

Title	Calcitonin prevents CCl ₄ -induced hydroperoxide generation and cytotoxicity possibly through C1b receptor in rat hepatocytes
Author(s)	陳, 少言
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39869
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	陳 少 言
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 2 3 9 6 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Calcitonin prevents CCl_4 -induced hydroperoxide generation and cytotoxicity possibly through C 1 b receptor in rat hepatocytes (四塩化炭素誘発性肝細胞障害に対する C 1 b 受容体を介したカルシトニンの抑制作用の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男 (副査) 教授 鎌田 武信 教授 谷口 直之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

カルシトニン (CT) は血中カルシウム調整ホルモンとして骨や腎をその主な標的器官とするが、これ以外にも多くの臓器に対して作用を発揮することが知られている。肝臓においても、肝細胞内への Ca^{2+} 流入の増大、 Ca^{2+} /カルモジュリン系を介したコレステロール・中性脂肪の合成抑制などの作用が報告されている。CT受容体 (CTR) の mRNA 塩基配列はラット脳について 2 種類が報告され、各 CTR は C1a および C1b と命名されている。C1b mRNA は C1a mRNA に比べ 111 base の塩基挿入部位を持ち、それぞれラットの脳・腎をはじめ多くの臓器での発現が知られているが、両者とも肝での発現は確認されていない。一方、四塩化炭素 (CCl_4) により誘発される肝障害は、オキシラジカル産生酵素・チトクロム P450 に依存する脂質の過酸化により生じると考えられている。本研究において CT が CCl_4 誘発性肝細胞障害を抑制することを見だし、その機序の詳細につきラット初代培養肝細胞を用いて検討した。

【方法】

- 1) ラット肝細胞の分離および初代培養：肝細胞は 8 週齢の雄性 Wistar ラットより collagenase を用いた酵素法により分離し、10% ウシ胎児血清、 10^{-7} mol/L インスリン、 10^{-8} mol/L dexamethasone 添加 William E 培養液にて 37°C 5% CO_2 下で培養した。
- 2) CTR mRNA の発現：ラット培養肝細胞より全 RNA を抽出し、上記 111 bp 挿入部位を挟む C1a および C1b に共通な primer を用い RT-PCR にて増幅後、制限酵素 Hinf I による切断様式により両者を判別した。対照としてラット脳および腎の全 RNA を用いた。
- 3) Hydroperoxide の定量：肝細胞内に生成された hydroperoxide の定量には DCFH-DA を用いた。細胞内に取り込まれた DCFH-DA は DCFH に変換され、hydroperoxide により急速に酸化され DCF となり蛍光を発する。生成した DCF の定量には FACSsort フローサイトメーターにより 488 nm 励起光により 525 nm の蛍光強度を測定した。細胞のタンパク量は Lowry 法にて測定し補正した。
- 4) CCl_4 による肝細胞毒性： CCl_4 による肝細胞障害は初代培養肝細胞 5×10^5 個あたりの培養液中逸脱酵素である AST および ALT 活性にて評価した。

