

脾・肝に存在するアクチビンAの生理作用

安 田 宏

①

膵、肝に存在するアクチビンAの生理作用

安田 宏

目次

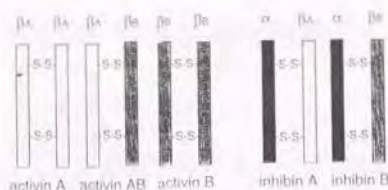
第一章 序論	p 3
第二章 脾ラ氏島に存在するアクチビンAの免疫活性	
II-1.はじめに	p 5
II-2. 実験方法	p 5
II-3. 結 果	p 7
II-4. 考案	p10
第三章 アクチビンAは膵腺房細胞の増殖とアミラーゼ合成を抑制する	
III-1.はじめに	p13
III-2. 実験方法	p13
III-3. 結 果	p15
III-4. 考案	p18
第四章 アクチビンAはラット培養肝細胞のオートクリン増殖抑制因子である	
IV-1.はじめに	p21
IV-2. 実験方法	p21
IV-3. 結 果	p23
IV-4. 考案	p28
第五章 結論	p31
謝辞	p32
文献	p33

第1章 序 論

アクチピンはtransforming growth factor (TGF)- β 遺伝子ファミリーに属する分子量25Kdの二量体タンパクであり、卵胞液中より卵胞刺激ホルモン (FSH) 分泌抑制因子であるインヒピン(1-4)を分離、精製する際に、逆にFSHの分泌を刺激する因子として分離された(5, 6)。その構造は特徴的で同じファミリーに属するインヒピンの β サブユニットの二量体という構造をもっている。 β サブユニットは β_A と β_B の二種類存在することから三種類のアクチピンの存在が予測されるが、実際に生体では三種類のアクチピンの存在が確認されており(5, 6)、それぞれアクチピンA(β_A ホモダイマー)、アクチピンAB (β_A - β_B ヘテロダイマー)、アクチピンB(β_B ホモダイマー)と呼ばれている(図1-1)。アクチピンは性腺、下垂体以外にも神経系、骨髄、副腎など様々な臓器でその発現が知られており(7)、局所において産生されオートクリン、パラクリン因子として細胞の分化や増殖に大きな影響を及ぼしていると考えられている。また発生の過程でアクチピン遺伝子が初期胚において発現し中胚葉誘導を行うことが明らかになっている(8-10)。三種類あるアクチピンにどのような生理作用の違いがあるのかは確定はされていないが、FSH分泌刺激能や赤芽球分化誘導能(erythroid differentiation factor活性、EDF活性)、Xenopus中胚葉の誘導能などを指標にしてみるとアクチピンAとABはFSH分泌やEDF活性はほぼ同等の強力な活性を有するが、アクチピンBはこれらの作用は弱く、逆に中胚葉分化誘導能はアクチピンBの方が強い活性を有すると報告されている(11)。

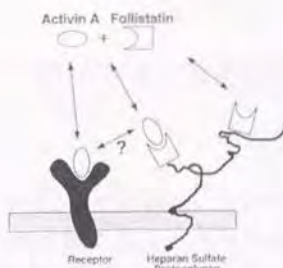
アクチピン受容体はこれまで放射性リガンドによる結合実験から 10^{-10} M程度のKd値を持つものの存在が想定されていたが、最近、cDNAクローニングにより一次構造が決定された(12)。その予想されるアミノ酸配列から、アクチピン受容体は細胞外のリガンド結合部位と、一つの膜貫通部位と、細胞内ドメインとしてセリン/スレオニンキナーゼ活性をもつと思われる部位から成る。TGF- β 受容体は放射性リガンドのクロスリンク実験からI型(53kD)、II型(75kD)、III型(300kD、ベータグリカンとも呼ばれている)に分類されている。クローニングされたアクチピン受容体はTGF- β 受容体とのホモロジーと分子量からII型受容体と分類されている。また精製した同受容体のリン酸化実験からセリン、スレオニンキナーゼ活性に加え、チロシンキナーゼ活性を有することが知られている。更に多くのII型受容体

図1-1



アクチビン/インヒビンの構造

図1-2



フォリスタチンはアクチビン結合タンパクである。

の亜型もクローニングされており(13)、その発現は組織により異なっていると予想される。

アクチビンの作用を考える上でもう一つの重要なものにフォリスタチンがある。フォリスタチンはやはり卵胞液中よりインヒビンを分離精製する際にインヒビンとは異なるFSH分泌抑制因子として精製された(14)。分子量は31kDから39kDの一本鎖糖タンパクで性腺、下垂体以外に脾、大脳皮質、腎などでその発現が明らかになっている(15)。当初、その作用は不明であったが、アクチビン結合タンパクであることが明らかになった(16)。フォリスタチンのアクチビンとの結合は受容体と競合し、たとえば培養上清中にアクチビンと共に加えると中和抗体のように作用してアクチビンの作用を完全にブロックする。フォリスタチンも局所において産生され、アクチビンの作用を修飾する一種のサイトカインと考えられている。

性腺下垂体系での働きと比べて、アクチビンの肝や脾における作用はこれまでほとんど明らかではなかった。アクチビンがラット単離ラ氏島からのインスリン分泌を促進すること(17)、ラット遊離肝細胞の糖原分解を刺激することなどが報告されていたが(18)、その生理的意義は不明であった。そこで本研究はアクチビンの肝、脾における生理作用の解明を目的として行った。そしてアクチビンAがラット脾ラ氏島非B細胞に存在しインスリン分泌を刺激すること、脾外分泌腺のアミラーゼ産生や増殖を抑制すること、そして肝においては肝再生時に肝実質細胞からアクチビンAがオートクリンされ、自身の増殖を抑制するように作用することを明らかにした。

第2章 暁ラ氏非B細胞に存在するアクチビンAの免疫活性

はじめに

これまで筆者らのグループの検討によりアクチビンAをin vivoにおいてマウスの腹腔内に投与すると長時間にわたり低血糖が起こることが明らかになっていった。アクチビンと糖代謝になんらかの関連が予想され、そしてラット単離ラ氏島のインキュベーション系でアクチビンAがインスリン分泌を促進すること(17)、更にラット遊離肝細胞系の糖原分解を促進すること(18)が明らかになった。このようなアクチビンのin vitroでの明瞭な作用にかかわらず、実際に生理的因子として局所に存在して作用しているのかは全く不明であった。そこで本章ではラット暁ラ氏島にアクチビンAが存在するかどうかを免疫組織化学的に検討した。更にラ氏島のインキュベーションより更に感度の良い系である、ラ氏島のペリフェュージョン系でアクチビンAのインスリン分泌への作用について検討した。そしてラット暁ラ氏島非B細胞にアクチビンAの免疫活性が存在することを明らかにした。

材料および方法

材料: ヒトアクチビンAは既報のごとくTHP細胞の上清から精製したものを(19)味の素中央研究所江藤譲博士より御供与を受けた。抗アクチビンA抗体は精製アクチビンAで白兔を免疫して作製したものを江藤博士より御供与を受けた。抗アクチビンA抗体のインヒビン各サブユニットとの交差性はウエスタンブロット法(20)により検定した。ウシインヒビン(32kD)およびヤギ抗ウシインヒビン抗体は群馬大学産婦人科長谷川喜久博士より御供与を受けた。本抗体はウエスタンブロット法ではインヒビンAおよびインヒビン α サブユニットと反応するが、インヒビン β_A サブユニットのモノマーおよびダイマーとは反応はみられなかった。

免疫組織化学: 6-8週齢のウイスター系雄ラットをエーテル麻酔下に断頭した。実験によってはコルヒチン(0.5mg/100g体重)を断頭24時間前に腹腔内に投与した。脾を取り出し、Bouin-Holland液で一晩固定した。そしてエタノール系列で脱水しキシレンで洗浄後、パラフィンに包埋した。4 μ m厚の切片を作製し1:2000-4000に希釈した抗アクチビンAあるいはインヒビン抗体と一晩反応させた。吸収試験のため各抗体と各タンパク(8-10 μ M)と4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。Biotin-Avidin法(Vector社のキットに

よる)により免疫組織化学を行い(21)Diaminobenzidineにより発色した。免疫電顕においては標本を30分間、1/15Mのリン酸緩衝液で溶解した2%パラホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒド、1%ピクリン酸液で固定後、四酸化オスミウムで30分間、後固定しエタノール配列で脱水した。脱水後、エポン/アラルダイト複合体に包埋した。超薄切片を作製し免疫電顕を抗ウサギヤギIgGでラベルした径5-15nmの金コロイドを用いて(22)包埋後法により行った。アクチビンとグルカゴンあるいはアクチビンとソマトスタチンに対する二重染色法では超薄切片のそれぞれの面に各一次抗体と5あるいは15nmの異なる大きさの金コロイド粒子でラベルした二次抗体を用いて行った。

Reverse transcription-polymerase chain reaction法によるインヒピン各サブユニットのmRNAの解析：総RNAはAcid-guanidine phenol chlorophorm法(23)で抽出した。cDNAはoligo-dT Latex粒子(宝酒造製)により精製したpoly(A)RNAからMoloney murine白血病ウイルス逆転写酵素で作製した。ゲノムDNAの混入をみるために逆転写非使用群をコントロールとして用いた。生成されたcDNAの十分の一量をPCR反応の鋳型とした。プライマーはラットインヒピン各サブユニットのシークエンス(24)をもとに作製した。インヒピン α サブユニットのVal¹²⁷からPro³²²の586塩基を挟んでセンスプライマーとして、5'-TGACTTCAGCCCAGCTGTGG-3'またアンチセンスプライマーとして5'-GGCACCAAAAACAGGGGCTG-3'を、インヒピン β_A に対してはGlu²⁴⁵からLeu³⁸⁵の423塩基を挟んで5'-GAACAGTGCCAGGAGAGCGG-3'をセンスプライマーとして、5'-AGGTTGGCAAAGGGGCTGTG-3'をアンチセンスプライマーとして、インヒピン β_B に対してはVal²⁴⁰からAsu³⁴⁹の330塩基を挟んで5'-GTGGTGCCTGTTTCGTGGA-3'をセンスプライマーとして、5'-TTCACCGGCCAGGGTTCAG-3'をアンチセンスプライマーとして用いた。PCRは94°C 1分、60°C 1分、72°C 1分で30サイクル施行した。PCR産物は2%アガロースゲルに電気泳動し、エチジンプロマイドで染色した。

