

学位論文題名

ラット初代培養肝細胞の増殖におよぼす 因子とその調節機構

学位論文内容の要旨

哺乳動物の肝実質細胞は、通常、静止期にあり分裂・増殖しないが、薬物による傷害や外科的切除により、残余肝が分裂・増殖を開始し、元の容積になると自動的に停止する。この肝再生現象において、肝実質細胞の増殖の開始には、肝組織中の細胞密度の低下や増殖促進因子が関与し、増殖の終了には、細胞密度の増加や増殖抑制因子が関与するものと考えられている。しかし、*in vivo* の実験系で肝再生における個別の成長因子の役割やその情報伝達機構を検討するには、関与する因子が多岐にわたり応答の解析が困難なため、いまだにそのメカニズムは不明な部分が多い。そこで本研究では、より単純なラットの初代培養肝細胞をモデル実験系として用い、肝細胞の増殖を促進することが示唆されている上皮増殖因子 (EGF)、インスリン (Ins)、肝細胞増殖因子 (HGF) および血小板由来増殖因子 (PDGF) を取り上げ、これらの成長因子の肝細胞に対する増殖促進作用機構と、各々に対するアドレナリン作動薬の修飾効果を薬理学的手法を用いて検討した。

実験は、*in situ* コラゲナーゼ法により単離した肝細胞を種々の細胞密度で3時間培養し肝細胞を培養皿に接着させた後、無血清培地に変え各成長因子や種々の薬物を添加し、さらに一定時間培養して行った。肝細胞の細胞内 cAMP 量の定量と α_2 -および β_2 -受容体 mRNA のノーザンブロット解析を行い、成長因子による α_2 -および β_2 -受容体の発現について検討した。また、DNA 合成能および、細胞数の代わりに核数を計測し、肝実質細胞に対する成長因子の増殖促進作用を評価した。

EGF、Ins、HGF、PDGF の各々単独処理により、肝細胞のアドレナリン作動性 α_2 -および β_2 -応答能が培養開始4時間後から増加し始め、6時間後から有意に発現してくることが見出された。また、ノーザンブロット解析から α_2 -および β_2 -受容体 mRNA が各成長因子により培養2-3時間で有意に発現したことから、これらの応答能の発現は、 α_2 -および β_2 -受容体の発現に起因していることが示唆された。

種々の密度の肝細胞を EGF (20 ng/ml) で培養すると、培養開始3-4時間後から経時的に DNA 合成能 および核数が低密度 (3.3×10^4 cell/cm²) で有意に増加し、高密度では減弱されることが見出された。この EGF の増殖促進作用は、 β_2 -作動薬の metaproterenol (10^{-6} M) および細胞膜透過型の cAMP 誘導体である dibutyryl-cAMP (db-cAMP : 10^{-7} M) により増強されることが見出された。また、細胞内 cAMP レベルを間接的に減少させる α_2 -作動薬の UK-14304 (10^{-6} M) は db-cAMP の効果には影響せず、metaproterenol

の増強効果のみを抑制したことから、細胞内 cAMP のレベルの変化により EGF の増殖促進作用が調節されている可能性が示された。さらに metaproterenol の増強効果が、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の特異的阻害薬の H-89 (10^{-7} M) により抑制されたことから、EGF の増殖促進作用は β_2 -受容体-PKA 系により増強されることが示唆された。また、EGF の効果が genistein (5×10^{-6} M)、rapamycin (10 ng/ml) により完全に抑制されたことから EGF のシグナル伝達には少なくとも、receptor tyrosine kinase (RTK) および p70 ribosomal S6 kinase (p70 S6K) が関与していることが示唆された。

