

学位論文題名

リコンビナントヒト肝細胞増殖因子の
ラット初代培養肝細胞機能に及ぼす効果

学位論文内容の要旨

肝再生を促す液性因子のなかで肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor 以下HGF)は最も強力な肝再生促進作用を有し、その構造、分子生物学的作用機序が解明されつつある。一方、リコンビナントヒトHGF(rhHGF)が生産され、HGFの生理学的機能の研究が進められており、HGFは肝再生のみならず、他の上皮系細胞の増殖を促進し、ある種の癌細胞の増殖を抑制することが判明している。また、細胞運動促進作用、器官形成作用など多様な機能も有することが明らかになった。

しかしHGFの肝細胞機能に対する影響としては、肝細胞が特異的に産生する蛋白のひとつであるアルブミンの合成能促進作用が解明されているのみであり、他の肝細胞代謝機能についての検討はない。そこで今回、ラット初代培養肝細胞を用い、HGFが肝細胞の糖新生能、尿素合成能に及ぼす効果、ならびに培養形態、細胞内ATP量の変化を検討した。

材料と方法

1) ラット肝細胞の分離、精製

体重200~250g (6~7週齢)の雄性Sprague-Dawleyラットを用いた。ネンブタール麻酔下に開腹、門脈にカニューレーションし、in situで37℃、0.5mM EGTA添加Ca²⁺ free HANKS-HEPES bufferで脱血し、0.05%コラゲナーゼ溶液にて灌流した。肝臓を摘出後、十分に細切し、濾過後得られた粗分散細胞浮遊液に、50×gの遠心操作を4~5回繰り返して、単離肝実質細胞を精製した。トリパンプルー排泄試験より、生存率85%以上の肝細胞を実験に用いた。

2) 肝細胞培養方法

単離された肝実質細胞は、10%ウシ胎児血清、インスリン(10⁻⁸M)、デキサメサゾン(10⁻⁸M)、を加えたWilliams' E(WE)培地に分散し、0.03% I型コラーゲンでコーティングしたプラスチックディッシュ上に2×10⁵ cells/0.2ml/cm²の細胞密度で播種した。37℃、20%O₂、5%CO₂の条件下に2時間培養し、肝細胞が接着後、培地をインスリン(10⁻⁸M)、デキサメサゾン(10⁻⁸M)、グルカゴン(10⁻⁸M)を含み、増殖因子として、それ

ぞれ、rhHGFを1、5、10ng/ml、ヒト上皮性増殖因子(hEGF)10ng/ml添加したWE培地に交換した。以上の培地は培養1、3日後に交換し、培養を5日間継続した。

増殖因子濃度の条件で以下の4群に分けた。

I 群：HGF10ng/ml添加群(n=7)

II 群：HGF5ng/ml添加群(n=7)

III 群：HGF1ng/ml添加群(n=7)

IV 群：EGF10ng/ml添加群(n=7)

検 討 項 目

1) 培養肝細胞の形態学的変化：各群の培養肝細胞の細胞形態の維持、脱落細胞の有無等を位相差顕微鏡下にて連日、観察、比較した。

2) 総蛋白質量：各ディッシュに1N水酸化ナトリウムを0.5ml加え、細胞を溶解し総蛋白質量を測定した。

3) 糖新生能：Hanks液に2mMアラニンと2mM乳酸を添加した溶液中で90分間肝細胞を培養し、肝細胞で合成された糖量を測定した。

4) 尿素合成能：Hanks液に5mM塩化ナトリウムを添加した溶液中で90分間肝細胞を培養し、肝細胞で合成された尿素量を測定した。

5) 細胞内ATP量：各ディッシュに3%過塩素酸を1ml加え、セルスクレーパーにて回収、ボルテックス処理後、細胞内ATP量を測定した。

2、3、4、5)は培養1、2、3、5日後に測定し、3、4、5)の結果は単位蛋白質あたりの量で示した。

実験の結果はmean±SDで表し、検定は、各群間の比較にはone-factor ANOVAとScheffe's-F.Paired t-testを、群内の比較にはWilcoxon Signed Rank testを用いて行なった。危険率5%以下($p<0.05$)を有意差ありと判定した。

結 果

1) 培養肝細胞の形態学的変化：各群とも培養3日後までは安定した単層を形成したが、5日後には細胞の変性、脱落等を認めた。その傾向はI、II、III群に顕著であった。

