

|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes.   |
| Sub Title        | 急性アルコール投与によるラット肝細胞アポトーシスにおけるBaxと電位依存性アニオンチャネルの相互作用  |
| Author           | 足立, 雅之(Adachi, Masayuki)  |
| Publisher        | 慶應医学会   |
| Publication year | 2005  |
| Jtitle           | 慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.1 (2005. 3) ,p.5-  |
| JaLC DOI         |   |
| Abstract         |   |
| Notes            | 号外  |
| Genre            | Journal Article   |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050302-0005">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050302-0005</a> |

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.

# Bax interacts with the voltage-dependent anion channel and mediates ethanol-induced apoptosis in rat hepatocytes.

(急性アルコール投与によるラット肝細胞アポトーシスにおけるBaxと  
電位依存性アニオンチャンネルの相互作用)

足 立 雅 之

## 内容の要旨

アルコール性肝障害の病態には肝細胞アポトーシスの関与が重要である。本研究ではエタノールによる培養肝細胞アポトーシス誘導機序について検討した。

ラット初代培養肝細胞にエタノール50mMを投与したところアポトーシスが誘導された。このアポトーシス誘導過程において、ミトコンドリア中心とした酸化ストレスの増強、アポトーシス誘導性Bcl-2ファミリー蛋白であるBaxの細胞質からミトコンドリアへの移行、それに引き続くチトクロームc放出、カスパーゼ3活性化といったアポトーシス実行シグナルが惹起された。これらの変化は抗酸化物質により抑制されたことから、エタノール投与後に生じる酸化ストレスがアポトーシスに重要な役割を果たすと考えられた。さらに、チトクロームc放出とカスパーゼ3活性化がシクロスポリンAで抑制されたことから、これらの変化がミトコンドリア膜上チャンネルMPT (Mitochondrial permeability transition) ポア依存性の現象であると考えられた。MPTポアはミトコンドリア外膜の電位依存性アニオンチャンネル (VDAC; voltage dependent anion channel) を始め種々の蛋白で構成される蛋白質複合体であり、ミトコンドリア膜透過性を調節しアポトーシスに重要な役割を果たすと考えられているが、その分子メカニズムは不明な部分が多い。本研究では、エタノールを急性投与後に細胞質からミトコンドリアへ移行したBaxがVDACに結合することを明らかにした。さらに、抗VDAC中和抗体のマイクロインジェクションによりエタノール投与による肝細胞アポトーシスが抑制されたことは、アポトーシス誘導におけるVDACの役割を裏付けた。一方、TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) によるアポトーシスにおいては、BaxとVDACとの結合は観察されず、Baxのホモ多量体化が観察された。

以上の結果により、エタノールによる肝細胞アポトーシスにおいて、BaxとBaxの機能ターゲットとしてミトコンドリア外膜のVDACが重要であることが明らかになった。さらに、肝細胞においてエタノールによる細胞死誘導レセプター非依存性のアポトーシスとTNF $\alpha$ による細胞死誘導レセプター依存性アポトーシスの誘導機序では、Baxのミトコンドリアにおける動態が異なることが明らかになった。この研究により、エタノールによる培養肝細胞のアポトーシスの過程において酸化ストレスが重要な機序となっていること、酸化ストレスの主要な標的器官はミトコンドリアであり、酸化ストレスはBaxを介してミトコンドリア膜透過性を調節し、ミトコンドリアにアポトーシスシグナルを誘起することを示した。今回の結果は、アルコール性肝細胞障害の機序の更なる解明につながるだけでなく、肝細胞死のシグナル伝達経路の解明の一助となるものと考えられる。

## 論文審査の要旨

アルコール性肝障害など肝疾患の病態に酸化ストレスの重要性が示唆されているが、その機序は不明な点が多い。本研究は、エタノール (以下EtOH) による肝細胞アポトーシスの誘導機序を解明し、TNF $\alpha$ によるアポトーシスとの差異について検討した。その結果、EtOH投与後ミトコンドリアを中心に酸化ストレスが増強し、更にBaxが酸化ストレス依存性にミトコンドリアへ移行して外膜上のVDACと結合すること、BaxとVDACの結合がミトコンドリア膜透過性を亢進し、チトクロームc (以下cyt-c) 放出を惹起することが明らかになった。更にTNF $\alpha$ 投与時にはBaxはVDACと結合せず、ホモ多量体化することから、EtOHとTNF $\alpha$ によるアポトーシスの誘導機序は異なることを示した。

審査ではまず、ミトコンドリアの形態変化について質問があり、cyt-c放出機序としてミトコンドリア膨化・膜破裂によりcyt-cが漏出する機序と膨化・膜破裂を伴わない機序があり、電顕下の観察ではEtOH投与後cyt-cの放出が起こる時点では膨化は観察されず、この結果はBaxがミトコンドリアの膨化を伴わずcyt-cを放出するという過去の報告と合致すると説明された。次にEtOH濃度の妥当性について質問があり、本研究で用いたEtOHの濃度は生体においてアルコール摂取後に到達し得る血中濃度の範囲であると回答された。次に今回の研究が*in vivo*アルコール投与モデル、あるいは慢性アルコール投与モデルの病態と差異があるかとの質問があり、*in vivo*では本検討で示した肝細胞内酸化ストレスを介した肝細胞傷害の他、肝臓洞壁細胞や炎症細胞も病態に関与するがいずれも酸化ストレスの関与が重要である事、慢性モデルでは抗酸化物質の減少により酸化ストレスが増強するとの回答があった。次に臨床における酸化ストレスの重要性について質問があり、アルコール性肝障害に対してビタミンE等の抗酸化物質が治療に利用されており、酸化ストレスの重要性を裏付けるものとの回答があった。次にミトコンドリア透過性調節のメカニズムについて質問があり、MPTポアは生理的状況下でも細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度などにより開閉するが、cyt-cの放出には不十分であり、BaxとVDACとの結合が必要不可欠であるとの回答がされた。次にBaxをターゲットとした現実的な臨床応用の可能性について質問があり、Baxを特異的に阻害するBH4ペプチドについて例を挙げて回答があった。更に、Baxのホモ多量体の検討においてはクロスリンカーを用いない方法によっても検討を行なう必要があるとの指摘を受けた。最後に、本研究の今後の課題として、BaxがVDACとの結合を介してアポトーシスのみならず、ミトコンドリアでのエネルギー産生調節に関与する可能性を検討するために、低濃度のEtOHを用いた更なる検討が必要である旨旨言がされた。

以上、本研究は今後さらに検討すべき課題を残しているが、アルコール性肝障害の機序を明らかにした点、EtOH、TNF $\alpha$ それぞれによる肝細胞アポトーシスの機序の差異を明らかにした点で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 日比 紀文  
医化学 末松 誠 外科学 北島 政樹  
病理学 岡田 保典  
学力確認担当者:  
審査委員長: 末松 誠

試問日: 平成16年11月10日