単離腓ラ氏島ペリフュージョン系によるインスリン分泌反応：腓ラ氏島は体重200gのウイスター系雄性ラットよりLacyとKostianovskiの方法(25)によってコラゲナーゼにより分離して得た。ラ氏島をHanks液に浮遊させZawalichの方法(26)によりペリフュージョンを行った。それぞれ20個のラ氏島をMillipore社製チェンバー内のナイロンフィルター上に支持し1ml/分の流量で115mM NaCl、5mM KCl、1.2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、5mM

NaHCO₃、20mM HEPES、2.8mMブドウ糖および1.7%BSAを含む溶液を95% O₂と5%CO₂で平衡させペリフュージョンした。インスリンはラットインスリンをスタンダードとして測定した。

結 果

抗アクチビンA抗体の特異性を評価するために還元および非還元の条件下にインヒビンAとアクチビンAに対するウエスタンブロット解析を行った。図1-1に示すように抗アクチビンA抗体は β_A サブユニットのモノマーおよびダイマーを認識した。重要なことに本抗体は α - β_A サブユニットのヘテロダイマーであるインヒビンAとは非還元条件では反応しなかった。

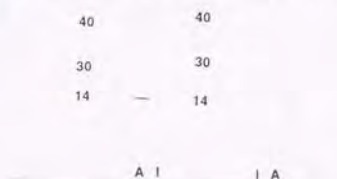


図1-1 抗アクチビンA抗体の特異性をウエスタンブロットで解析した。1 μ gのアクチビンAあるいはインヒビンAを還元(左)および非還元条件で泳動した。A:アクチビンA、I:インヒビンA。

本抗体によってラット臍ラ氏島に強いアクチビンAの免疫活性が得られた(図1-2)。免疫活性は全てのラ氏島で同様に認められたが、膵腺房部には認められなかった。本抗体をあらかじめ過剰量の精製アクチビンAと4℃で一晩、吸収反応させた後、免疫組織化学を行うと、アクチビンAの免疫活性の著しい減弱がみられ、抗体を更に高濃度の精製アクチビンAと吸収反応させると免疫反応は全く認められなくなった。一方、本抗体をウシインヒビンで吸収試験を行っても免疫活性には全く影響は見られなかった。同様にTGF- β 、グルカゴンで吸収試験を行っても免疫染色になんら影響はみられなかった。アクチビンAの免疫活性はラ氏島の辺縁部の細胞の細胞質に認められた。更に詳細を検討するため免疫電顕を行った。免疫電顕ではアクチビンA免疫活性はA細胞の分泌顆粒内に認められた(図1-3)。この免疫活性は過剰のアクチビンAでほぼ完全に吸収された。またD細胞分泌顆粒内にもアクチビンA免疫活性が認められたが、分泌顆粒上の金コロイド粒子はA細胞のものよりも少なかった。一方、B細胞に

はアクチビンAの免疫活性は認められなかった。これらの所見は5 nmと15nMの異なる大きさの金コロイド粒子を用いた二重染色法で更に確認された(図1-4)。A細胞ではアクチビンAとグルカゴンは同一分泌顆粒上に免疫活性が存在した。D細胞においてもアクチビンAとソマトスタチンは同一分泌顆粒上に存在した(図1-5)。抗ウシインヒビン抗体では通常の条件ではラット睪ラ氏島に何ら免疫活性は得られなかった。しかしコルヒチン(0.5mg/100g体重)の前投与によりラ氏島全体が抗インヒビン抗体によって淡く染色された(図1-6)。

どのインヒビンの各サブユニットがラ氏島に存在するかを知るために、RT-PCR法によりインヒビン各サブユニットmRNAの発現を検討した。mRNAは単離ラ氏島より抽出し、逆転写酵素により、cDNAを作成した。図1-7に示すように、 β_A サブユニットに対するmRNAは検出されたが β_B サブユニットに対するものは検出されなかった。更に α サブユニットに対するmRNAも検出された。睪外分泌部にはこれらインヒビン各サブユニットmRNAは検出されなかった。



図1-7 インヒビン各サブユニットmRNAのRT-PCR法による解析。RNAは100個の単離ラ氏島より精製した。

睪ラ氏島をアクチビンAと共にインキュベーションするとインスリン分泌が促進される。そこで内因性に存在するアクチビンAの影響がより少ない系であるラ氏島のペリフェュージョン系でアクチビンAのインスリン分泌に及ぼす効果を再検討した。図1-8に示すようにアクチビンAは2.8mMブドウ糖存在下でインスリン分泌を促進した。この促進効果は0.1nMの濃度のアクチビンAでも観察された。0.1から10nMの間の濃度においてアクチビンAは二相性のインスリン分泌を惹起した。この第一相ピークは開始5分

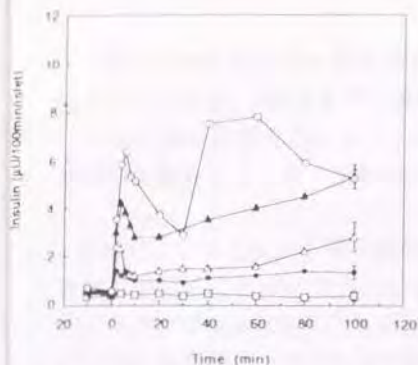


図1-8 アクチビンAのペリフェーション系のインスリン分泌への影響。ラ氏島を2.8mMブドウ糖存在下でペリフェーションした。各濃度のアクチビンAを100分間にわたり加えた。測定値は平均±SE、(n=4)。□、無添加；●、0.1nMアクチビンA；△、1nMアクチビンA；▲、10nMアクチビンA；○、50nMアクチビンA。

後にみられた。そして第二相はその後次第に上昇した。両相ともピークは用量依存性に大きくなった。50nMのアクチビンAでは30分後に第二相のピークがみられた。このようにラ氏島のインキュベーションよりもペリフェーションの方がより高感度であった。

次にブドウ糖によって誘導されるインスリン分泌に対するアクチビンAの作用を検討した。各濃度のブドウ糖存在下にペリフェーションを行い、50pMのアクチビンAの有無により100分間に分泌されたインスリン総量を検討した。図1-9に示すように50pMのアクチビンAの作用は2.8mMブドウ糖存在下で明らかになった。ブドウ糖によって惹起されるインスリン分泌は50pMのアクチビンAによって大きく促進された。この促進効果はブドウ糖の濃度が5.5mM以上で顕著であった。

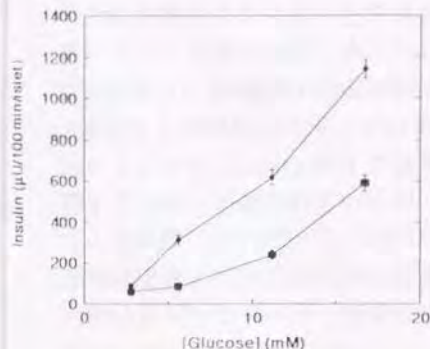


図1-9 ブドウ糖によるインスリン分泌に対するアクチビンAの作用。ラ氏島を種々の濃度のブドウ糖とともに50pMのアクチビンA存在下(●)、あるいは非存在下(■)でペリフェーションした。100分間のインスリン分泌総量をプロットした。測定値は平均±SE、(n=4)で*は $p < 0.01$ を表わす。Student's tテストで検定した。

ある種のアクチビンの作用はインヒピンによって打ち消されることが知られているが、10nMまでの濃度のインヒピンAはそれ自身ではインスリン分泌に何ら影響を及ぼさず、またアクチピンAによるインスリン分泌促進作用に何ら影響を与えなかった。

考 案

本研究によってラット膵ラ氏島のAおよびB細胞にアクチピンAの免疫活性が存在することが示された。超微形態的にはそれぞれの細胞の分泌顆粒内にアクチピンAの免疫活性が存在した。アクチピンAの免疫活性はあらかじめ抗体を精製アクチピンAで吸収すると消失した。しかしインヒピンAやTGF- β 、グルカゴンによっては免疫活性は吸収されなかった。このことから本検討で用いた抗体はアクチピンAは認識するがインヒピンAは認識しないと考えられた。インヒピン各サブユニットのmRNAに対するRT-PCR法による解析では β_A サブユニットのmRNAはラット膵ラ氏島に発現していたが β_B サブユニットmRNAは認められなかった。これらの結果からラットラ氏島のアクチピンは β_A サブユニットの二量体であるアクチピンAでありアクチピンBやアクチピンABではないと考えられた。しかしながらインヒピン α サブユニットに対するmRNAもラ氏島に発現が認められ、ラ氏島にはインヒピンAもまた存在すると考えられた。これはコルヒチンによって前処置したラットラ氏島全体に弱いインヒピンの免疫活性が存在することによって、免疫組織化学的にも確認された。コルヒチンで処理したラットのみでインヒピンの免疫活性が認められたことから、ラット膵ラ氏島のインヒピンはその量が非常に少ないか、あるいはconstitutive pathwayを介して分泌されているものと考えられた。最近、Robertsらは(27)ラット下垂体前葉細胞の分泌顆粒にインヒピン各サブユニット免疫活性が存在することを報告しているが、下垂体細胞でみられたように膵ラ氏島においてもアクチピンAがA細胞およびD細胞の分泌顆粒内に存在していた。このことからアクチピンAは何らかの刺激に応じて分泌されるものと考えられた。性腺下垂体以外にもインヒピンの α および β サブユニットはこれまで副腎、神経系、骨髄でその存在が知られているが、膵での存在は明らかでなかった。本研究によれば膵ではインヒピンおよびアクチピンはラ氏島のみ存在していた。膵外分泌部と比べてラ氏島は非常に小さく、これまでの膵全体から抽出したRNAを用いたノーザン解析による報告(11)では膵にはインヒピンやアクチピンのmRNAが検出されなかったものと考えられる。

本研究でアクチビンAがインスリン分泌を促進することが示された。単純に解釈するとラ氏島においてアクチビンAが生理的なインスリン分泌制御因子であると予想される。しかしラ氏島の血流は初めにB細胞を灌流しアクチビンが存在するA細胞とD細胞はその下流に位置しているとされる(28)。B細胞-A細胞-D細胞という流れの順番は普遍的なものと考えられており、B細胞はその下流に位置するグルカゴンやソマトスタチンによって少なくとも血流を介しては全く影響されないとされ、アクチビンにおいても同様と考えられる。しかしながらアクチビンは性腺下垂体を含めて大部分の標的細胞でバラクリン因子として作用しており、ラ氏島においてもアクチビンAがインスリン分泌刺激因子として作用している可能性はなお否定できないと考えられる。

なおアクチビンAはインスリンの分泌に対しては抑制的に作用するソマトスタチンと同一分泌顆粒内に共存することも免疫組織化学的に明らかになった。その生理的意義についてはラ氏島だけでなく膵腺房部への作用についても考えなければならぬと思われる。

