

学位論文題名

Hepatocyte Growth Factor (HGF) による

培養鉄負荷ラット肝細胞への保護効果に関する実験的研究

学位論文内容の要旨

I. 緒言

肝臓は鉄貯蔵臓器であり、肝細胞傷害と細胞内鉄との関連は古くから指摘されている。本邦における肝硬変の大部分を占めるウイルス肝炎由来の肝硬変においても、病理組織学的に肝細胞には軽微ではあるが、種々の程度に鉄沈着がみられ、肝病変の進展に細胞内過剰鉄が影響を及ぼしている可能性が考えられる。慢性肝障害では肝細胞の壊死による脱落が生じ、その後再生とともに線維化が加わり肝硬変へと進展する。すなわち慢性肝障害の進展は、肝細胞傷害に基づく細胞壊死と、それに引き続く再生の不均一によると考えることが出来る。肝細胞の再生・増殖に関しては、Hepatocyte Growth Factor (HGF) がその主役とされているが、HGFには肝細胞の増殖促進作用以外にも多彩な作用が報告されており、障害から肝細胞を保護する作用のある可能性も考えられる。そこで、本研究では鉄沈着による肝細胞傷害とHGFの関連を検討するために、鉄負荷ラットより作製した初代培養肝細胞を用いて実験的肝細胞傷害を作成し、HGFの傷害肝細胞への影響を検討した。

II. 材料と方法

1. ラットへの鉄負荷方法
ウイスター系雄性ラットに、カルボニル鉄約800mgを含むアガーを、標準固形飼料と共に摂食させて鉄負荷ラットを作成した。
2. 初代培養肝細胞の作製
0.05%コラゲナーゼ溶液 in situ持続灌流法により肝細胞を分離し、10%FBS加ウイリアムスE培地にて24穴培養プレートを用い、 1×10^5 /ml/wellにて37°C、5%CO₂気相下にて培養した。
3. 肝の組織学的検討
肝を摘出後10%ホルマリンにて固定し、ヘマトキシリン・エオジン法(H.E)及びプルシアンブルー法にて染色し観察した。
4. 遊離肝細胞の鉄濃度
遊離肝細胞を硝酸処理し、原子吸光法にて鉄濃度を測定した。
5. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)による判定(MTTアッセイ)
MTT溶液(5mg/ml)100 μ lを各ウェルに添加し、37°C4時間培養後、DMSO 1mlを加えて溶解し、吸光度を測定した。
6. 実験的肝細胞障害の作製
四塩化炭素を0、1.0、および10mMの濃度で添加し24時間培養後、MTTアッセイ及び培地中のGOT濃度をUV法にて測定した。HGFは10ng/mlの濃度で四塩化炭素と同時に添加した。

7. DNA合成の測定

HGF添加24時間後に、 18.5 KBq の ^{125}I -deoxyuridineを加えさらに6時間培養後、細胞を溶解し放射活性を測定した。

III. 成績

1. コントロールラット及び鉄負荷ラット肝の組織学的検討

H.Eによる検討では、コントロール及び鉄負荷肝いずれにても、肝細胞壊死や線維化の所見は認めなかった。鉄染色では、コントロール肝では染色陽性細胞は認めなかったが、鉄負荷肝にのみ陽性肝実質細胞が少数ながら認められた。原子吸光法で測定したコントロールラット肝細胞の鉄濃度は、 1×10^5 細胞あたり $76.45 \pm 9.38 \mu\text{g}$ (Mean \pm SD)であったが、鉄負荷ラット肝細胞では $185.53 \pm 10.56 \mu\text{g}$ と明らかに増加していた。

2. 初代培養肝細胞におけるMTTアッセイの検討

MTTアッセイにおける吸光度は、培養肝細胞数と正の相関を示し、さらに四塩化炭素添加時に培地中に増加するGOT濃度と負の相関を示した(MTTアッセイは、初代培養肝細胞の細胞傷害の判定に有用であると考えられた)。

