

## 学 位 論 文 の 要 旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |     |         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|---------|
| 学位の種類                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 博 士 | 氏 名 | 平 野 淑 子 |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Fibrates suppress chenodeoxycholic acid-induced RANTES expression through inhibition of NF-<math>\kappa</math>B activation.</b></p> <p>(フィブレート製剤はNF-<math>\kappa</math>Bの活性化抑制機構を介して、ケノデオキシコール酸誘導性RANTESの発現を抑制する)</p> <p style="text-align: right;">共著者名      平野史倫、藤井 博、牧野 勲</p> <p style="text-align: right;">掲載学会誌名   Eur. J. Pharmacol.<br/>448 (1) ; 19-26 : 2002.</p> <p>&lt;研究目的&gt;</p> <p>RANTESはメモリー型T細胞や好酸球などを遊走させるケモカインとして知られ、原発性胆汁性肝硬変においてメモリー型T細胞や好酸球の肝内浸潤とRANTESの増加が報告されている。さらに、われわれは原発性胆汁性肝硬変などの胆汁うっ滞時に上昇する内因性胆汁酸のケノデオキシコール酸(CDCA)が、肝細胞において転写因子NF-<math>\kappa</math>Bの活性化を介してRANTESの発現を誘導することを報告してきた。従って、原発性胆汁性肝硬変患者において、胆汁酸がRANTESの発現を介して炎症細胞を肝内へ浸潤させ肝細胞障害を増悪させていることが想定される。近年、高脂血症治療剤であるベザフィブレートは原発性胆汁性肝硬変患者の肝機能障害を軽減させることが明らかとなった。ベザフィブレートなどのフィブレートは転写因子peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) <math>\alpha</math>を活性化することが報告されている。しかし、原発性胆汁性肝硬変におけるベザフィブレート療法の作用機序は不明である。そこで、今回、培養肝癌細胞株における、特にCDCA誘導性のRANTES発現に対するフィブレート作用に関して検討したので報告する。</p> <p>&lt;材料・方法&gt;</p> <p>ヒト肝癌細胞株HLEは20%牛胎児血清を加えたMinimum essential mediumで、また、ヒト肝癌細胞株HepG2は10%牛胎児血清を加えたDulbecco's Modified Eagle's Mediumで培養した。内因性胆汁酸としてCDCAを、また、フィブレートとしてベザフィブレートとフェノフィブレートを用いた。</p> <p>[1] RANTES蛋白の解析</p> <p>細胞をCDCAおよびフィブレート存在下で培養後、上清を採取し2つの抗RANTES抗体を用いたサン</p> |     |     |         |

ドイツELISA法で測定した。

## [2] RANTES mRNAの解析

### (1) 総RNAの抽出

細胞をCDCAおよびフィブレート存在下で培養後、Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform法で総RNAを抽出した。

### (2) Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

500 ngの総RNAを42℃、20分間 ランダムプライマー存在下で逆転写酵素と反応させ、cDNAを作成した。さらに、cDNAをRANTES特異的プライマーを用いて、94℃、30秒間、56℃、90秒間、72℃、120秒間、28サイクルで増幅させたのち、得られたPCR産物を1.5%アガロースゲルで電気泳動した。内部標準として、GAPDHを用いた。

## [3] RANTES転写活性の解析

### (1) リポーター遺伝子と発現プラスミド

スタンフォード大学のA. Krensky博士から供与されたRANTESプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を融合させたRANTES (pN)-Lucプラスミドをリポーター遺伝子として使用した。さらに、2カ所存在するNF-κB結合塩基配列をそれぞれ変異させたRANTES (pmκB1)-LucとRANTES (pmκB2)-Lucを作成した。また、NF-κBのコンポーネントであるp65とp50の発現プラスミドはマックスデルブルック分子医学研究所のC. Scheidereit博士から、また、PPARαの発現プラスミドは京都大学の梅園博士から、それぞれ供与された。

### (2) プラスミドの一過性遺伝子導入とルシフェラーゼ法

細胞をOpti-MEM培地に交換し、リポフェクション法で一過性にプラスミドを導入した。ルシフェラーゼ活性はLumat LB9510で測定した。遺伝子導入の効率はβ-ガラクトシダーゼ遺伝子で補正した。

## [4] NF-κBのDNA結合活性の解析

細胞をCDCAおよびフィブレート存在下で培養後、全細胞抽出液を作成した。ゲルシフト法は10 μgの全細胞抽出液とNF-κB結合塩基配列を有する32P標識オリゴヌクレオチドとインキュベート後、4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィーで検出した。

