慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Ethanol Upregulates Pro-fibrogenic Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Gene Expression in HepG2 Cells via Cytochrome P4502E1-mediated Ethanol Oxidation.
Sub Title	エタノールはチトクロームP4502E1により制御されるエタノール酸化系を介して、HepG2細胞における線維化関連遺伝子Connective tissue growth factor (CTGF)の発現をupregulateする
Author	小西, 正洋
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.2 (2004. 6) ,p.9-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040602-0009

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Ethanol Upregulates Pro-fibrogenic Connective Tissue Growth Factor（CTGF）Gene Expression in HepG2 Cells via Cytochrome P450 2E1-mediated Ethanol Oxidation.

（エタノールはチトクロームP4502E1により制御されるエタノール酸化系を介して、HepG2細胞における線維化関連遺伝子Connective tissue growth factor（CTGF）の発現をupregulateする）

小　西　　正　洋

内容の要旨

Connective tissue grwoth factor（CTGF）は細胞の増生、分離、接着やアポトーシス、発生などに関連する多岐にわたる細胞機能を有する遺伝子群であるCCN遺伝子ファミリーに属し、ヒトの全身の様々な線維性疾患に関わる線維化制御因子として注目を集めている。CTGFの肝臓における発現の増強は、主として活性化した肝臓の星細胞（伊東細胞）におけるCTGF mRNAの発現を介したもので、CTGFの発現量と肝臓の線維化の程度に相関関係があることが報告されている。アルコールは肝線維症の最も大きな原因の一つであるが、CTGFのアルコール性肝線維症に果たす役割についての研究はこれまでのところない。一方、飲酒により誘導されるエタノール代謝酵素群の一つであるチトクロームP4502E1（以下、CYP2E1）による肝毒性の増強とフリーラジカル産生による酸化ストレスが、アルコール性肝線維症の発症に極めて大きな役割を果たしていることがこれまで基礎的・臨床的な研究で報告されてきた。そこで申請者はCYP2E1を安定的に発現する細胞（HepG2-E9細胞）系を用いて、CYP2E1によるエタノール酸化系が、CTGF遺伝子の発現に与える影響を検討し、アルコール性肝線維症におけるCTGF遺伝子の関与を明らかにすることを目的とした。

CTGF mRNAのreal-time RT-PCR法による定量では、エタノールはE9細胞においてCTGF mRNAの発現量を有意に増加した。このCTGF発現量の増加はCYP2E1の発現を増加させる薬剤であるphorbol myristate acetate（PMA）の添加で増加し、CYP2E1阻害薬である4-methylpyrazole、グルタチオンの前駆体であるN-acetylcysteineやビタミンEの前駆体であるtrolox添加で有意に抑制された。新しい酸化ストレスのマーカーである抗アクロレイン抗体による染色では、エタノールを添加したE9細胞は染色されたのに対し、非添加のE9細胞は染色されなかった。

申請者は、本研究でエタノールがチトクロームP4502E1により制御されるエタノール酸化系を介して、HepG2-E9細胞における線維制御遺伝子CTGFの発現をupregulateすることを明らかにした。E9細胞内のエタノールによる酸化ストレスは抗アクロレイン抗体で可視化したが、CTGF発現量の増加はCYP2E1阻害薬の添加により抑制され、同時に抗酸化作用のある薬物によっても抑制されることなどから、CTGFの発現量は細胞内の酸化ストレスに依存して増加する可能性が示唆された。この研究により、CTGFがアルコール性肝線維化においても、線維化の制御遺伝子として重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文審査の要旨

CTGFはヒトの様々な線維化を伴う疾患に関わる線維化制御因子として注目を集めている。飲酒により誘導されるエタノール代謝酵素群の一つであるCYP2E1による肝毒性の増強とフリーラジカル産生による酸化ストレスが、アルコール性肝線維症の発症に関与していることが報告されてきた。そこで本研究ではCYP2E1のtransfectantでCYP2E1を安定的に発現する細胞（E9細胞）系を用いて、CYP2E1によるエタノール酸化系が、CTGF遺伝子の発現に与える影響を検討し、アルコール性肝線維症におけるCTGF遺伝子関与の解明を試みた。

エタノールはCTGFの発現を有意に増加することがE9細胞において確認されたが、E9細胞におけるCYP2E1発現を、phorbol myristate acetate（PMA）により増加させるとCTGFの発現量は増加し、4-methylpyrazoleなどの薬物により抑制させるとCTGFの発現量は減少することが明らかとなり、エタノールによるE9細胞でのCTGFの発現は細胞内でのCYP2E1の発現量に依存することが示唆された。また、抗酸化作用のある薬物であるN-acetylcysteineやvitamin E analogueであるtroloxによってE9細胞におけるCTGFの発現量は有意に減少することから、CTGFの発現量は細胞内の酸化ストレスに依存して増加する可能性も示唆された。エタノールによるE9細胞における酸化ストレスの誘導は、抗アクロレイン抗体による染色で確認された。

審査ではまず、E9細胞への添加実験での100mMエタノールが、飲酒後の生体内濃度としてどの程度かとの質問がなされた。申請者からはアルコール濃度としては酩酊といえる高い値であるが、添加実験に際しては液体培地からのエタノールの蒸発の問題があり、実際には培養液中の濃度は実測値40～80mM程度で推移しているとの回答がなされた。また、CYP2E1の阻害薬として用いられている4MPに関連して、4MPはADHの阻害薬でもあり、E9細胞においてADHの発現はあるかとの質問がなされたが、申請者からはADHの発現はないとの回答がなされた。阻害実験において4MP以外、化学構造の異なる最低２種類以上の阻害薬による実験がなされるべきであったとの指摘がなされたが、申請者から論文上データは提示していないが、阻害薬としてdiallylsulfide、抗酸化薬としてvitamin Eなどによる実験も行い同様の結果を得ていたとの回答がなされた。CYP2E1は薬物の代謝酵素であり、エタノールと競合的に代謝される薬物の影響を検討し臨床上より有意義な研究とすべきではなかったかとの助言もなされた。また、E9のコントロール細胞としてのMV5細胞による対照実験の不足が指摘された。さらにウイルス性とアルコール性の肝線維化においてCTGF発現に差異があるかとの質問がなされ、CYP2E1による機序はアルコール独自の機序である可能性が示唆されると回答された。CTGFの肝臓内における発現については、肝臓内のCYP2E1の発現と平行して組織学的に観察すべきではなかったかとの指摘もなされた。

以上、本研究はさらに検討すべき課題を残しているものの、アルコール性肝線維症におけるCTGF遺伝子の関与の可能性が示されたという点で、消化器病学上価値のある有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　石井　裕正
　　解剖学　相磯　貞和　　医化学　末松　　誠
　　外科学　北島　政樹
学力確認担当者：
　　審査委員長：相磯　貞和

試問日：平成16年１月26日