アクチビンAのラ氏島に対する作用で大変興味深いのは、2.8mMという比較的低いブドウ糖濃度でも二相性のインスリン分泌を惹起したことである。CCKやGIP、GLP、アセチルコリンなどのいわゆるインクレチン類はこのような低ブドウ糖濃度でインスリン分泌を促進せず、非栄養素性物質ではこれまでこのような作用は報告されていない。これはブドウ糖や一部のアミノ酸などの、いわゆるprimary stimulatorに近い作用であり、この点においてアクチビンAは非常にユニークなインスリン分泌刺激物質であると考えられる。アクチビンAがインスリン分泌を起す機序について考えてみると、高野ら(29)がFSH産生性下垂体腫瘍でのアクチビンAの作用の報告が興味深い。この細胞においてアクチビンAはFSHの産生を促進するが、また細胞内カルシウム濃度もカルシウム流入を介して上昇させる。このカルシウム流入はジヒドロピリジン系カルシウムチャネル阻害剤によってブロックされる。ラ氏島においてもアクチビンAが電位依存性カルシウムチャネルを活性化させている可能性が考えられる。

アクチビン受容体は膵の下流にあたる肝においても豊富に発現していることが報告されている(12)。アクチビンAとグルカゴン、あるいはソマトスタチンは同一分泌顆粒に存在しており、それぞれ同時に門脈系に放出されていると考えられる。実際、ラット門脈血中のアクチビン活性を測定して

みると非常に高い活性が認められる。こうしたことから臍ラ氏島に存在するアクチビンAはインスリン分泌を促進するだけでなく、その下流にあたる膵腺房部や肝へ何らかの作用をもたらしている可能性があり、次章以降において検討することにする。

第3章 アクチビンAは膵腺房細胞の増殖とアミラーゼ合成を抑制する

はじめに

前章でアクチビンAがラット膵ラ氏島非B細胞分泌顆粒中に存在することを明らかにした。これは、ある条件下でラ氏島よりアクチビンAが放出されることを示唆する。ラ氏島と膵腺房間には一種の門脈系が存在することが知られており(30)、高濃度のラ氏島のホルモンが腺房部に流入している。このことから「ラ氏島-腺房連関 (islet-acinar interaction)」の存在が想定されており、これを支持する実験結果としてインスリンがアミラーゼの分泌やmRNAレベルに影響を与え、また膵腺房の増殖促進作用を有することが知られている(31)。これはアクチビンAもまた他のラ氏島ホルモン同様に膵腺房機能に何らかの影響を与えている可能性があることを示唆する。序論で述べた様に、アクチビンは種々の細胞系の機能を制御することが知られている。そこで本章ではアクチビンAが膵腺房の増殖や分化に影響を与えるかどうかを検討した。このために遊離ラット膵腺房とラット膵腺房由来細胞株であるAR42J細胞(32)を用いた。本細胞株は化学発癌によるラット膵腺房癌から得られたもので、分泌顆粒を有し、CCKやカルバコール、ボンベシン、インスリンなどの刺激でアミラーゼを分泌し、またインスリン、ガストリン、EGFなどで増殖が促進されるなど種々の点で膵腺房細胞の特徴を有しており、広く膵腺房研究に用いられている。AR42J細胞はデキサメサゾン処理で更に膵腺房様に分化する(33)。こうしたことからAR42J細胞は膵腺房の増殖や分化を検討する場合に良い系であると考えられる。本章ではアクチビンAがAR42J細胞の増殖やアミラーゼ合成、分泌顆粒形成を強力に抑制することが明らかになった。

材料および方法

材料: コレシストキニン(CCK)-8はペプチド研究所より購入した。 ^3H チミン(6.7 Ci/mmol)はNew England Nuclear社製を購入した。

細胞培養: AR42J細胞は群馬大学生体調節研究所竹内利行教授より御供与をうけた。AR42J細胞は20mMのHEPES/NaOH(pH7.4)、5mMの NaHCO_3 と10%のウシ胎児血清(FCS)を含むダルベッコ変法培地(DMEM)中で37°Cで培養した。アミラーゼ分泌および濃度を測定する実験では24穴プラスチックディッシュに $4 \times 10^5/\text{ml}$ の密度でデキサメサゾンあるいはアクチビンAを加

えて細胞を培養した。

DNA合成の測定：DNA合成は、 ^3H チミジンのトリクロロ酢酸不可溶分画への取り込みを指標に測定した。細胞は48時間、アクチビンA存在下に培養し、更に48時間目から2時間、 $0.5\ \mu\text{Ci/ml}$ の ^3H チミジンとともに培養した。 ^3H チミジンの取り込みはMcNielらの方法(34)で測定した。それぞれの測定結果はBradfordの方法(35)で測定した各ウエルのタンパク量で補正した。

アミラーゼ放出の測定：CCK-8刺激によるアミラーゼ放出の測定では、まず細胞をHEPESで緩衝したハンクス液(pH 7.4)で洗浄後、 37°C で40分間、前述のハンクス液でCCK-8とともにインキュベートし各ウエル中のアミラーゼ活性を測定した。アミラーゼ活性はヨードデンプン反応によりアミラーゼテストワコー（和光純薬製）を用いて比色定量した。アミラーゼ活性はCaraway単位で表示した(36)。

アミラーゼ含量の測定：細胞内アミラーゼ含量の測定は、細胞を 4°C のリン酸緩衝食塩水(PBS)で二回洗浄後、 $1\ \text{ml}$ の $50\ \text{mM}$ NaH_2PO_4 と $50\ \text{mM}$ の NaCl (pH6.9)を含む溶液中でディッシュより剥ぎとり 4°C で30秒間プローブ型超音波粉碎器で破壊し、前述の方法でアミラーゼ濃度を測定した。

電子顕微鏡観察：細胞を $6\ \text{cm}$ 径のプラスチックディッシュで48時間、 $1\ \text{nM}$ のデキサメサゾンあるいは $1\ \text{nM}$ のアクチビンAの存在下に培養した。そして細胞を 4°C の 2.5% グルタルアルデヒドを含む $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液(pH7.4)で1時間固定した。そして $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液で洗浄後、 1% 四酸化オスミウムを含む 4°C の $0.1\ \text{M}$ リン酸緩衝液で1時間後固定した。リン酸緩衝液で細胞を洗浄した後、エッペンドルフチューブ内に細胞を集め、アガロースに包埋した。そしてエタノール系列で脱水後、酸化プロピレンで濾過し、エポンノアルダイト複合体で包埋した。超薄切片を作製し、JEM 1200型装置を用いて電顕観察を行った。

ラット膵腺房の作製：ラット膵腺房はHootmanらの方法(37, 38)によってコラゲナーゼを用いて作製した。腺房はKrebs-Ringer重炭酸緩衝液で30分間、インキュベートし、培地中に放出されたアミラーゼ活性を測定した。アミラーゼ分泌は腺房に含まれる総アミラーゼ活性との比で表わした。

アクチビンAのヨード化と結合実験： $10\ \mu\text{g}$ のアクチビンAをVolton-Hunter法(37)により $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ で特異活性が $50\text{-}90\ \mu\text{Ci/mg}$ となるようにヨード化した。 $[^{125}\text{I}]$ アクチビンAはSephadex G-25カラムで 1% ウシアルブミン含有リン酸緩衝液(pH 7.4)中に精製した。結合実験は $35\ \text{mm}$ コラーゲンコートディッシュ

シュに 1×10^5 /mlの濃度で細胞を蒔いた。細胞がディッシュに接着した後、50 mM Hepaes (pH 7.4)、128mM NaCl、5mM KCl、1.2mM CaCl₂、5mM MgSO₄および0.5% BSAを含む結合実験用バッファーで37℃で30分間、培養後、4℃で¹²⁵I]アクチビンAを含む結合実験用バッファーで放射性ラベルしていないそれぞれのアゴニスト存在下あるいは非存在下で4時間培養した。そし氷冷したバッファーで4回洗浄し1% Triton X-100溶液で細胞を可溶化しカウントした。

結 果

デキサメサゾン処理AR42J細胞のアミラーゼ分泌に対するアクチビンAの効果：AR42J細胞においてデキサメサゾンは分化を誘導し、分泌顆粒数とアミラーゼmRNAを増加させる(33)。グルココルチコイド処理細胞はアゴニスト刺激に応じてアミラーゼを分泌する。デキサメサゾンで48時間前処理すると用量依存性に細胞のアミラーゼ含量は増加し、1nMで最大効果が得られた。そこで1nMのデキサメサゾンで48時間前処理した細胞を用いてアミラーゼ分泌を測定した。デキサメサゾン処理細胞でCCK-8は用量依存性にアミラーゼ放出を刺激し、1nMで最大効果が得られた。アクチビンAはデキサメサゾン処理細胞では、単独ではアミラーゼ基礎分泌に変化を与えず、またCCK-8で刺激されるアミラーゼ分泌に有意な影響を与えなかった。次に遊離ラット膵腺房に対するアクチビンAの作用を検討した。アクチビンAはラット膵腺房に対し単独ではアミラーゼ分泌を刺激せず、またCCKによって刺激されるアミラーゼ分泌に有意な変化を及ぼさなかった(表2-1)。

Addition	Amylase (%)	
	none	actvin A
none	2.7±0.45	3.4±0.12
CCK-8	26.4±0.23	26.3±0.18

表2-1 アクチビンAとコレシストキニンのラット膵腺房のアミラーゼ分泌への影響。ラット膵腺房を100pMのCCK-8および1nMのアクチビンAとともに30分間インキュベーションした。アミラーゼ分泌は膵腺房のアミラーゼ含量総量との比で示した。測定値は平均±SE、(n=3)。

アクチビンAのAR42J細胞アミラーゼ含量に対する作用：次にAR42J細胞のアミラーゼ含量に対するアクチビンAの効果を検討した。図2-1に示すように、アクチビンAをデキサメサゾンと共に加えるとアクチビンAはデキサメサゾンによるAR42J細胞のアミラーゼ含量増加を用量依存性に抑制した。最大効果は1nMのアクチビンAで得られ、その際デキサメサゾンの作用はほぼ完全に抑制された。デキサメサゾンを加えない場合もアクチビンAはAR42J細胞のアミラーゼ含量を減少させた。この作用はデキサメサゾン処理細胞と比べてより高いアクチビンA濃度を必要とし、0.1nMまではアミラーゼ含量には影響は認められなかった。これより高い濃度では用量依存性にアミラーゼ含量は減少し、10nMアクチビンAではアミラーゼ活性は認められなくなった。図2-2に1nMのデキサメサゾンによるアミラーゼ含量増加に対する1nMのアクチビンAの効果の時間経過を示した。デキサメサゾンによるアミラーゼ含量の増加は24時間以降で明らかになり、48時間後で最高となった。アクチビンA存在下ではデキサメサゾンの効果はほぼ完全に認められなくなった。

