

機関番号：34519

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591560

研究課題名 (和文) アルギニンの惹起する細胞内シグナル伝達の研究と肝再生促進療法への研究アプローチ

研究課題名 (英文) Signaling systems activated and liver regeneration promoted by arginine

研究代表者

鈴村 和大 (SUZUMURA KAZUHIRO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50434949

研究成果の概要 (和文)：アミノ酸の一つであるアルギニンに注目し、アルギニン投与もしくはアルギナーゼの阻害によって肝細胞増殖、肝再生を促進させ得るか否かを検討した。アルギニンについて、細胞増殖に関わるシグナルの活性化に必要な最適濃度、投与のタイミングを計測し、また細胞培養との関係を肝細胞数カウント、アラマーブルーによる細胞増殖測定法にて検討した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, optimum concentration of arginine or arginase inhibitor on rat liver regeneration were evaluated by liver weight, DNA synthesis and liver cell count.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：(1)肝再生 (2)蛋白合成 (3)アミノ酸 (4)アルギニン (5)アルギナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、アミノ酸例えばグルタミンの生体に対する作用は、蛋白合成の基質、エネルギー源、核酸の前駆体等の栄養学的効果が注目されてきた。我々は、免疫細胞や癌細胞で、アミノ酸が薬理的な効果、すなわち蛋白合

成に関与する細胞内シグナル伝達の活性化を起こすことを明らかにしてきた。このシグナルを活性化するアミノ酸の種類は細胞によって異なり、また、栄養学的な必要性とも異なる可能性が考えられる。しかし、肝細胞において、アミノ酸が惹起する細胞内シグナルの動きはほとんど明らかにされていない。我々

は以前にラット70%肝切除モデルで、肝切除時にミトコンドリア分画より排出されるアルギナーゼが肝細胞増殖に影響している可能性があることを報告した。AST、ALT等もミトコンドリア分画より排出されており、AST、ALTの上昇するような病態では、このアルギナーゼの関与の可能性が考えられる。この現象は肝切除後3、4時間の早期に認められ、栄養学的意義に加えてアミノ酸の惹起する細胞内シグナルへの関与の可能性が高い。臨床的には、術後早期のアルギニンの補給もしくはアルギナーゼの活性抑制が蛋白合成能の早期回復に重要である可能性が考えられる。アルギナーゼの酵素としての生体内局在は肝に集中しており、肝再生との関連は深い可能性が考えられる。アルギニンは尿素回路構成アミノ酸であり、窒素代謝においても重要な役割を果たし、NO産生に用いられ、肝血流に影響し、代謝、栄養学的、肝血行動態的にも見過ごせない問題である。よってアルギニン投与もしくはアルギナーゼの阻害によって肝細胞増殖、肝再生を促進させ得るか否かを検討する。

栄養素としてのアミノ酸に、各種サイトカインやホルモン同様の細胞内シグナル活性化物質としての作用があることが報告されてきたのは、最近のことであり、新たな概念である。その肝再生における検討は国内外を問わずほとんど行われていない。各種酵素をはじめとした蛋白合成で成り立つ生体の機能が、基質のアミノ酸が用いられる前段階で、アミノ酸自身により制御されているのは驚くべきことである。このシグナルの関与を考慮していない現在のアミノ酸療法には改善の余地が残されていると考えられる。また、残存肝の評価は主として残存容積の把握で行われ、単位容積当りの肝機能のレベルアップに関しては、現在有効な方法がない。今回開発するアルギニンを中心とした治療法としてのアミノ酸療法は、輸液製剤の変更、薬物の投与だけで対応でき、臨床的にも簡便で、同容積の残存肝機能を高めることを目標とし、有用性が高いと考えられる。以上より、この研究は肝の効果的な再生の必要な病態の多くの患者の予後を改善する可能性があり、国内外でも先駆的な研究と考えられる。また近年、肝切除、移植等において残存肝もしくは移植肝の機能保持のために多大な努力が行われてきた。本研究は肝再生能を積極的にレベルアップさせる方法の開発を目的としている。具体的には、アルギニン及びアルギナーゼ阻害剤投与のタイミングと量を工夫し、残存肝もしくは移植肝の肝細胞において、リボゾーム合成を活性化させ、蛋白質の翻訳開始を促進することにより、蛋白合成能を高め、効果的な肝再生をはかることを目

標とする。さらに、腸管由来の感染(Bacterial Translocation)による肝不全に対する栄養学的、予防的対策としては、現在製剤上の不安定性から通常の高カロリー輸液製剤には含まれないアミノ酸の一種であるグルタミンの効果が多くの施設から示され、我々も報告してきた。今回アミノ酸、特にアルギニンの肝細胞内のシグナル活性化作用すなわち薬理学的効果を検討することで、積極的な治療法としての道が開かれる可能性が示唆される。これにより、残存肝体積の限界のために手術できなかった肝癌や移植患者の手術が可能となり、回復が促進され、救命率が飛躍的に向上すると考えられる。