3. 四塩化炭素による培養肝細胞傷害に及ぼすHGFの影響

コントロール肝細胞では、四塩化炭素 1 mM 添加にてMTTアッセイの吸光度は非添加の約 60% に低下したが、 10 mM ではMTTの還元を示さなかった。四塩化炭素と同時にHGF 10 ng を添加しても吸光度の改善はみられなかった。鉄負荷肝細胞では吸光度の四塩化炭素 1 mM 濃度で、非添加時の 10% 以下と低下しており、コントロール群と比較して明らかに細胞傷害の増強がみられた。一方HGFを添加すると、四塩化炭素濃度 1 mM での吸光度は有意に改善しており、HGFによる鉄負荷肝細胞への保護作用が示唆された。

4. HGFによる ^{125}I -deoxyuridineの取り込み

HGF添加によりコントロール群、鉄負荷群ともに非添加時の約 200% の増加がえられたが、両群間では有意差は認められなかった。今回用いた初代培養肝細胞は、鉄負荷の有無にかかわらずHGFに反応し、同程度にDNA合成の増加を示すことが示唆された。

IV. 考察

カルボニル鉄を用いることにより、鉄吸収の生理的な経路である経口投与にて、細胞内鉄量が対照と比較して約2倍量の鉄負荷肝細胞を得ることができ、初代培養実験に供しえた。そこで、四塩化炭素を用いて細胞傷害を惹起し鉄との関連を検討した結果、鉄負荷肝細胞では、コントロール肝細胞と比較して四塩化炭素による細胞傷害が著しく増強され、鉄負荷肝細胞の脆弱性が明らかとなった。四塩化炭素は、脂質過酸化反応により細胞を傷害するとされており、四塩化炭素によって引き起こされる脂質過酸化反応が、細胞内に増加している鉄により増強された可能性が考えられた。HGFは、鉄負荷肝細胞における四塩化炭素による細胞傷害の増強を抑制した。本研究では、DNA合成に及ぼす作用は鉄負荷肝細胞と対照肝細胞との間に差がなかったことより、この作用がHGFの増殖促進効果のみによるとは考え難く、HGFは細胞内鉄過剰状態と関連して細胞保護作用を示す事が示唆された。

V. 結語

カルボニル鉄負荷ラット初代培養肝細胞を用いて、実験的肝細胞傷害におよぼす鉄とHGFの関連を検討し、以下の結果を得た。

1. カルボニル鉄負荷により、細胞内鉄量が約倍量の遊離肝細胞が得られ、初代培養に供し得た。
2. 鉄負荷培養肝細胞では四塩化炭素による細胞傷害が増強し、鉄負荷肝細胞の脆弱性が示唆された。
3. HGFは、鉄負荷肝細胞における四塩化炭素による細胞傷害の増強を抑制し、肝細胞保

護作用が示唆された。

以上より、肝細胞内鉄の増加が肝細胞の脆弱性をもたらす事を明らかにし得たがHGFの作用の観点からは、むしろ過剰鉄の存在によりHGFが細胞保護作用を示すことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Hepatocyte Growth Factor (HGF) による

培養鉄負荷ラット肝細胞への保護効果に関する実験的研究

I 緒言

肝臓は鉄貯蔵臓器であり、鉄と肝細胞傷害との関連は古くから指摘されている。本邦における肝硬変の大部分を占める肝炎ウイルス性肝硬変においても、病理組織学的に肝細胞には種々の程度に鉄沈着がみられ、肝病変の進展に細胞内過剰鉄が影響を及ぼしている可能性が考えられる。一方、慢性肝障害の増悪は、肝細胞傷害に基づく細胞壊死と、それに引き続く再生の不均一によると考えることが出来る。肝細胞の再生・増殖に関しては、HGFがその主役とされているが、HGFには肝細胞の増殖促進作用以外にも多彩な作用が報告され、傷害から肝細胞を保護する作用のある可能性も考えられる。そこで、本研究では鉄負荷ラットより作製した初代培養肝細胞を用いて、鉄と実験肝細胞傷との関連を、近年培養細胞の細胞数や薬剤感受性の判定に用いられている、MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)アッセイにて検討し、HGFの影響をあわせ検討した。