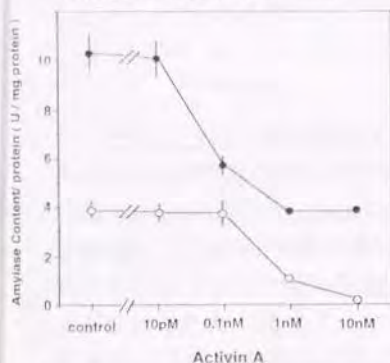


図2-1 アクチビンAのAR42J細胞のアミラーゼ含量に及ぼす影響。細胞を様々な濃度のアクチビンAと1nMデキサメサゾン存在下(●)、非存在下(○)に48時間培養した。細胞をDME培地で洗浄後、アミラーゼ含量を測定した。測定値は平均±SE。(n=4)。

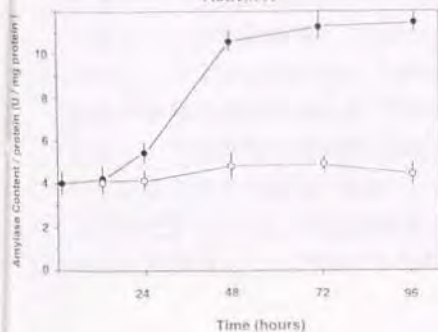


図2-2 デキサメサゾンによるアミラーゼ含量増加に対するアクチビンAの作用の時間経過。細胞を1nMのデキサメサゾンと1nMのアクチビンA存在下(○)、非存在下(●)に10%牛胎児血清含有DME培地で培養した。細胞を洗浄後、アミラーゼ含量を測定した。測定値は平均±SE。(n=4)。

アクチビンAのAR42J細胞のDNA合成に対する作用：アクチビンAは様々な種類の細胞の増殖に影響を与える。そこでアクチビンAのAR42J細胞のDNA合成に対する効果を検討した。図2-3に示すようにアクチビンAはAR42J細胞への ^3H チミジンの取り込みを強力に抑制した。その抑制効果は1pMのアクチビンAから明らかとなり最大効果は1nMで得られた。この濃度ではDNA合成は完全に抑制された。10nMのアクチビンA存在下で本細胞は明らかな細胞死を伴わずに少なくとも二週間以上、生存し続けることから、この増殖抑制作用は細胞障害によるものとは考え難かった。

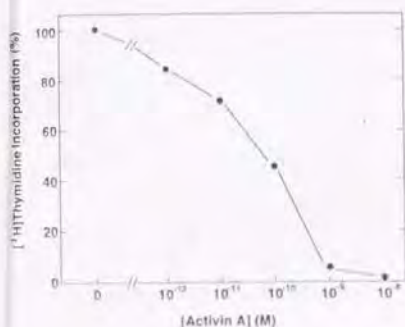


図2-3 アクチビンAのAR42J細胞のDNA合成に及ぼす効果。細胞を様々な濃度のアクチビンAとともに10%牛胎児血清含有DME培地で48時間培養後、0.5 μCi の ^3H チミジンを加え、更に2時間培養し ^3H チミジン取り込みを測定した。測定値は平均 \pm SE。(n=4)。エラーバーは●よりも小さい。

アクチビンAのAR42J細胞の超微形態に及ぼす効果：超微形態的には無処理のAR42J細胞は比較的未分化で、分泌顆粒はほとんど認められず、粗面小胞体(rER)は乏しい。Logsdonらが報告しているよう(33)にデキサメサゾン処理によりAR42J細胞の細胞内小器官には著明な変化が認められた。1nMのデキサメサゾンと48時間細胞を培養すると、分泌顆粒の著増とrERの発達が認められた(図2-3)。これはLogsdonらが提唱している(33)、デキサメサゾンがAR42J細胞の分化を誘導しアミラーゼ合成を増加させるとする考えと一致する結果であった。AR42J細胞を1nMのデキサメサゾンと1nMのアクチビンAを共に加えて48時間培養すると、無処理細胞と比べて分泌顆粒の著明な増加は認められたが、大部分の分泌顆粒はライソゾームに貪食され、分泌顆粒が細胞膜と共に取り込まれた"crinophagy様小体"が観察された。またrERの発達は不良で、遊離リボソームが多く観察された。

^{125}I アクチビンAのAR42J細胞への結合： ^{125}I アクチビンAのAR42J細胞への結合を検討した。 ^{125}I アクチビンAはAR42J細胞に特異的に結合した(図

2-5)。Scatchard解析により解離定数(Kd)は 3×10^{-10} で総結合(B_{max})は23.9 fmol/mg・蛋白であった。 $[^{125}I]$ アクチビンAの特異的結合は非標識アクチビンAによって置き換えられたが、TGF- β とは全く競合しなかった。AR42J細胞を1 nMのデキサメサゾンとともに48時間培養すると $[^{125}I]$ アクチビンAの特異的結合は増加した。デキサメサゾン処理によりKdは 6×10^{-10} に、 B_{max} は66.1 fmol/mg・蛋白に増加しており、特異的結合の増加は結合部位の増加によると考えられた。

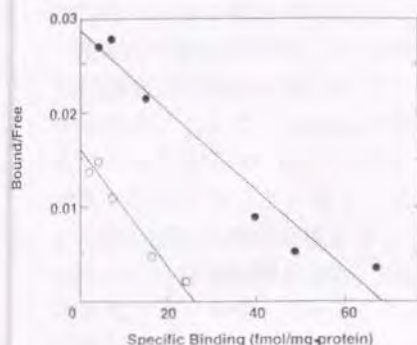


図2-5 AR42J細胞への $[^{125}I]$ アクチビンAの結合。細胞を1 nMデキサメサゾン存在下(●)、非存在下(○)に48時間培養した。様々な濃度での $[^{125}I]$ アクチビンAの特異的結合を測定し、結合のScatchard plotを示した。

考 案

本研究によってアクチビンAがラット膵腺房由来細胞株であるAR42J細胞のアミラーゼ含量とDNA合成を大きく減少させることが明らかになった。アクチビンAは単独に用いた場合でもデキサメサゾンと併用した場合でもAR42J細胞のアミラーゼ含量を減少させた。またアミラーゼ含量を減少させるだけでなく、超微形態観察によりアクチビンAは細胞内小器官を大きく変化させることが明らかになった。すなわちアミラーゼ含量減少は分泌顆粒のライソゾームによる貪食とタンパク合成装置である粗面小胞体の減少によって起こること考えられた。

アクチビンAはアミラーゼ含量を減少させるだけでなく、AR42J細胞の増殖を停止させた。アクチビンは様々な細胞の分化を誘導することが知られているが、本研究の結果はアクチビンAがAR42J細胞をデキサメサゾンとは異なる方向への分化を誘導している可能性を示唆している。すなわちデキサメサゾンはAR42J細胞を腺房細胞様への分化を誘導するが、アクチビンA

もまたAR42J細胞の分化状態を制御した結果、アミラーゼ含量が低下したと推論することができる。なおアクチビンAはAR42J細胞のアミラーゼ含量を減少させたが、デキサメサゾン処理後のAR42J細胞および遊離ラット膵腺房のアミラーゼ放出反応には有意な影響を与えなかった。既に分化し終り成熟した膵腺房へのアクチビンAの作用は本研究では明らかにならなかった。またアクチビンAのAR42J細胞のアミラーゼ含量に及ぼす影響を検討した用量曲線はデキサメサゾン処理前後で大きく変化が認められたが、その機序の一つとしてデキサメサゾンにより本細胞のアクチビンA結合部位が増加するためと考えられた。

膵腺房の増殖の研究はこれまで主にin vivoの系を使って行われていた。これは膵腺房の細胞培養系は確立されておらず、CCKなどによって増殖反応を示す系としてはLogsdonらがマウス膵腺房の初代培養細胞で報告しているもののみである(39, 40)ことによる。そこで本研究では膵外分泌腺の増殖を検討する一つのモデル系としてAR42J細胞を用いた。筆者らは予備的検討でAR42J細胞のDNA合成がインスリンやCCK、EGFによって大きく促進されるという結果を得ており、これはLogsdonらのマウス膵腺房初代培養系での結果と良く相関していた。これまで膵腺房の増殖を抑制する因子は十分な検討は成されていなかった。ソマトスタチンをin vivoで投与すると膵腺房の増殖が抑制されることが報告されているが、これはソマトスタチンが直接、膵腺房細胞に作用しているのではなく、ソマトスタチンがインスリンやCCKの分泌を抑制することで間接的に作用していると考えられているが(40, 41)、一方でソマトスタチンがAR42J細胞の増殖を抑制するとする報告もある(42)。本研究でアクチビンAがAR42J細胞のDNA合成を強力に抑制することが明らかになり、生理的な膵腺房増殖抑制因子である可能性が示された。またLogsdonらは前述のマウス膵腺房細胞で、TGF- β がオートクリンの膵腺房増殖抑制因子であると報告しており(43)、膵腺房の増殖はアクチビンAとTGF- β という二つのTGF- β 遺伝子ファミリーに属する因子によって制御されている可能性があり、次章で述べる肝細胞における両者の作用と比べると興味深い。

前章で臈ラ氏島でアクチビンAの免疫活性がA細胞とD細胞の分泌顆粒内に存在し、それぞれゲルカゴンとソマトスタチンと共存していることを示した。ソマトスタチンはアミラーゼ分泌と膵腺房増殖を抑制するが、D細胞の分泌顆粒内に存在するアクチビンAとソマトスタチンがある種の状態

で放出され、直接あるいは間接的に膵外分泌機能を制御している可能性が示唆された。またA細胞ではアクチビンAはグルカゴンと共存している。このことから空腹時に放出されるグルカゴンと共にアクチビンAもA細胞から放出され、膵外分泌機能に何らかの影響を与えていると考えられる。

アクチビンAのAR42J細胞への作用は、下垂体の成長ホルモン(GH)産生細胞で観察された作用と類似している(44)。アクチビンはGH産生細胞のGH産生とDNA合成を抑制する。もともとFSH分泌刺激因子として分離されたアクチビンであるが、膵においてもラ氏島に実際に存在し、局所因子としてラ氏島や腺房の機能を制御している可能性が示された。