## 2. 研究の目的

アミノ酸の一つであるアルギニンに注目し、アルギニン投与もしくはアルギナーゼの阻害によって肝細胞増殖、肝再生を促進させ得るか否かを検討した。またアルギニンについて、細胞増殖に関わるシグナルの活性化に必要な最適濃度、投与のタイミングを計測し、また細胞培養との関係を検討する。

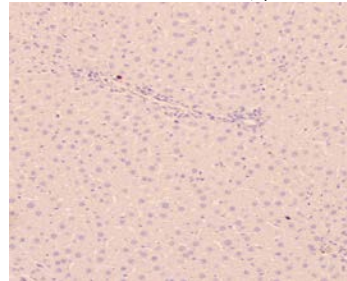
## 3. 研究の方法

肝細胞(HEPG2、初代培養肝細胞等)を培養し、cell growth-related kinaseの一種であり、リボゾーム合成の段階で蛋白合成を制御するP70 S6 kinaseおよび蛋白質の翻訳の開始を制御する4E-BP1を効果的に活性化させるアミノ酸投与条件すなわち、アルギニン濃度、投与のタイミング等を検討し、あわせてアルギナーゼの効果も評価する。また、ラットに70%肝切除を施行し、血中のアルギニンおよびアルギナーゼ活性を測定する。さらに同モデルにおいて、アルギナーゼ阻害剤を投与して、血中アルギニン濃度の変化を検討する。加えて、アルギナーゼ阻害剤を投与することで肝再生が促進するか否かを残存肝重量、DNA合成能にて検討する。これらにより効果的なアルギニンの利用法を開発する。また、一方でアルギナー

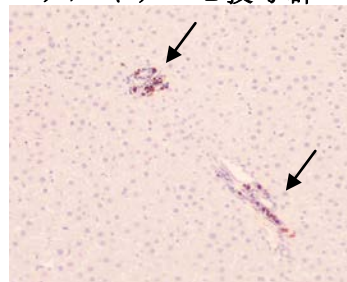
ゼは尿素サイクルの維持にも必要な酵素であり、臨床応用を見据えて尿素サイクル及び窒素代謝への影響もアミノグラム等の解析によって検討する。具体的には、HEPG2細胞や初代培養肝細胞で、アミノ酸を培養液から除去し、アルギニン単独で添加した場合もしくはアルギナーゼ投与の場合、各kinaseのリン酸化をwestern blottingで検討する。さらに投与したアルギニンについて、シグナルの活性化に必要な最適濃度、投与のタイミング等を検討し、細胞培養との関係を肝細胞数カウント、アラマーブルーによる細胞増殖測定法等にて検討する。ラットに70%肝切除を施行し、血中のアルギニン濃度およびアルギナーゼ活性を測定する。さらに同モデルにおいて、アルギナーゼ阻害剤を投与することで、血中アルギニン濃度が上昇するか否かを検討する。70%肝切除ラットへ中枢ルートを挿入し、アルギニン単独補強した高カロリー輸液を行い、肝におけるp70 S6 kinase、4E-BP1の活性化をwestern blottingで検討する。また、アルギニンおよびアルギナーゼ阻害剤投与の肝再生に及ぼす影響を、肝重量の測定、組織学的な細胞分裂像、BrdUの取り込み、NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$ 、IL-6の発現等にて解析する。

(2) アルギナーゼを投与したラットにおいて肝細胞におけるDNA合成が促進されることが確認された。

コントロール群

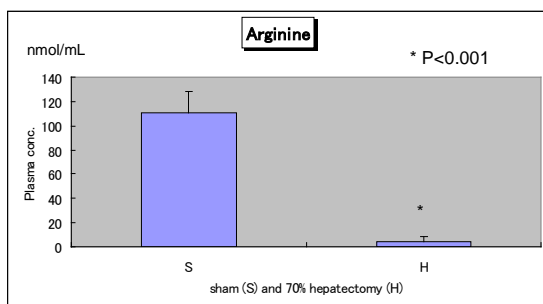


アルギナーゼ投与群



#### 4. 研究成果

(1) ラット70%肝切除モデルにて、血漿アルギニン濃度の低下が認められ、肝切除時にミトコンドリア分画より排出されるアルギナーゼがその原因の一つであり、肝細胞増殖に影響している可能性があった。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

「なし」

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 和夫 (SUZUMURA KAZUHIRO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50434949

(2)研究分担者

藤元 治朗 (FUJIMOTO JIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：90199373

飯室 勇二 (IIMURO YUJI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30252018

平野 公通 (HIRANO TADAMITI)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90340968

佐竹 真 (SATAKE MAKOTO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70399153

(3)連携研究者

( )

研究者番号：