II 材料と方法

1、ラットへの鉄負荷方法

ウイスター系雄性ラットに、カルボニル鉄約800mgを含むアガーを、標準固型飼料と共に摂食させて鉄負荷ラットを作成した。

2、初代培養肝細胞の作製

コラゲナーゼ溶液 in situ 持続灌流法により肝細胞を分離し、

10% FBS 加ウイリアムスE培地にて24穴培養プレートを用い、細胞数は 1×10^5 /ml/wellの低密度にて37°C、5% CO₂ 気相下にて培養した。

3、肝の組織学的検討

ヘマトキシリン・エオジン法(H.E)及びプルシアンブルー法にて染色し観察した。遊離肝細胞の鉄濃度は原子吸光法にて測定した。

4、MTTアッセイ

MTT溶液 (5 mg/ml) 100 μ lを添加し、4時間培養後DMSOにて細胞を溶解し、吸光度を測定した。

5、実験的肝細胞障害の作製

四塩化炭素を0~10 mMの濃度で添加し24時間培養後、MTTアッセイ及び培地中のGOT濃度をUV法にて測定した。HGFは10 ng/mlの濃度で四塩化炭素と同時に添加した。

6、DNA合成の測定

HGF添加24時間後に、¹²⁵I-deoxyuridineを加え6時間培養後、放射活性を測定した。

Ⅲ 結果

1、コントロールラット及び鉄負荷ラット肝の組織学的検討

H.Eによる検討では、コントロール及び鉄負荷肝いずれにても、肝細胞壊死や線維化の所見は認めなかった。鉄染色では、鉄負荷肝にのみ陽性肝実質細胞が少数ながら認められた。鉄負荷ラット肝細胞の鉄濃度は、コントロールに比べ倍量に増加していた。

2、初代培養肝細胞におけるMTTアッセイ

MTTアッセイにおける吸光度は、培養細胞数と正の相関を示し、さらに四塩化炭素添加時に培地中に増加するGOT濃度と負の相関傾向を示した。MTTアッセイは、初代培養肝細胞の細胞傷害の判定に有用であると考えられた。

3、四塩化炭素による培養肝細胞傷害に及ぼすHGFの影響

コントロール肝細胞では、四塩化炭素1mM添加にて吸光度は非添加時の約60%に低下し、10mMではMTTの還元を示さなかった。鉄負荷肝細胞では四塩化炭素1mM濃度で、非添加時の吸光度の10%以下と低下しており、コントロールと比較して明らかに細胞傷害の増強がみられた。一方、HGFを添加すると、鉄負荷肝細胞では四塩化炭素濃度1mMでの吸光度は有意に改善しており、コントロールでは吸光度の変化はみられなかった。

4、HGFによる¹²⁵I-deoxyuridineの取り込み

コントロール肝細胞、鉄負荷肝細胞ともに有意にアイソトープの取り込みの増加が認められたが、両群間では有意差は認められなかった。

Ⅳ 考察

カルボニル鉄を用いることにより、鉄吸収の生理的な経路である経口投与にて細胞内鉄量が、対照と比較して約2倍量の鉄負荷肝細胞を得ることができ、初代培養実験に供しえた。鉄負荷肝細胞ではコントロール肝細胞に比較して、四塩化炭素による細胞傷害が著しく増強され、鉄負荷肝細胞の脆弱性が示された。HGFは、鉄負荷肝細胞における四塩化炭素による細胞傷害の増強を抑制した。DNA合成に及ぼす作用は鉄負荷肝細胞と対照肝細胞との間に差がなかったことより、HGFは細胞内鉄過剰状態と関連して細胞保護作用を示す事が示唆された。

本研究により、肝細胞内鉄の増加が肝細胞の脆弱性をもたらす事が示され、HGFの細胞保護作用が示唆された。

以上より、本研究は博士(医学)の学位論文として妥当なものと判断される。