第4章 アクチビンAはラット培養肝細胞のオートクリン増殖抑制因子である

はじめに

ラット遊離肝細胞はアクチビンAによってブドウ糖を放出することが明らかになっており(18)、肝実質細胞もまたアクチビンAの標的臓器である可能性がある。前章までに検討したように、臍ラ氏島にアクチビンAが存在し、その下流にあたる臍腺房部にも作用を及ぼしている可能性が示された。そこで本章ではラ氏島の更に下流にあたる肝細胞の増殖に及ぼすアクチビンAの作用を検討した。ラット初代培養肝細胞系において、アクチビンと同じ遺伝子ファミリーに属するTGF- β が強力な増殖抑制因子であることが示されている(45)。肝再生時にはTGF- β mRNAが肝非実質細胞で発現する(46)。不活性型のTGF- β が肝非実質細胞から分泌されると考えられており、その活性化機構は完全には明らかにはなっていないが、バラクリン機序で肝細胞増殖を抑制していると考えられている。アクチビンAは様々な細胞系の増殖や分化を制御することが報告されており、前述の如く肝細胞はアクチビンの受容系を備えていることから、アクチビンAが肝細胞の増殖を制御している可能性がある。本章ではラット初代培養肝細胞のDNA合成に及ぼすアクチビンAの効果を検討し、アクチビンAがその増殖を強力に抑制することが明らかにした。更にアクチビンAが上皮細胞増殖因子(EGF)や肝細胞増殖因子(HGF)による増殖刺激によって肝細胞自身より分泌され、オートクリン増殖抑制因子として肝細胞増殖制御に重要な役割を演じていることを明らかにした。

材料および方法

材料: ヒト組み換え型TGF- β 1はキング醸造製を購入した。HGFは大阪大学医学部中村敏一教授より御供与を受けた。マウスEGFはCollaborative Research社より購入した。 $[^{32}\text{P}]\text{UTP}$ 、 $[^{125}\text{I}]\text{TGF-}\beta$ はDupont New England Nuclear社より購入した。ラットインヒピン各サブユニットに対するcDNAはソーク研究所のLing博士より御供与を受けた。

肝切除ラットおよび肝細胞培養: ラット肝実質細胞の分散はBerryとFriendの方法(44)によった。細胞はコラーゲンコートした24穴プラスチックディッシュに 5×10^4 /mlの密度で5%仔牛血清、10nMインスリン、1 nMデ

キサメサゾン、ペニシリン、ストレプトマイシンを含有するWilliams' E培地で蒔いた。3時間後、細胞を洗浄した後、0.1%ウシアルブミン、0.1 μ M インスリン、EGF (1 nM) あるいはHGF (10ng/ml) を含む無血清培地に交換した。肝非実質細胞分画はShimaokaらの方法(48)によって培養した。

DNA合成の測定：DNA合成は前節同様、 ^3H チミジンのトリクロロ酢酸不可溶分画への取り込みを指標に測定した。Faustoらの方法(49)に準じて肝細胞は各増殖因子とともに無血清で72時間培養を行い、48時間目から72時間目まで0.5 μ Ci/mlの ^3H チミジンとともに培養した。72時間目に ^3H チミジンの取り込みを測定した。核ラベリング係数は、細胞をbromodeoxyuridine (BrdU) とともに無血清培養開始後、48時間目から72時間目まで培養し、抗BrdU抗体によってラベルされた核を染色して求めた。

アクチビンAのヨード化と結合実験：10 μ gのアクチビンAをVolton-Hunter法(37)によりNa ^{125}I で特異活性が50-90 μ Ci/mgとなるようにヨード化した。 ^{125}I アクチビンAはSephadex G-25カラムで1%ウシアルブミン含有リン酸緩衝液(pH 7.4)中に精製した。結合実験は35mmコラーゲンコートディッシュに 2×10^4 /mlの濃度で細胞を蒔いた。細胞がディッシュに接着した後、50 mM Hepaes (pH 7.4)、128mM NaCl、5mM KCl、1.2mM CaCl $_2$ 、5mM MgSO $_4$ および0.5% BSAを含む結合実験用バッファーで37°Cで30分間、培養後、4°Cで ^{125}I TGF- β あるいは ^{125}I アクチビンAを含む結合実験用バッファーで放射性ラベルしていないそれぞれのアゴニスト存在下あるいは非存在下で4時間培養した。そして氷冷したバッファーで4回洗浄し1% Triton X-100溶液で細胞を可溶化しカウントした。

アクチビンA生物活性の測定：アクチビンA生物活性はマウス赤白血病の分化誘導能を指標に測定した(50)。マウス赤白血病細胞(F5-5細胞)を既知量のアクチビンAあるいは段階的に希釈したサンプルと5日間培養した。赤白血病細胞の分化はジアニシチンでヘモグロビンで染色された細胞数を測定した。この分化誘導能がアクチビンによるかは、アクチビン特異的結合蛋白であるフォリスタチンの添加で、その作用がブロックされるか(14)を確認した。

インヒビン β_A サブユニットmRNAの測定：リボスクレアーゼ(RNase)プロテクションアッセイを施行した。まずラットインヒビン β_A サブユニットをpGEM 7Zi(-)プラスミドにサブクローニングし、Pst Iで直線化した。そしてT7 RNAポリメラーゼで384塩基より成る ^{32}P UTPでラベルしたリボプロ-

ブを作製した。これはインヒビン β_A サブユニットmRNAと相補的な341塩基とpGEM 7Zf(-)と相補的な43塩基から成っている。鋳型DNAを5 μ gのDNase Iを加え37°Cで30分消化し、エタノール沈殿でリボプローブを回収した。総RNAは培養肝細胞あるいはラット肝よりAGPC法で抽出した。RNaseプロテクションアッセイはRPA II kit (Ambion社製)を用いて施行した。各々10 μ gの総RNAと5 $\times 10^5$ cpmの³²Pでラベルしたリボプローブを45°Cで16時間インキュベーション後、RNase I/RNase T1混合液で37°Cで30分消化した。ハイブリダイズし消化されなかったRNAハイブリッドをエタノール沈殿で回収し、30%ポリアクリルアミド/8M尿素ゲルで展開、乾燥後、Kodak XAR-2フィルムでオートラジオグラフィを行った。

結果

ラット初代培養肝細胞に対するアクチビンAのDNA合成に対する効果：インスリン存在下にEGFと共に肝細胞を培養すると³Hチミジンの取り込みは10-15倍に増加した。5 nMのアクチビンAはほぼ完全にEGFによって誘導されるDNA合成をほぼ完全に抑制し、それは10pMのTGF- β の作用にほぼ匹敵した。ある種のアクチビンの作用はインヒビンによってブロックされることが知られているので、インヒビンAがアクチビンAによる肝細胞増殖抑制作用をブロックするかどうかを検討してみた。50nMまでの濃度のインヒビンAは、それ単独では肝細胞のDNA合成には何ら影響を及ぼさず、またアクチビンAによる肝細胞増殖抑制作用にも何ら影響を与えなかった。ア

Addition	Nucleic labeling (%)	[³ H]Thymidine incorporation <i>cpm</i> $\times 10^{-4}$ / cell
None	4.3 \pm 1.2	0.11 \pm 0.02
EGF	47.0 \pm 5.4	2.05 \pm 0.12
+ Activin A (1 nM)	9.4 \pm 0.9	0.25 \pm 0.09
+ TGF- β (0.1 nM)	1.8 \pm 0.2	0.12 \pm 0.02
HGF/scatter factor	31.0 \pm 6.5	1.45 \pm 0.10
+ Activin A (1 nM)	2.9 \pm 0.2	0.10 \pm 0.01

表3-1 アクチビンAのEGFおよびHGFによって誘導されるDNA合成への影響。肝細胞を0.1%BSA、0.1 μ Mインスリンおよび上記の増殖因子とともに72時間培養した。測定値は平均 \pm SE、(n=4)。

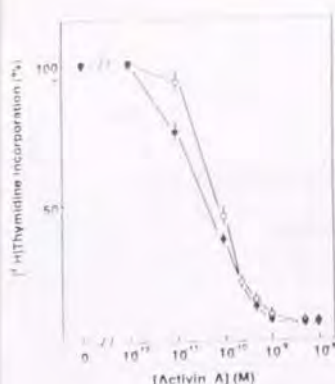


図3-1 アクチビンAのEGFおよびHGFによって誘導されるDNA合成への効果の用量曲線。肝細胞を1nMのEGF (□) または10ng/mlのHGF (●) および0.1 μ Mインスリン、各種濃度のアクチビンAとともに72時間培養した。内Hチミジン³Hを採時間日に添加し、72時間日に内Hチミジン取り込みを測定した。測定値は平均 \pm SE。(n=4)

クチビンAによる増殖抑制作用は用量依存性で、0.1nMより作用が認められ、5nMで最高となった。5nMの濃度では³Hチミジンの取り込みは5%まで減少した。肝細胞をHGFと共に培養するとDNA合成は約6倍となった。アクチビンAはHGFによって誘導される肝細胞増殖もまた抑制した。図3-1に示すようにアクチビンAは用量依存性にHGFの作用を抑制した。EGFによって誘導されたDNA合成と比べてHGFによるものの方がアクチビンAによる抑制効果はやや強力であった。10pMのアクチビンAによっても抑制効果が観察され、0.1nMではDNA合成は約50%となった。ラベリング係数でみると(表3-1)、1nMのEGFで47.0 \pm 5.4% (平均 \pm 標準誤差、n=4)の細胞の核がラベルされた。1nMのアクチビンAによって表に示す様に、ラベリング係数は9.4 \pm 0.9%まで減少した。10ng/mlのHGFで31.0 \pm 6.5%の細胞核がラベルされたが、これは1nMのアクチビンAによって2.9 \pm 0.2%に減少した。EGFやHGFなどの増殖促進因子を加えずにアクチビンAのみを加えても、DNA合成には何ら影響を与えなかった。アクチビンA結合蛋白であるフォリスタチンはアクチビンAと等モルで結合しアクチビンの作用をブロックすることが知られているが、1nMのアクチビンAと共に同モルのフォリスタチンを加えると、アクチビンAによる増殖抑制効果は観察されなくなった。

EGFによるDNA合成に対するアクチビンAの抑制作用の時間経過: EGFによるDNA合成はEGF添加48-72時間後に最高となった。G₁期を進行する肝細胞のどの時点でアクチビンAがDNA合成抑制作用を発揮するかを検討するために、EGFを添加後、アクチビンAを加える時間をいろいろと変えて