【結果】

- 1) 肝細胞における CTR mRNA の発現：RT-PCRの結果，ラット脳では602bpと491bpの両者，ラット培養肝細胞では602bpのみ，ラット腎では491bpのみの産物が認められた。602bpと491bpの産物は制限酵素 Hinf I による切断様式により，それぞれ C1b および C1a mRNA 由来であることが確認された。
- 2) CCl_4 による hydroperoxide 産生および肝細胞障害：肝細胞内 hydroperoxide 産生は $3 \sim 10 \text{ mmol/L}$ CCl_4 添加30分後において濃度依存性に，また 5 mmol/L CCl_4 添加30分～8時間後において時間依存性に増加した。同様に培養中 AST および ALT 活性は $3 \sim 10 \text{ mmol/L}$ CCl_4 添加4時間後において濃度依存性に，また 5 mmol/L CCl_4 添加2～8時間後において時間依存性に増加した。 5 mmol/L CCl_4 添加30分後の hydroperoxide 産生量と4時間後の AST および ALT 活性にはそれぞれ有意 ($p < 0.01$) の正相関を認めた。
- 3) CCl_4 処理肝細胞への CT の効果： 10^{-11} から 10^{-7} mol/L のウナギ CT (eCT) およびサケ CT は 5 mmol/L CCl_4 添加30分後細胞内 hydroperoxide 産生および4時間培養液中 AST および ALT 活性を濃度依存性に抑制した。eCT 添加による，細胞内 hydroperoxide 産生と AST 活性および ALT 活性の変化度にはそれぞれ有意 ($p < 0.01$) の正相関を認めた。ヒト CT は 10^{-7} mol/L までこれらの作用を示さなかった。
- 4) CT 作用の肝細胞内情報伝達機構：Protein kinase C (PKC) を活性化する PMA は CCl_4 による肝細胞内 hydroperoxide 産生を有意に抑制した。PKC を阻害する $5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ H7 および PMA24時間処置によって，eCT の hydroperoxide 産生抑制作用は消失した。Protein kinase A を阻害する HA1004，H89 はともに eCT の作用に影響を与えなかった。

【総括】

肝細胞に対して CT は， CCl_4 により誘発される hydroperoxide 産生を低下させ，これに伴う肝細胞障害をも抑制することを初めて明らかにした。 CCl_4 添加による hydroperoxide 産生と細胞障害の程度の間有意の正の相関が認められたことより，低濃度 (5 mmol/L) の CCl_4 で生じる細胞障害の原因としての酸素ラジカル，とくに hydroperoxide 産生の重要性が示された。CT による hydroperoxide 産生変化度と AST・ALT 活性の変化度が有意の正相関を示したことより，CT による CCl_4 誘発性細胞障害の抑制は，CT による酸素ラジカル産生抑制によると考えられる。さらに，培養ラット肝細胞においては C1b mRNA のみの発現を認め，さらに C1b 受容体に対してはヒト CT に比べ魚 CT の親和性が高いことが知られており，今回も同様の結果を得たことから CCl_4 の hydroperoxide 産生と AST・ALT 放出に対する CT の抑制作用は C1b 受容体を介すると考えられた。さらに CT の肝細胞に対する作用の細胞内情報伝達機構に関する検討にて，PKC を活性化する PMA は肝細胞で CCl_4 による hydroperoxide 産生を有意に抑制し，さらに CT による hydroperoxide 産生の抑制作用は，PKC 活性を阻害する H7 および PMA24時間処置によって消失したことから，PKC の関与が大きいと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，四塩化炭素により誘発される肝細胞障害に対する抑制というカルシトニンの全く新しい作用を見出すとともにその機序を解明する目的で行われている。低濃度の四塩化炭素により誘発される肝障害は，オキシラジカル産生酵素・チトクロム P450 に依存する脂質の過酸化により生じるとされているが，その詳細は不明である。またカルシウム代謝調節ホルモンとして知られるカルシトニンは，肝に対しても種々の作用を発揮するがその受容体については明らかにされていなかった。本研究においては初代肝細胞培養を用い， 5 mmol/L の四塩化炭素により誘発される，脂質酸化物であるヒドロペルオキシド産生と培養液中逸脱酵素活性により定量した肝細胞障害が相関することから，低濃度の四塩化炭素による遅発性肝細胞障害にヒドロペルオキシド蓄積の関与が大きいことを示唆した。また脳特異的なカルシトニン受容体と考えられていた C1b 受容体の mRNA 発現を肝細胞においても証明するとともに，おそらくこの受容体を介してカルシトニンが四塩化炭素によって誘発されるヒドロペルオキシドの産生，肝細胞障害をとともに著明に抑制することを明らかにした。さらにこのカルシトニン作用の細胞内情報伝達機序として C キナーゼの活性化が重要であることをも示した。本研究はカルシトニンの肝細胞障害抑制作用，およびその機序につき新しい知見を提示したものであり学位の授与に値すると思われる。