## <成績>

### (1) ELISA法およびRT-PCR法によるRANTES発現の解析

ヒト肝癌細胞株HLEにおいてRANTES蛋白とRANTES mRNAはともに100 μM CDCAによって誘導され、100 μMベザフィブレートあるいはフェノフィブレート共存下で抑制された。

### (2) ルシフェラーゼ法によるRANTES転写活性の解析

ヒト肝癌細胞株HLEにおいてCDCAはRANTES転写活性を誘導した。さらに、ベザフィブレートと

フェノフィブレートはCDCA誘導性のRANTES転写活性を抑制した。また、RANTESプロモーター上のNF- $\kappa$ B結合部位を変異させると、CDCAやフィブレートによるRANTES転写活性の誘導あるいは抑制作用は消失した。

#### (3) ゲルシフト法によるNF- $\kappa$ BのDNA結合活性の解析

ヒト肝癌細胞株HLEにおいて100  $\mu$ M CDCAはNF- $\kappa$ BのDNA結合活性を誘導し、100  $\mu$ MベザフィブレートはCDCA誘導性のNF- $\kappa$ BのDNA結合活性を抑制した。さらに、誘導されたNF- $\kappa$ Bのバンドはp65とp50の抗体でスーパーシフトしたことから、p65とp50のヘテロダイマーであることが示唆された。

#### (4) ルシフェラーゼ法によるNF- $\kappa$ BとPPAR $\alpha$ の相互作用の解析

ヒト肝癌細胞株HepG2にRANTES (pN)-Lucとp65/p50およびPPAR $\alpha$ 発現プラスミドをリポフェクション法で導入した。その結果、p65/p50はRANTES転写活性を誘導し、PPAR $\alpha$ はp65/p50で誘導されたRANTES転写活性を濃度依存性に抑制した。一方、PPAR $\alpha$ 単独ではRANTES転写活性に影響を与えなかった。

#### <考案>

今回、われわれは肝細胞においてフィブレートがNF- $\kappa$ Bの抑制を介して内因性胆汁酸の主要成分であるCDCAによって誘導されたRANTESの産生を抑制することを明らかにした。さらに、これら作用はPPAR $\alpha$ の活性化に起因している可能性を示した。本成績は原発性胆汁性肝硬変におけるフィブレート製剤による肝機能改善作用を解明する上でひじょうに重要な知見であると考えられる。すなわち、現在、原発性胆汁性肝硬変の発症機構として、Tリンパ球によって小葉内・隔壁胆管が破壊され肝内胆汁うっ滞が生じ、臨床的に肝機能障害が出現する過程が考えられている。この過程において肝内にうっ滞するCDCAによって誘導されるRANTESをフィブレートが抑制する結果は、炎症細胞浸潤による肝細胞障害をフィブレート治療によって軽減できる可能性を示唆している。

フィブレートによるNF- $\kappa$ Bの抑制機構として、(1) PPAR $\alpha$ とNF- $\kappa$ Bの蛋白・蛋白結合作用、(2) PPAR $\alpha$ とNF- $\kappa$ B共通のコアクチベーターであるCBPの競合阻害作用、(3) NF- $\kappa$ Bの抑制分子I $\kappa$ B $\alpha$ の誘導作用、などが考えられている。今後、これら抑制機構に対するフィブレートの作用を検討することによって、原発性胆汁性肝硬変のフィブレート治療がより明確にされることが考えられる。

#### <結論>

肝細胞においてフィブレートがCDCAによって誘導されるRANTESの発現をNF- $\kappa$ B抑制作用を介して低下させることを明らかにした。

<引用文献>

- 1、Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* ; 347 : 669-71, 1990.
- 2、Nelson PJ, Kim HT, Manning WC, Goralski TJ, Krensky AM. Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J Immunol* ; 151 : 2601-12, 1993.
- 3、Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Biol Chem* ; 274 : 32048-54, 1999.