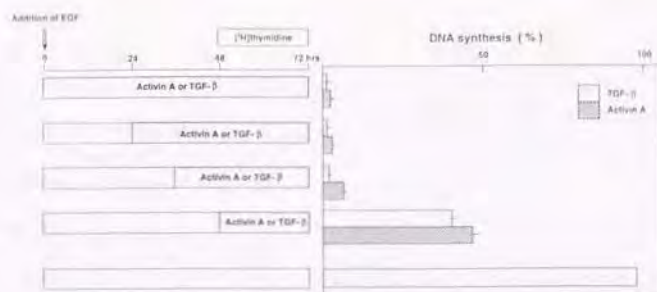


図3-2 EGFで誘導されるDNA合成を、様々な時点でアクチビンAあるいはTGF- β を加えて抑制率を検討した。測定値は平均 \pm SE、(n=4)。

DNA合成に与える影響をみてみた。アクチビンAの作用と比較するために、対照としてTGF- β を用いた。図3-2に示すようにEGF添加36時間後にアクチビンAを加えても、初めから加えた場合とほぼ同等の増殖抑制効果が観察された。48時間後に加えた場合、DNA合成抑制効果は約50%であった。時間経過はTGF- β のものと同じく似ており、TGF- β もEGF添加36時間後に加えてもほぼ完全なDNA合成抑制作用を示した。アクチビンAとTGF- β の作用点はG1期中期から後期に位置するものと考えられた。

アクチビンAおよびTGF- β の肝細胞への結合：上述のように肝細胞増殖に対するアクチビンAとTGF- β の作用は極めて似ていた。アクチビンAがTGF- β 受容体を介して肝細胞と結合しDNA合成を抑制している可能性もあるため放射性リガンドによる結合実験を行った。図3-3Aに $[^{125}\text{I}]$ TGF- β の肝細胞への特異的結合を示す。 $[^{125}\text{I}]$ TGF- β の肝細胞への結合は放射性ラベルしていないTGF- β によって用量依存性に阻害された。しかし10nMまでの濃度のアクチビンAは $[^{125}\text{I}]$ TGF- β の肝細胞への結合に全く影響しなかった。図3-3Bは $[^{125}\text{I}]$ アクチビンAの肝細胞への結合である。 $[^{125}\text{I}]$ アクチビンAの肝細胞への結合はラベルしていないアクチビンAによって用量依存性に阻害されたが、TGF- β によっては全く影響されなかった。

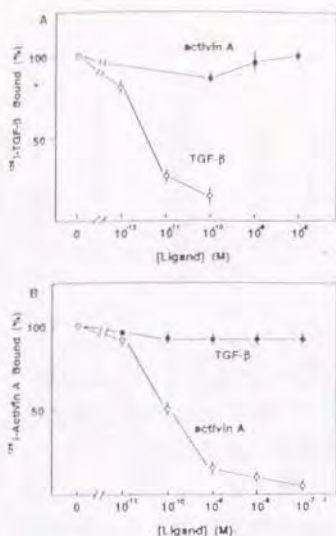


図3-3 ^{125}I アクチビンAおよび ^{125}I TGF- β の肝細胞への結合。肝細胞を ^{125}I TGF- β (A)あるいは ^{125}I アクチビンA(B)と3.5時間、4℃で各種濃度の非放射性リガンドとともにインキュベーションした。細胞の洗浄後、放射活性を測定した。測定値は平均±SE, (n=3)。

肝細胞でのアクチビンAの産生：ある種の細胞系ではアクチビンAはオートクリンあるいはパラクリン因子として作用していることが知られている。そこで肝細胞でアクチビンAが産生されているかどうかを検討してみた。アクチビンAの生物活性は赤白血球細胞の分化誘導を指標として測定した。図3-4は肝細胞培養上清中のアクチビンA活性を時間を追って測定したものを示している。アクチビンA活性はEGF添加細胞では無血清培養開始24時間までは認められなかった。しかしそれ以降の時間で非常に高いアクチビンA活性が培養上清中に出現した。一方、EGFを添加せず、増殖刺激を与えなかった群ではアクチビンA活性は上清中には認められなかった。同様にHGFで増殖刺激をした場合も同様にアクチビンA活性が上清中に認められた。そこでEGFで増殖刺激した肝細胞のインヒビリン β_A サブユニットmRNAの発現経過をRNaseプロテクションアッセイで測定した(図3-5)。EGFを添加しなかった肝細胞ではインヒビリン β_A サブユニットmRNAはごく僅かしか発現してなかった。EGFと共に培養するとインヒビリン β_A サブユニットmRNAは添加48時間後をピークに顕著な発現増加がみられた。なおRT-PCR法でも、培養肝細胞ではインヒビリン α および β_B サブユニットmRNAの発現は認められなかった。以上の結果から肝細胞はEGFの増殖刺

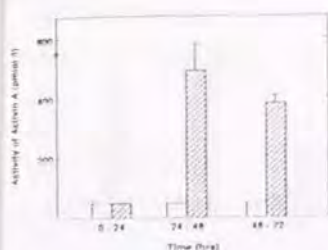


図3-4 肝細胞より産生されるアクチビンA生物活性。肝細胞をInMEGFおよび0.1 μ Mインスリン存在下(■)、非存在下(□)に培養し、培地は24時間ごとに交換した。アクチビンA生物活性は赤白血病細胞の分化誘導を指標として測定した。測定値は平均 \pm SE、(n=4)。

激によってアクチビンAを産生すると考えられた。なお肝非実質細胞分化の培養上清中にはアクチビンA活性は認められなかった。内因性に発現しているアクチビンAの作用を評価するため、アクチビン結合タンパクであるフォリスタチンを培養上清中に加えてみた。フォリスタチンはアクチビンと結合しその作用を完全にブロックし、中和抗体のように作用することが知られている。図3-6に示すように1nMのフォリスタチンはEGFによるDNA合成を大きく促進した。フォリスタチンによるDNA合成促進作用は、EGFによる増殖促進作用がほとんど認められないような、肝細胞を高密度で培養した場合でも観察された。

再生肝でのインヒピン β_A サブユニットmRNAの発現：アクチビンAがin vivoでも発現しているかを70%肝切除ラット肝で検討した(図3-7)。インヒピン β_A サブユニットmRNAは正常肝でも発現が認められたが、肝切除後、12時間ではほとんど認められなくなり、切除24時間後に著明に増加した。以後漸減した。部分肝切除肝においてもアクチビンAが産生されると考えられた。

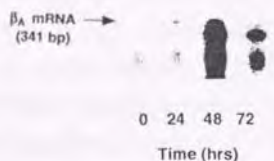


図3-5 β_A サブユニットmRNAの発現経過。肝細胞をInMEGFおよび0.1 μ Mインスリンとともに培養し、総RNAを抽出し、 β_A サブユニットmRNAをRNaseプロテクションアッセイで測定した。

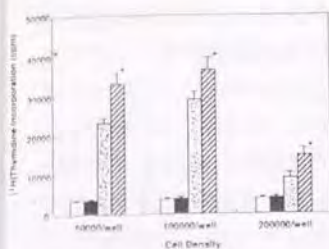


図3-6 EGFで誘導される肝細胞のDNA合成に対するフォリスタチンの作用。肝細胞を三種類の細胞密度で1nM EGF, 0.1 μ M インスリンおよび1nM フォリスタチンとともに培養した。[3H]チミジン(48時間目)に加え、72時間目に[3H]チミジン取り込みを測定した。測定値は平均 \pm SE, (n=1) [], 無添加; [■], +フォリスタチン; [▨], +EGF; [▩], EGF+フォリスタチン。

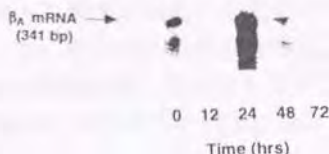


図3-7 部分肝切除後の β_A サブユニットmRNAの発現経過。ウイスター系雄性ラットに部分肝切除を行い、総RNAを切除前後で抽出した。 β_A サブユニットmRNAをRNaseプロテクションアッセイで測定した。

考案

本研究によりアクチビンAがラット初代培養肝細胞のDNA合成を抑制することが明らかになった。抑制効果はナノモル濃度以下で明らかとなり、5nMのアクチビンAはEGFあるいはHGFによって誘導されるDNA合成をほぼ完全に抑制した。これはTGF- β と類似した作用であるが、アクチビンAの方がより高濃度で作用した。またTGF- β およびアクチビンAはいずれもEGF添加36時間後に初めて加えてもDNA合成をほぼ完全に抑制した。両者ともその作用点がG₁期中期から後期に位置しており共通の機序で作用を及ぼしている可能性が考えられた。しかし放射性リガンドによる結合実験では両者間では競合は全く認められず、それぞれ独自の受容体を介して肝細胞に結合して、その増殖を抑制するものと考えられた。最近、アクチビンおよびTGF- β 受容体のcDNAクローニングがなされ(12, 51)、その一次構造は互いに類似していることが明らかになっている。いずれも一個の膜貫通部とセリン/スレオニンキナーゼと想定される細胞内ドメインを有している。このことから両者は共通の細胞内伝達経路によって肝細胞増殖を抑制している可能性がある。このように両者は類似した受容体構造を有し、

肝細胞増殖に対し同様な作用を及ぼすが、また全く異なる作用も発揮する。アクチビンAは遊離肝細胞に対し百日咳毒素感受性Gタンパクを介してフォスフォリパーゼCを活性化し、糖原分解を起こすが(18, 52)、TGF- β にはそのような作用は認められない。それゆえアクチビン受容体は少なくとも二つの異なる細胞内情報伝達系、すなわちTGF- β と同様のものと、アクチビン独自の経路を活性化するものと考えられる。

本研究においてアクチビンAが肝実質細胞より産生されることが明らかになった。興味あることにアクチビンAはEGFやHGFによって肝細胞が増殖刺激を受けた場合のみに産生された。またアクチビンA産生はEGF添加24時間以降に認められた。図3-2に示した様に、アクチビンAのDNA合成抑制作用はEGF添加36時間以降に発揮されることから、内因性のアクチビンAはDNA合成抑制効果を発揮する作用点に産生されるものと考えられた。それゆえ内因性に産生されるアクチビンAは肝細胞の増殖抑制因子として作用しているものと考えられた。図3-6に示すように、アクチビン結合タンパクであるフォリスタチンはEGFによって誘導されるDNA合成を更に増強した。これは内因性に産生されるアクチビンAがEGFによるDNA合成を抑制していたことを示唆する。内因性に産生されるアクチビンAは肝細胞のオートクリン増殖抑制因子として作用し、その産生は増殖促進因子によって刺激されるものと考えられた。

