の誘導にも関与することが報告されている。これらのことを考慮して、ここで見出された肝炎期における LEC ラット肝細胞膜に蓄積した DAG による PKC の活性化は、さらに SRF の活性化を介して肝臓癌発症に重要な役割を果たしていると考えられた。この様に LEC ラット肝において生成するフリーラジカルは、肝炎発症の原因毒性物質となると同時に、肝細胞膜に蓄積する DAG を介して PKC および SRF を活性化することにより肝臓癌発症に重要な役割を果たしているが示唆された。

以上、本研究ではラット肝臓に生成するフリーラジカルが、肝細胞膜に酸化的損傷を与えるだけでなく、そこに蓄積される DAG を介して細胞内情報伝達過程を活性化することが示された。そして、これらの機序の解明に、従来の生化学的手法に加えて分光学的手法が有効であることも示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 桑 原 幹 典
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 助 教 授 数 坂 昭 夫

学 位 論 文 題 名

Mechanism of free radical-induced oxidative injury and activation of signal transduction in rat liver membrane with acute hepatitis -spectroscopic observation-

(ラット肝においてフリーラジカルが誘発する膜の
酸化損傷と細胞内情報伝達活性化機序の解明)

フリーラジカルが様々な病気の原因物質と考えられているにも拘わらず、その作用機序は十分に解明されたとはいえない。本研究は、ラジカルによる細胞膜損傷と細胞内情報伝達の活性化機序の解明を目的としている。実験には、生化学的方法に加えて分光学的方法を適用し、毒性学研究における分光法の有効性も検討した。

肝ミクロソーム/CCl₄ 反応系における典型的な脂質過酸化反応を、スピントラップ剤 N-tert-butyl-

α -phenyl nitron (PBN) を用いる ESR (電子スピン共鳴) スペクトルの観測とミクロソーム膜抽出物の IR (赤外) スペクトルの観測から検討した。ラジカル中間体 CCl₃・の生成と脂質 -C=C-H のラジカルによる脱水素反応の進行を確認し、これら分光法の生体内ラジカル反応の研究への有効性が確かめられた。

代表的なラジカル生成肝毒性物質である CCl₄ の Sprague-Dawley ラット肝に対する投与効果を血液及び肝臓を試料として検討した。肝ホモジネイト抽出物の IR スペクトルの解析および生化学的方法から、CCl₄ 処置ラットの肝細胞膜にはリン脂質代謝物でセカンドメッセンジャーの一つでもある Diacylglycerol (DAG) が相当量含まれていることが明らかになった。また、細胞内情報伝達物質 Protein Kinase C (PKC) の活性増加も観測された。一方、PBN を前投与した時、CCl₄ 処置をしたラットにおいて DAG 生成の抑制と PBN-CCl₃ アダクトの生成が観測され、肝での CCl₃・生成が DAG の生成に深く関わっていることが確かめられた。以上の結果から、肝炎発症の原因毒性物質である CCl₄ は、肝においてラジカルを生成し、それが肝細胞膜に誘発する DAG を介して PKC を活性化することが示唆された。

肝炎・肝癌自然発症モデルラット Long-Evans Cinnamon ラット肝において、ラジカルが

誘発する DAG 生成及び PKC 酵素の活性化を検討した。肝炎発症群(16週齢)において、高い DAG の蓄積と PKC 活性の増加が観測された。PKC は血清反応要素 (SRF)を活性化すること、肝炎発症 LEC ラットの肝細胞で SRF の活性化が見出されたこと、SRF がプロトオンコジーンである c-fos の誘導に関与すること等を考慮し、ここで見出された LEC ラット肝細胞膜に蓄積する DAG による PKC の活性化は、さらに SRF の活性化を介して肝癌発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。以上、本研究によって、ラット肝に生成するフリーラジカルが、肝細胞膜に酸化的損傷を与えるだけでなく、そこに蓄積された DAG を介して細胞内情報伝達過程を活性化することが明らかにされた。これらの知見は、今後の生体内ラジカル反応の研究に大きく貢献すると考えられた。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者伊 碩柱氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。