2) 総蛋白質量：培養1日後にI、II、III群は 0.376 ± 0.092 , 0.354 ± 0.115 , 0.367 ± 0.102 (mg/dish)で3日後まで維持されたが、5日後には 0.238 ± 0.057 , 0.235 ± 0.065 , 0.238 ± 0.061 と有意に($P<0.05$)に低下した。またIV群は1日後に 0.412 ± 0.078 、5日後に 0.377 ± 0.092 と5日間維持され、I、II、III群より高い傾向を示し、5日後には有意に高値を示した。

3) 糖新生能：培養1日後にI、II、III群は 32.621 ± 4.162 , 33.822 ± 10.329 , 31.968 ± 7.321 (mg/90min/mg protein)であったが、IV群は 17.95 ± 4.95 であり、IV群に比べ有意に高値を示した。2日後にはI、II、III、IV群は 11.122 ± 3.801 , 11.363 ± 4.57 , 11.519 ± 6.429 , 9.15 ± 2.413 と1日後に比べ有意に低値を示した。

4) 尿素合成能：IV群は培養1日後に 6.523 ± 3.735 (ng/90min/mg protein)、5日後に 5.784 ± 1.307 と培養中維持された。I、II、III群は1日後に 7.655 ± 2.763 , $7.876 \pm$

5.705, 7.359 ± 3.549 であったが、5日後に 3.595 ± 1.116 , 4.682 ± 2.981 , 4.603 ± 3.173 と有意に低下した。

5) 細胞内ATP量: IV群は培養1日後に 2631.75 ± 797.3 (CPM/mg protein)、2、5日後には 3218.57 ± 1216.23 , 3409.38 ± 1362.06 と1日後に比べ有意に上昇した。I、II、III群は1日後に 2622.43 ± 913.42 , 2740.71 ± 938.25 , 2656.57 ± 875.17 であったが、5日後に 1773.71 ± 449.88 , 1966.86 ± 443.33 , 1986.43 ± 486.26 と有意に低下した。またIV群の5日後に比較して有意に低値を示した。

考 察

EGFは肝細胞増殖作用のほか、糖新生、グリコーゲン合成の促進、アミノ酸代謝など肝代謝にも関与するとされている。HGFは尿素合成能に影響を与えなかったが、培養早期に糖新生を促進することが判明し、その作用は濃度に影響されなかった。

EGFの糖新生促進作用は細胞内 Ca^{2+} 上昇によるとされるが、HGFにも細胞内 Ca^{2+} 流入作用が報告されており、同様の作用機序が関与していることが推察された。

HGFには細胞運動促進作用があるが、今回の検討でも総蛋白質量は、EGF群に比べ培養早期から低値を示す傾向があり、HGFは培養肝細胞の接着には抑制的に働くと考えられた。また、培養5日後にはHGF群の総蛋白質量はEGFに比べ有意に低値を示し、位相差顕微鏡での観察でもHGF群では細胞の変性、脱落が著明であった。

これと時期を同じくして、HGF群では細胞内ATP量の減少を認めた。これは、HGFの長期暴露は、肝細胞のATPの産生と消費の均衡を崩し、ATPの減少と細胞死を誘発する可能性を示唆していると考えられた。従って、細胞長期培養ではHGFは有利に作用しないと考えられた。

著者らは培養肝細胞を利用した人工肝臓を開発、研究しているが、劇症肝炎患者の血清HGF値は高値を示すことが多く、培養肝細胞の維持について臨床応用上検討が必要であると考えられた。

結 語

HGF存在下で、ラット肝細胞培養を行い、その機能を検討した結果以下のことが判明した。

- 1: 糖新生能は培養早期に促進され、HGF濃度には影響されなかった。
- 2: 尿素合成能はHGFにより促進されなかった。
- 3: HGFは細胞接着を若干抑制し、長期培養で培養肝細胞の死と、それに時期を同じくする細胞内ATP量の低下が観察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 安 田 慶 秀

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

リコンビナントヒト肝細胞増殖因子の ラット初代培養肝細胞機能に及ぼす効果

リコンビナントヒト肝細胞増殖因子のラット初代培養肝細胞機能に
及ぼす効果

肝再生を促す液性因子のなかで肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor 以下HGF)は強力な肝再生能を有し、その構造、分子生物学的作用機序の解明が進んでいる。また近年リコンビナントヒトHGF(rhHGF)の生成され、HGFの生理学的機能の研究が進んでいる。HGFは肝再生のみならず 他の上皮系細胞の増殖の促進、ある種の癌細胞の増殖の抑制の他、細胞運動促進作用、器官形成作用など多様な機能も有することが明らかになった。しかし、HGFの肝細胞機能に対する影響としては、肝細胞が特異的に産生する蛋白のひとつであるアルブミンの合成能促進作用などが報告されているにすぎず、他の肝細胞代謝機能については不明である。