アクチビンAのオートクリン肝細胞増殖抑制因子としての作用は、肝カロン(chalone)研究の歴史からみると興味深い。1950年代、組織のホメオスタシスは細胞増殖の促進あるいは抑制因子の存在に基づいているとする仮説が提唱された。これによると分化した肝細胞では「カロン」と呼ばれる抑制因子が産生されており、部分肝切除を行うと組織でのカロン濃度が低下し肝細胞は増殖を開始する。その結果、細胞数が増加し、組織でのカロンの濃度は再び充分となり、肝細胞は増殖を停止する。つまり肝細胞増殖は組織特異的なカロンと呼ばれる細胞増殖抑制因子によって規定されている、というものである(53)。この想定上の肝カロンを求めて20年以上にわたり様々な研究が行われ(54-56)、いくつかの肝カロンの候補があげられた。たとえばLeffertとWeinsteinは超低密度リポ蛋白質(VLDL)を肝カロンの候補として報告しているが(57)、いずれも今日の眼でみると肝細胞増殖抑制因子とは言い難く、その実態は長く不明であった。本研究の結果はアクチビンAもまた肝カロン様の作用を示すことを示し

ている。興味あることにインヒピン β_A サブユニットmRNA発現は肝切除直後に低下し、切除24時間後には著増しており、カローン様の振る舞いをする。

肝再生において、様々な肝細胞増殖因子が誘導される。TGF- α はEGF受容体を介して肝細胞に作用するがオートクリン因子として肝実質細胞から産生される。またHGFは伊東細胞などの肝非実質細胞から産生される。一方、TGF- β は強力な肝細胞増殖抑制因子であるが、肝非実質細胞で産生される(49)。TGF- β は非活性型として産生され(46)、肝実質細胞にIGF-II/マンノース6リン酸受容体を介して取り込まれ、プロテオリシスの過程を経て活性化されるとされている(58)。本研究で肝細胞増殖制御の新たな一面が明らかになった。すなわち肝細胞がTGF- α やHGFによって増殖刺激を受けると、一定の時間間隔を置いてアクチビンAが肝実質細胞で産生される。そしてアクチビンAはオートクリン肝細胞増殖抑制因子として作用し肝細胞増殖を停止させるよう作用する。それゆえ肝細胞増殖は二種類のTGF- β 遺伝子ファミリーのメンバー、アクチビンAとTGF- β にオートクリン、パラクリン機序によって抑制的に制御されていると考えられる。

第五章 結論

本研究で、これまで性腺、下垂体など限られた臓器での作用しか明らかでなかったアクチビンが膵や肝に実際に存在し局所因子として生理的に作用している可能性が初めて明らかになった。

第II章ではラット膵ラ氏島にアクチビンが存在するかを免疫組織化学的に検討し、ラ氏島非B細胞の分泌顆粒中にアクチビンAの免疫活性が存在することを明らかにした。アクチビンAはA細胞ではグルカゴンと、D細胞ではソマトスタチンと同一分泌顆粒中に共存していた。更にラ氏島のペリフュージョン実験を行い、アクチビンAが2.8mMという比較的低いブドウ糖濃度で二相性のインスリン分泌を惹起することを明らかにし、アクチビンAが生理的インスリン分泌制御因子である可能性を示した。

第III章ではラ氏島に存在するアクチビンAの膵腺房に対する作用を膵腺房由来細胞株AR42J細胞を用いて検討した。アクチビンAはAR42J細胞のアミラーゼ産生を強力に抑制し、またDNA合成もほぼ完全に抑制した。このことからアクチビンAが膵腺房の生理的なアミラーゼ産生およびDNA合成の抑制因子である可能性を初めて明らかにした。膵腺房の増殖はアクチビンとTGF- β という同じ遺伝子ファミリーに属する因子によって制御されていることが示唆された。

第IV章では肝細胞の増殖に対する作用を、ラット初代培養肝細胞を用いて検討した。そしてアクチビンAが肝細胞の増殖を強力に抑制し、更にEGFなどの増殖刺激によって肝細胞自身で産生され、オートクリン増殖抑制因子として肝細胞の増殖を制御していることを明らかにした。肝細胞も、膵腺房と同様にアクチビンとTGF- β という同じ遺伝子ファミリーに属する二つの局所因子によって制御されている可能性が示唆された。

TGF- β はほとんどの臓器来の細胞で産生され、細胞増殖の制御や細胞外マトリックス産生など、様々な細胞機能を調節していることが知られているが、同じ遺伝子ファミリーに属するアクチビンもまた広く体内に分布し、TGF- β と共同し生理活性因子として作用していると考えられた。

謝 辞

本研究は群馬大学生体調節研究所および東京大学医学部第四内科で行ったものである。本研究の遂行にあたり終始ご指導と励ましをいただき、また本論文の御校閲を賜りました群馬大学生体調節研究所教授、小島至先生に心から感謝いたします。

本研究を行う機会を与えてくださり、御助言と御校閲を賜りました前東京大学医学部第四内科教授（現東京大学医科学研究所教授）、浅野茂隆先生に感謝いたします。

本研究の御校閲を賜りました東京大学第四内科助教授、藤田敏郎先生に厚く御礼申し上げます。

有意義な御助言をいただきました癌研究会付属病院院長、尾形悦郎先生にお礼申し上げます。共同研究を通じて有益な討論と助けをいただきました群馬大学生体調節研究所、井上金治先生（現埼玉大学理学部生体制御学科教授）、田中滋康先生、竹内利行先生、柴田宏先生、大西洋英先生、真嶋浩聡先生、群馬大学第一外科講師、小暮公孝先生、群馬大学産婦人科（現北里大学獣医畜産学部教授）、長谷川喜久先生、味の素中央研究所江藤讓博士に厚く御礼申し上げます。

本研究に先立って、多くのご指導をいただきました東京大学医学部第四内科助手、峯徹哉先生に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) Robertson DM, Foulds LM, Leversha L, Morgan FJ, Hearn MTW, Burger HG, Wettenhall REH, de Kretser DM, : *Biochem Biophys Res Commun.*, 126 : 220-224, 1985.
- 2) Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, Noumura M, Igarashi M, Kangawa K and Matsuo H, : *Biochem Biophys Res Commun.* , 129 : 396-402, 1985.
- 3) Ling N, Ying S-Y, Ueno N, Esch F, Denoroy L, Guillemin R, : *Proc Natl Acad Sci USA*, 82 : 7217-7222, 1985.
- 4) River J, Spiess J, McClintock R, Vaughan J, Vale W, : *Biochem Biophys Res Commun.* 133 : 120-126, 1985.
- 5) Vale W, River J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, Karr D, Spiess J, : *Nature*, 321 : 776-779, 1986.
- 6) Ling N, Ying S-Y, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R, : *Nature*, 321: 779-782, 1986.
- 7) Meunier H, River C, Evans RM, Vale W, : *Pros Natl Acad Sci USA*, 85 : 247-251, 1988.
- 8) Asashima M, Nakano H, Shimada K, Kinoshita K, Ishii K, Shibai H, Ueno N, : *Roux's Arch Dev Biol*, 198 : 330-335, 1990.
- 9) Thomsen G, Woolf T, Whitman M, Sokol S, Vaughan J, Vale W, Melton DA, : *Cell*, 63 : 485-493, 1990.
- 10) Sokol S, Melton DA, : *Nature*, 351 : 409-411, 1991.
- 11) Nakamura T, Asashima M, Eto Y, Takio K, Uchiyama H, Moriya N, Ariizumi T, Yashiro T, Sugino K, Titani K, Sugino H, : *J Biol Chem*, 267 : 16385-16389, 1992.
- 12) Mathews LS, Vale W, : *Cell*, 65 : 973-982, 1991.
- 13) Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massague J, : *Cell*, 68 : 97-108, 1992.
- 14) Ueno N, Ling N, Ying S-Y, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R, : *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 2434-2438, 1988.
- 15) Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML, Simmons DM, Bicsak TA, Ling N, : *Mol Endocrinology*, 3 : 651-659, 1989.
- 16) Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H, : *Science*,

- 247 : 836-838, 1990.
- 17) Totsuka Y, Tabuchi M, Kojima I, Shibai H, Ogata E, : *Biochem Biophys Res Commun*, 156 : 335-339, 1988.
 - 18) Mine T, Kojima I, Ogata E, : *Endocrinology*, 125 : 586-591, 1989.
 - 19) Eto Y, Tsuji T, Takegawa M, Takano S, Yokogawa T, Shibai H, : *Biochem Biophys Res Commun*, 142 : 1095-1100, 1987.
 - 20) Burnette W, : *Anat Biochem*, 112 : 195-203, 1981.
 - 21) Hsu SM, Raine I, Franger H, : *J Histochem Cytochem*, 29 : 557-582, 1981.
 - 22) Roth J, : Bullock GR (eds) *Techniques in Immunocytochemistry*, Academic Press, New York, pp218-232, 1983.
 - 23) Chomczynski P, Sacchi N, : *Ann Biochem* , 162 : 156-159, 1987.
 - 24) Esch FS, Shimasaki S, Cooksey K, Mercado M, Mason AJ, Ying S-Y, Ueno N, Ling N, : *Mol Endocrinol*, 1: 388-396, 1987.
 - 25) Lacy PE, Kostianovski M, : *Diabetes*, 16 : 35-39, 1967.
 - 26) Zawulich W, Brown C, Rasmussen H, : *Biochem Biophys Res Commun*, 117 : 448-455, 1967.
 - 27) Roberts VJ, Peto CA, Vale W, Sawchenko PE, : *Neuroendocrinology*, 56 : 214-224, 1992.
 - 28) Samols E, Stagner JI, Ewart RBL, Mark V, : *J Clin Invest*, 82 : 350-353, 1988.
 - 29) Takano k, Yamashita N, Kojima I, Kitaoka M, Yeramoto A, Ogata E, : *Biochem Biophys Res Commun*, 182 : 1408-1415, 1992.
 - 30) Bonner-Weir S, Orci L, : *Diabetes*, 31 : 883-889, 1982.
 - 31) Williams JA, Goldfine ID, : *Diabetes*, 34 : 980-986, 1985.
 - 32) Lognecker DS, Lilja HS, French J, Kuhlmann E, : *Cancer Lett*, 7 : 197-202, 1979.
 - 33) Logsdon CD, Moessner J, Williams JA, Goldfine ID, : *J Cell Biol*, 100 : 1200-1208, 1985.
 - 34) McNiel PL, Mckenna MP, Taylor DL, : *J Cell Biol*, 101 : 372-379, 1985.
 - 35) Bolton AE, Hunter WM, : *Biochem J*, 133 : 529-539, 1973.
 - 36) Caraway WT, : *Am J Clin Pathol*, 32 : 97-99, 1959.
 - 37) Hootman SR, Brown ME, Williams JA, Logsdon CD, : *Am J Physiol*, 251