一方、比較的高濃度の Ins (10^{-7} M) は培養 3-4 時間後から経時的に肝細胞の DNA 合成能 および核数を有意に増加させ、その作用は細胞密度の影響をほとんど受けないことが判明し、EGF と全く異なることが見出された。Ins の増殖促進作用は、EGF と同様に metaproterenol (10^{-8} M) および db-cAMP (10^{-8} M) により増強され、両薬物の作用が H-89 (10^{-7} M) で遮断されたことから、 β_2 -受容体-PKA 系により増強されることが示唆された。また、Ins の増殖促進作用が genistein、rapamycin に加えて wortmannin (10^{-7} M) により完全に抑制されたことから Ins のシグナル伝達には少なくとも、RTK、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) および p70 S6K が関与しており、EGF とは異なる伝達経路であることが示唆された。

また、HGF (5 ng/ml) は、低密度における肝細胞の DNA 合成能 および核数を培養 2-3 時間後から経時的に有意に増加させ、高密度では有意に減弱されることが見出された。HGF の増殖促進作用は、metaproterenol および db-cAMP に加えて、 α_1 -作動薬の phenylephrine (10^{-6} M) および PMA (10^{-7} M) でも増強された。さらに、HGF に対する phenylephrine の増強効果は、protein kinase C (PKC) の特異的阻害薬である sphingosine (3×10^{-6} M) で有意に抑制されたことから、HGF 単独の肝細胞増殖促進作用は β_2 -受容体-PKA 系に加えて、 α_1 -受容体-PKC 系で修飾されることが見出された。HGF の増殖促進作用が genistein、U-73122、sphingosine、wortmannin、rapamycin により完全に抑制されたことから、HGF のシグナル伝達には少なくとも RTK、phospholipase C (PLC)、PKC、PI3K および p70 S6K がそれぞれ介在することが判明した。したがって、HGF のシグナル伝達経路は、先の EGF、Ins とは異なることが示唆された。

さらに、PDGF (10 ng/ml) も、培養 3-4 時間後から、経時的に肝細胞の DNA 合成能 および核数を有意に増加させ、その作用は、Ins と同様に播種時の細胞密度の影響をほとんど受けないことが見出された。PDGF の肝細胞増殖促進作用は、 α_1 -作動薬の phenylephrine (10^{-6} M) および PMA (10^{-7} M) により増強されたことから、 α_1 -受容体-PKC 系により、修飾されることが見出された。さらに、PDGF の増殖作用は genistein、U-73122、sphingosine、wortmannin、rapamycin によりほぼ完全に抑制されたことから、PDGF のシグナル伝達経路には少なくとも RTK、PLC、PKC、PI3K および p70 S6K が介在することが示唆された。

以上の結果から、EGF、Ins、HGF および PDGF は、各々肝実質細胞を低密度培養下で早期に増殖させることが見出された。各成長因子は、培養時の細胞密度に依存するもの (EGF、HGF) と依存しないもの (Ins、PDGF) に分類できた。またアドレナリン α_1 -および β_2 -作動薬は、上記の成長因子の作用を増強する修飾因子であり、 α_2 -作動薬は cAMP 量を低下させることにより β_2 作動薬の効果を抑制しているものと考えられた。さらに、各成長因子はそれぞれ特有のシグナル伝達経路をもつことから、これらの成長因子には、肝細胞の増殖促進作用において固有の役割があるものと推察された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 徳 光 幸 子
副 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助教授 三 宅 教 尚

学 位 論 文 題 名

ラット初代培養肝細胞の増殖におよぼす 因子とその調節機構

肝実質細胞の増殖の開始には、肝組織中の細胞密度の低下や増殖促進因子が関与し、増殖の終了には、細胞密度の増加や増殖抑制因子が関与するものと考えられている。しかし、*in vivo* の実験系で肝再生における個別の成長因子の役割やその情報伝達機構を検討するには関与する因子が多岐にわたり、そのメカニズムは不明な点が多い。

本論文提出者は、より単純なラットの初代培養肝細胞をモデル実験系として、肝細胞の増殖を促進する上皮増殖因子 (EGF)、インスリン (Ins)、肝細胞増殖因子 (HGF) および血小板由来増殖因子 (PDGF) の肝細胞に対する増殖促進の作用機構の解明、さらにこれらの因子に対して、アドレナリン作動性 α_2 -および β_2 -応答能が発現し、アドレナリン作動性の修飾効果を示すことをノーザンブロット解析および薬理的解析から追求し、以下のような成果をおさめた。