著者はラット初代培養肝細胞を用い、HGFがその糖新生能、尿素合成能、ならびに培養形態、細胞内ATP量に及ぼす効果の変化を検討した。

材料と方法：6～7週齢の雄性Sprague-Dawleyラットを用い、門脈にカニキュレーションし、EGTAを含む37℃のCa²⁺free HANKS-HEPES bufferで脱血し、次に、コラゲナーゼ溶液で灌流、消化された肝臓を細切、濾過後、遠心し、単離肝実質細胞を精製した。

単離された肝実質細胞を、10%ウシ胎児血清、インスリン(10⁻⁸M)、

デキサメサゾン(10^{-8} M)を加えたWilliams'E(WE)培地に分散し、I型コラーゲンにてコーティングしたプラスチックディッシュ上に 2×10^5 cells/ $0.2\text{ml}/\text{cm}^2$ の細胞密度で播種した。2時間培養し肝細胞が接着後、培地をインスリン(10^{-8} M)、デキサメサゾン(10^{-8} M)、グルカゴン(10^{-8} M)を含み、増殖因子として、それぞれrhHGFを1、5、10 ng/ml、ヒト上皮性増殖因子(hEGF)10ng/ml添加したWE培地に交換し、培養を5日間継続した。

増殖因子濃度の条件で以下の4群に分けた。

I 群：HGF10ng/ml添加群 (n=7)

II 群：HGF5ng/ml添加群 (n=7)

III 群：HGF1ng/ml添加群 (n=7)

IV 群：EGF10ng/ml添加群 (n=7)

検討項目として、位相差顕微鏡下に培養肝細胞を連日観察し、総蛋白質量、糖新生能、尿素合成能、細胞内ATP量を 培養1、2、3、5日後に測定した。

結果：位相差顕微鏡での観察では、各群とも培養3日後までは安定した単層を形成したが、5日後には細胞の変性、脱落等を認め、その傾向はI、II、III群に顕著であった。また総蛋白質量は、IV群は培養5日後まで維持されたが、I、II、III群では5日後に有意に低下した。糖新生量は、培養1日後にI、II、III群は、IV群に比べ有意に高値を示し、検討した範囲ではHGF濃度に依存性を認めなかった。また、2日後以降は、各群とも1日後に比べ有意に低値を示し群間に差を認めなかった。一方、尿素合成能は、培養3日後までは各群で差を認めなかったが、培養5日後には、IV群は1日後の値を維持したが、I、II、III群は低値を示し、IV群に比べ有意に低下した。細胞内ATP量はIV群は培養期間中維持され、2、5日後には1日後に比べ有意に上昇した。一方、I、II、III群は3日後まで維持されたが、5日後に有意に低下し、IV群の5日後に比較して有意に低値を示した。

以上より、HGF存在下で、ラット培養肝細胞の糖新生能は培養早期に促進され、その効果は 検討したHGF濃度では影響されないことが判明した。一方、尿素合成能については、HGFに促進作用を認めないことが明かとなった。また、HGFは、培養後期には培養肝細胞の死と、細胞内ATP量の低下を誘発し、肝細胞のエネルギーバランスに障害を

与えることが判明した。

著者は培養肝細胞を利用した人工肝臓の開発を目ざしているが、劇症肝炎患者の血清HGF値は高値を示すことが多いので、培養肝細胞の機能維持当たって臨床応用上問題となると考えられた。

審査に当たって、安田教授より肝細胞培養における増殖因子の役割と、人工肝臓の臨床応用の可能性について、加藤教授より、劇症肝炎とHGFの関わりについて、また、小山教授より培養肝細胞増殖と細胞外基質との関係についてなどの質疑があったが、申請者はおおむね妥当な回答をおこなった。

HGFが培養肝細胞の糖新生能を亢進させること、また、長期培養においてはHGFが肝細胞のエネルギーバランスに障害を及ぼし肝細胞死を誘発することを示した報告はなく、HGFの肝細胞機能ならびに培養に及ぼす影響について、新たな知見を加えたものであり、学位授与に値するものと考えられる。