- : G75-G83, 1986.
- 38) Kannl T, Habara Y, Satoh Y, : *Biomed Res*, 12 : 429-434, 1991.
 - 39) Logsdon CD, Williams JA, : *Am J Physiol*, 250 : G487-494, 1986.
 - 40) Logsdon CD, : *Am J Physiol*, 251 : G487-494, 1986.
 - 41) Morosset J, Sarfati P, : Thompson JC (ed) *Gastrointestinal Endocrinology* Academic Press Inc, San Diego, pp225-240, 1990.
 - 42) Benasaid M, Tahiri-Jiuti N, Cambillau C, Viguerie N, Colas B, Vidal C, Tauber JP, Esteve JP, Sisini C, : *Int J Cancer*, 12 : 796-799, 1992.
 - 43) Logsdon CD, Keyes L, Beauchap RD, : *Am J Physiol*, 262 : G364-368, 1992.
 - 44) Billestrup N, Gonzalez-Manchon C, Potter E, Vale W, : *Mol Endocrinol*, 4 : 356-362, 1990.
 - 45) Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K, Ichihara A, : *Biochem Biophys Res Commun*, 133 : 1043-1050, 1985.
 - 46) Braun L, Mead JE, Panzica M, Mikumo R, Bell GI, Fausto N, : *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 1539-1543, 1988.
 - 47) Berry MN, Friend DS, : *J Cell Biol*, 43 : 506-520, 1969.
 - 48) Shimaoka S, Nakamura T, Ichihara A, : *Exp Cell Res*, 172 : 228-242, 1987.
 - 49) Mead J, Fausto N, : *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, : 1558-1562, 1989.
 - 50) Schubert D, Kimura H, LaCorbiere M, Vaughan J, Karr D, Fischer WH, : *Nature (Lond.)*, 344 : 868-870, 1990.
 - 51) Lin HY, Wang X-F, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodi HF, : *Cell*, 68 : 775-785, 1992.
 - 52) Mine T, Kojima I, Ogata E, : *Biochem Biophys Res Commun*, 186 : 205-210, 1992.
 - 53) Bullough WS, : *Biol Rev*, 37 : 307-342, 1962.
 - 54) Nadal C, : *Arch Toxicol*, (Suppl. 2) 131-142, 1979.
 - 55) Deschamps Y, Verly WG, : *Biomedica (Paris)*, 22 : 195-208, 1975.
 - 56) McMahon JB, Farrelly JG, Iype PT, : *Proc Natl Acad Sci USA*, 79 : 456-460, 1982.
 - 57) Leffert HL, Weinstein DB, : *J Cell Biol*, 70 : 20-32, 1976.
 - 58) Jirtle RL, Carr BI, Scott CD, : *J Biol Chem*, 266 : 22444-22450, 1991.



図1-2 ラット胎ラ氏島の抗アクチビンA抗体による免疫組織化学像。

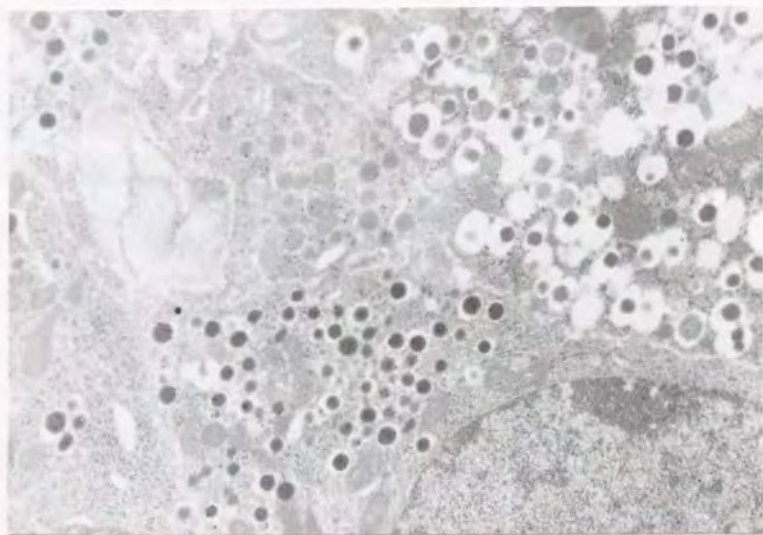


図1-3 抗アクチビンA抗体によるラット胎ラ氏島の免疫電顕像。

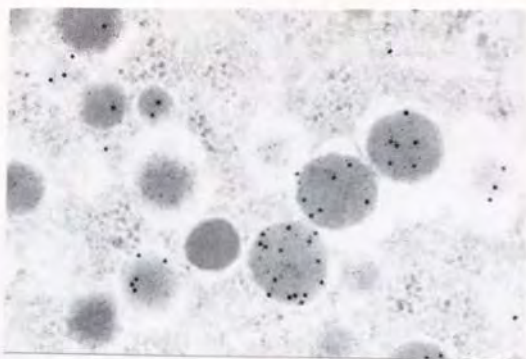


図1-4 異なる大きさの金コロイド粒子を用いた抗グルカゴンおよび抗アクチビンA抗体によるA細胞の二重染色免疫電顕像。アクチビンA：15nm粒子、グルカゴン：5nm粒子。

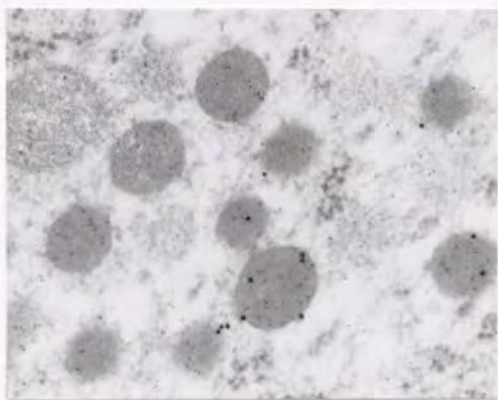


図1-5 異なる大きさの金コロイド粒子を用いた抗ソマトスタチン抗体および抗アクチビンA抗体によるD細胞の二重染色免疫電顕像。

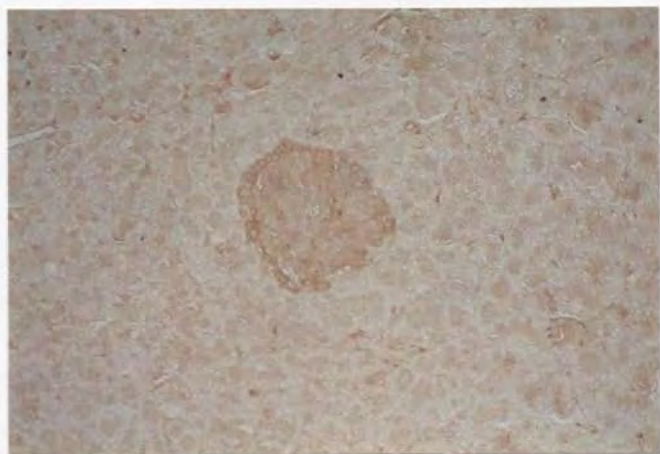
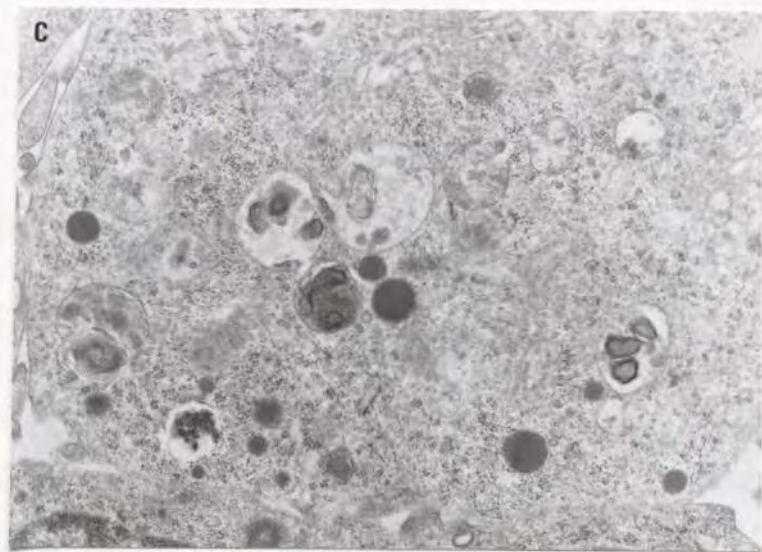
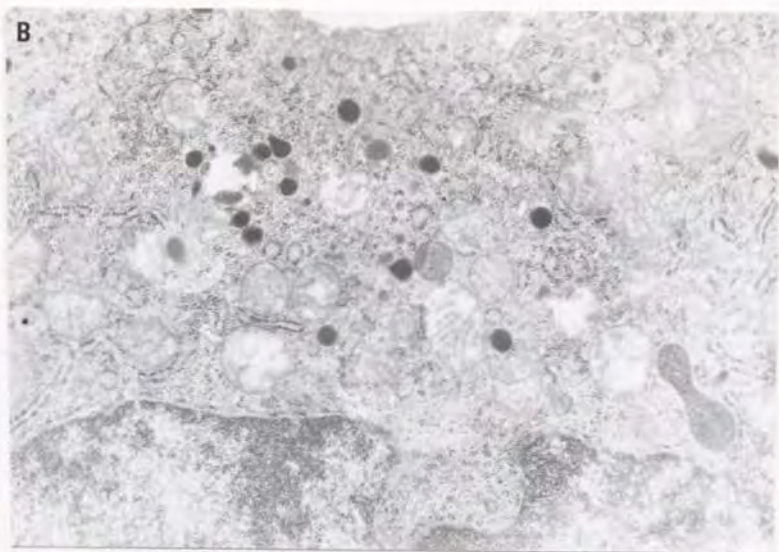


図1-6 抗インヒビン抗体によるラット脳ラ氏島の
免疫組織化学像。



図2-4 AR42J細胞の電子顕微鏡観察。細胞を10%牛胎児血清含有DME培地で1nMデキサメサゾン非存在下 (A)、存在下 (B) およびデキサメサゾンと1nMのアクチビンA存在下 (C) に48時間培養した後、電子顕微鏡観察を行った。





inches 1 2 3 4 5 6 7 8
centimeters 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

