



Title	Suppression of Antioxidative Enzyme Expression by Transforming Growth Factor- β 1 in Rat Hepatocytes
Author(s)	栢木, 善朗
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39232
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	柏木 善朗
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 11658 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 2 月 2 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Suppression of Antioxidative Enzyme Expression by Transforming Growth Factor- β 1 in Rat Hepatocytes (ラット肝細胞における形質転換増殖因子ベータ1による抗酸化酵素発現抑制)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 松沢 佑次 (副査) 教授 谷口 直之 教授 中村 敏一

論文内容の要旨

「目的」

生体内の細胞はさまざまな酸化ストレスにさらされており、細胞内には活性酸素を消去する酵素がいくつか存在することが知られている。これまでに、肝細胞癌において抗酸化酵素の中で Mn - スーパーオキサイドデスマターゼ (Mn - SOD), Cu, Zn - SOD, カタラーゼ (CAT) の発現が抑えられていることが報告されていたが、その機序は不明であった。先に肝細胞癌において形質転換増殖因子ベータ1 (TGF - β 1) の発現が増加することを報告したが、私は TGF - β 1 のこれらの抗酸化酵素の発現に及ぼす影響を明らかにするために本実験を行った。

「方法ならびに成績」

1) ラット初代培養肝細胞における TGF - β 1 による Mn - SOD, Cu, Zn - SOD, CAT の発現抑制

ラット肝細胞をコラゲナーゼ灌流法により単離し、3% FCS 含有 Williams E 培地で、4時間培養後、無血清培地に交換し、20時間後に再度無血清培地に交換し、TGF - β 1 (10ng/ml), 腫瘍壞死因子アルファ (TNF - α ; 10ng/ml), インターロイキン1ベータ (IL - 1 β ; 10ng/ml), インターロイキン6 (IL - 6; 50U/ml) を添加した。さらにその24時間後に全 RNA を抽出しノーザンプロット法にて、Mn - SOD, Cu, Zn - SOD, CAT の発現を検討した。その結果、Mn - SOD は IL - 1 β と IL - 6 により誘導がかかり、TGF - β 1 は Mn - SOD の発現を抑制した。しかし、TGF - β 1 は IL - 1 β と IL - 6 による Mn - SOD の誘導は抑制しなかった。また、Cu, Zn - SOD と CAT の両 mRNA の発現は、TGF - β 1 の添加により抑制された。

2) TGF - β 1 による抗酸化酵素発現抑制の時間依存性と細胞密度依存性

これら抗酸化酵素 mRNA の発現をサイトカイン添加後、6時間、24時間、48時間で肝細胞を回収しノーザンプロット法で調べ、デンシトメーターにて発現量を定量化した。その結果これら3種の酵素はいずれも時間依存性に TGF - β 1 により mRNA の発現が抑制されることがわかった。

また、TGF - β 1 の細胞増殖抑制作用が、細胞周期依存性であり、G₁ 期にのみ作用することが知られている。そこで、TGF - β 1 による抗酸化酵素 mRNA 発現抑制作用の細胞周期依存性を調べるために、肝細胞を confluent と

subconfluent の状態で培養し, TGF - β 1 による Mn - SOD mRNA の発現をノーザンプロット法にて調べた。その結果, 肝細胞が G₀ 期にあると考えられる confluent の状態では, Mn - SOD mRNA 量は TGF - β 1 では抑制されなかったが, G₁ 期の細胞が存在すると考えられる subconfluent の状態でのみ, この TGF - β 1 の作用が發揮されると考えられた。

3) TGF - β 1 によるグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (GST) mRNA の発現抑制

肝細胞内には上記の抗酸化酵素以外に H₂O₂ を消去する酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) と GST が存在することが知られているので, TGF - β 1 によるこれらのグルタチオン依存性酵素の mRNA 発現に対する影響を調べた。その結果, GPX mRNA は影響を受けなかったが, GST mRNA は TGF - β 1 により濃度依存性に抑制された。

4) TGF - β 1 による肝細胞内の過酸化物の増加

肝細胞に 10ng/ml の TGF - β 1 を添加し, 24 時間後に過酸化物感受性蛍光色素 2', 7' - dichlorofluorescin diacetate (DCFH - DA) を 5 μ M 添加し 30 分後に回収し Flow cytometry にて解析した。細胞内過酸化物は TGF - β 1 により増加し, 細胞内酸化状態が亢進していることが確認された。

5) ラット肝癌における TGF - β 1 の発現亢進と Mn - SOD の発現抑制

3' - methyl - 4 - dimethylaminoazobenzene (3' - MeDAB) により作成したラット肝癌組織を抗ヒト TGF - β 1 抗体と抗ラット Mn - SOD 抗体を用いて免疫組織染色を行った。肝癌細胞では, 肝細胞では発現していない TGF - β 1 が染色され, 一方, Mn - SOD の発現は正常肝細胞に比べて肝癌細胞で減弱していることが示された。

[総括]

- 1) ラット初代培養肝細胞において, TGF - β 1 は抗酸化酵素である Mn - SOD, Cu, Zn - SOD, CAT, GST 遺伝子の発現を抑制した。
- 2) TGF - β 1 による抗酸化酵素発現抑制作用は, 時間依存性であり, 細胞周期依存性であり, 濃度依存性であった。
- 3) 肝細胞では, TGF - β 1 によるこの抗酸化酵素発現抑制により細胞内過酸化物の蓄積が引き起こされている可能性が示唆された。
- 4) ラット肝癌細胞では, TGF - β 1 の過剰発現が認められ, Mn - SOD の発現が抑制されていることが示された。肝癌細胞では, 正常肝細胞で発現されていない TGF - β 1 を産生し自身の抗酸化酵素の発現を抑制している可能性が考えられた。その結果, 細胞内酸化状態が亢進し, DNA 損傷を引き起こし, 癌抑制遺伝子などのさらなる mutation が起こるため, 癌の悪性度が増していく可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

癌において抗酸化酵素の発現が変化し, 腫瘍の進展に関与することが知られている。特に, 肝細胞癌において Mn - SOD, Cu, Zn - SOD, およびカタラーゼの活性や蛋白量が低下していることが報告されていたが, その機序は不明であった。

本研究では, 肝細胞癌におけるこれら抗酸化酵素の発現低下の機序を明らかにするために, 肝細胞癌において TGF - β が過剰発現していることから, TGF - β のラット肝細胞の抗酸化酵素 mRNA の発現に対する影響を検討したものである。その結果, ラット肝細胞での Mn - SOD, Cu, Zn - SOD, カタラーゼおよび GST 遺伝子の発現は, TGF - β によりすべて抑制され, 細胞内過酸化物も増加することがフローサイトメトリーの実験により明らかになった。

以上のように, 本論文は TGF - β による抗酸化酵素発現に対する作用を明らかにした最初の知見であり, 癌の進展と悪性度の変化に TGF - β が関与する可能性を示唆するものであり, 学位に値すると考える。