<参考文献>

- 1、Hirano F, Kobayashi A, Hirano Y, Nomura Y, Fukawa E, Makino I. Thrombin-induced expression of RANTES mRNA through protease activated receptor-1 in human synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis* ; 61 : 834-7, 2002.
- 2、Hirano F, Kobayashi A, Hirano Y, Nomura Y, Fukawa E, Makino I. Nuclear factor- $\kappa$ B regulates RANTES chemokine expression in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  in fibroblast-like synoviocytes. *Mod Rheumatol* ; 12 : 37-43, 2002.
- 3、Hirano F, Kobayashi A, Hirano Y, Nomura Y, Fukawa E, Makino I. Bile acids regulate RANTES gene expression through its cognate NF- $\kappa$ B binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* ; 288 : 1095-101, 2001.
- 4、Hirano F, Tanaka H, Miura T, Hirano Y, Okamoto K, Makino Y, Makino I. Inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent transcription of human immunodeficiency virus 1 promoter by a phosphodiester compound of vitamin C and vitamin E, EPC-K1. *Immunopharmacology* ; 39 : 31-8, 1998.
- 5、Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I, Scheidereit C. Functional interference of Sp1 and NF- $\kappa$ B through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol* ; 18 : 1266-74, 1998.

## 学位論文の審査結果の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                          |                |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------|---------|
| 報 告 番 号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 第                      号 |                |         |
| 学位の種類                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 博士（医学）                   | 氏            名 | 平野   淑子 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <div>審査委員長    谷口   隆信</div>  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-bottom: 10px;"> <div>審査委員       牧野   勲</div>  </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div>審査委員       高後   裕</div>  </div> |                          |                |         |
| 学   位   論   文   題   目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                          |                |         |
| <p>Fibrates suppress chenodeoxycholic acid-induced RANTES expression through inhibition of NF-<math>\kappa</math>B activation.</p> <p>（フィブレート製剤はNF-<math>\kappa</math>Bの活性化抑制機構を介して、ケノデオキシコール酸誘導性RANTESの発現を抑制する）</p> <p>共著者名   平野史倫、藤井   博、牧野   勲</p> <p>掲載学会誌名   Eur. J. Pharmacol. 448 (1) ; 19-26 : 2002.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                          |                |         |
| <b>審査結果要旨</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                          |                |         |
| <p>原発性胆汁性肝硬変は胆管の破壊性病変を特徴とする疾患で自己免疫の異常に起因すると考えられている。詳細な病理機構は不明であるが胆管破壊による胆汁の漏出が引き続く肝細胞障害の主因と考えられ、実際に臨床においてもウルソデオキシコール酸が第1選択薬として用いられている。近年高脂血症治療薬であるフィブレート製剤が原発性胆汁性肝硬変に有効であることが報告されその作用機序に関心が高まっている。著者らは培養肝癌細胞を用い胆汁中の主たる細胞障害物質であるケノデオキシコール酸による細胞障害時のフィブレート製剤の作用について検討し、結果を論文として提出した。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                          |                |         |

著者らは炎症細胞の誘引を引き起こすケモカインの一種であるRANTESに着目し、原発性胆汁性肝硬変の病態においては胆汁酸の直接的な障害作用のみならずケモカインによって誘導されてくる炎症反応も関与しているとの作業仮説の元に実験を行った。細胞にケノデオキシコール酸を加えた際に観察されるRANTESの発現を蛋白質レベル及びメッセンジャーRNAレベルでそれぞれELISA及び半定量RT-PCRを用いて検討し、RANTESの発現が胆汁酸によって誘導／亢進してくることが示されている。更には、このRANTES発現の亢進がフィブレート製剤の共存によって抑制されることも示された。次いで、著者らは炎症性転写調節因子であるNF- $\kappa$ BとPPAR $\alpha$ の関与についてluciferaseレポーターアッセイ及びゲルシフトアッセイを用いて検討を行った。RANTESプロモーター部位にはNF- $\kappa$ B結合サイトが存在しこの部位をluciferase遺伝子に繋いで胆汁酸／フィブレート製剤の効果を検討したところ胆汁酸によるプロモーター活性の亢進が観察されこれはフィブレート製剤で抑制された。また、NF- $\kappa$ B結合サイトに変異を導入するとプロモーター活性は消失した。これらの結果は胆汁酸によるRANTES発現の亢進はNF- $\kappa$ Bを介したものであることを示している。更にPPAR $\alpha$ を発現させることによりNF- $\kappa$ BのRANTESプロモーター部位に対する転写活性が抑制された。これはNF- $\kappa$ Bの抑制機構に別の炎症性転写調節因子であるPPAR $\alpha$ が関与している可能性を示唆するものである。

以上この論文で述べられている実験結果並びに考察は、原発性胆汁性肝硬変に対するフィブレート製剤の有効性に分子的な基盤を与えるだけでなく、原因不明の難病である原発性胆汁性肝硬変の病態を理解する上でも重要な知見と考えられる。

申請者に対して諮問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は論文博士に相応しいものであると考えました。以上、論文／諮問による審査の結果、論文博士に値すると判定したことを御報告いたします。