(1) 肝細胞はEGFで培養すると、DNA合成能 および核数が低密度で増加し、高密度では減弱した。このEGFの増殖促進作用は、 β_2 -作動薬のmetaproterenolおよび細胞膜透過型のcAMP誘導体のdibutyryl-cAMP (db-cAMP) により増強した。また、細胞内 cAMP生成を減少させる α_2 -作動薬のUK-14304はdb-cAMP の効果には影響せず、metaproterenolの増強効果のみを抑制したことから、細胞内cAMPのレベルの変化によりEGFの増殖促進作用が調節されている可能性が示された。さらにmetaproterenolの増強効果が、cAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) の特異的阻害薬のH-89により抑制されたことから、EGFの増殖促進作用は β_2 -受容体-PKA系により増強されることが示唆された。また、EGFの効果がgenistein、rapamycinにより完全に抑制されたことから、EGFのシグナル伝達にはreceptor tyrosine kinase (RTK) および p70 ribosomal S6 kinase (p70 S6K) が関与していることが示唆された。

(2) Insは肝細胞のDNA合成能および核数を増加させ、その作用は細胞密度の影響をほとんど受けず、EGFと全く異なることが見出された。Insの増殖促

進作用は、EGFと同様にmetaproterenolおよびdb-cAMPにより増強され、両薬物の作用がH-89で遮断されたことから、 β_2 -受容体-PKA系により増強されることが示唆された。また、Insの増殖促進作用がgenistein、rapamycin、wortmanninにより完全に抑制されたことから、Insのシグナル伝達には、RTK、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) およびp70 S6Kが関与しており、EGFとは異なる伝達経路であることが示された。

(3) HGFは肝細胞のDNA合成能 および核数を増加させるが、高密度ではその作用は減弱した。HGFの増殖促進作用は、 α_1 -作動薬のphenylephrine、metaproterenol、db-cAMPおよびPMAで増強された。さらに、HGFに対するphenylephrineの増強効果は、protein kinase C (PKC)の特異的阻害薬のsphingosineで抑制されたことから、HGF単独の肝細胞増殖促進作用は β_2 -受容体-PKA系および α_1 -受容体-PKC系で修飾されることが分かった。HGFの増殖促進作用がgenistein、U-73122、sphingosine、wortmannin、rapamycinにより完全に抑制されたことから、HGFのシグナル伝達は少なくともRTK、phospholipase C (PLC)、PKC、PI3-Kおよびp70、S6Kが介在し、EGF、Insの作用とは異なっていた。

(4) PDGFは肝細胞のDNA合成能 および核数を増加させ、その作用は、Insと同様に細胞密度の影響を受けなかった。PDGFの細胞増殖促進作用は、phenylephrine およびPMAにより増強されたことから、 α_1 -受容体-PKC系により修飾されることが見出された。さらに、PDGFの増殖作用はgenistein、U-73122、sphingosine、wortmannin、rapamycinにより完全に抑制されたことから、PDGFのシグナル伝達経路には少なくともRTK、PLC、PKC、PI3Kおよびp70 S6Kが介在することが示された。

以上の結果から、EGF、Ins、HGFおよびPDGFは、各々肝実質細胞を低密度培養下で早期に増殖させることが見出された。各々の成長因子は、培養時の細胞密度に依存するもの(EGF、HGF)と依存しないもの(Ins、PDGF)に分類できた。肝細胞の増殖促進作用において、これらの成長因子は固有の生理的意義をもつことを明らかにした。またアドレナリン α_1 -および β_2 -作動薬は、上記の成長因子の作用を増強する修飾因子であり、 α_2 -作動薬はcAMP量を低下させることにより β_2 -作動薬の効果を抑制することを示した。

以上の新知見は成長因子の作用機構とこれらの作用を修飾するアドレナリン作動薬の生理的意義を明らかにしたものである。審査員一同これらの研究を高く評価し、本論文提出者が博士(薬学)の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。