

氏名	う やま なお き 宇 山 直 樹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	論 医 博 第 1786 号
学位授与の日付	平 成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Regulation of Cultured Rat Hepatocyte Proliferation by Stellate Cells. (星細胞によるラット肝細胞の増殖制御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 畑 龍 俊 教 授 田 中 紘 一 教 授 山 岡 義 生

### 論 文 内 容 の 要 旨

肝切除、急性肝障害などの病的状況下で認められる肝再生時における肝非実質細胞の役割が重要であることは広く認知されているが、未だ十分な解析はされていない。本研究では、非実質細胞のなかでも種々の増殖因子やメディエーターなどを産生し、細胞外マトリックスの産生中心細胞である星細胞に注目し、肝細胞の増殖に及ぼす役割及びそのメカニズムについて検討した。

両細胞間に働く増殖因子やメディエーター、細胞外マトリックスおよび細胞接触が肝細胞増殖に関与すると考えられる。それらを検討するため①肝細胞単独培養群、②星細胞+肝細胞群、③星細胞単独培養群を作製し無血清下で培養した。②に関しては、細胞接触を伴う共培養群 (Co-mix.) とカルチャーインサートを用いた細胞接触を伴わない共培養群 (Co-sep.) を作製した。各群の肝細胞増殖動態を肝細胞数の変動及び DNA 合成能 (BrdU Labeling Index: BrdU L. I.) にて検討した。肝細胞単独培養群では、接着細胞数が経時的に減少するのに対して (2日目で76%), Co-mix. 群では維持され (2日目で106%), Co-sep. 群では有意な増加を認めた (2日目で135%)。共培養2日後の肝細胞 DNA 合成能 (BrdU L. I.) も単独培養群 (2.4%) に比べ Co-mix. 群で有意に上昇し (25%), Co-sep. 群ではさらに著明に亢進することが判明した (47%)。Co-sep. 群における肝細胞密度を Co-mix. 群の総細胞密度に調整しても DNA 合成能に有意な変化は無かった。

星細胞の産生するメディエーターに注目し、各培養上清中の HGF 濃度を測定したところ全て 6 ng/ml 以下であった。リコンビナント HGF 添加による濃度別効果を検討すると、同濃度では肝細胞 BrdU L. I. は約10%であり、共培養群の BrdU L. I. より明らかに低値であった。HGF 拮抗剤である NK1 は両共培養群の肝細胞 DNA 合成能を有意に減少させた (Co-mix.: 61.7%, Co-sep.: 69.3%) が、EGF 受容体の阻害剤 PD153035 には Co-sep. における肝細胞増殖抑制効果が認められなかった。以上の結果から、星細胞由来肝細胞増殖活性は HGF に由来すると考えたが、濃度検討より HGF のみでは Co-sep. での高い増殖活性は説明できず、他因子の存在を推定した。

HGF の作用を増強する細胞外マトリックスとしてヘパラン硫酸及びヘパラン硫酸プロテオグリカンがある。それらの関与を調べるため、ヘパラン硫酸の分解酵素であるヘパリチナーゼ (20 mU/ml) 及びプロテオグリカンの合成阻害剤である亜塩素酸ナトリウム (25 mM) を共培養 (Co-sep.) に添加すると、肝細胞の DNA 合成能はそれぞれ71.4%と61.3%にまで減弱した。従って、星細胞が産生・分泌するこれらの細胞外マトリックス成分が HGF の増殖効果を高めることが考えられた。

また、両細胞の接触によって肝細胞の増殖抑制が行われている可能性が考えられたので、細胞間ギャップ結合形成を阻害するカルベノキソロンを各培養群に添加したところ Co-mix. 群でのみ DNA 合成能が約1.5倍に増強された。

以上の結果より、肝細胞は無血清下でも星細胞と共培養することによって増殖し、星細胞が産生する HGF、ヘパラン硫酸および分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンのような細胞外マトリックスが肝細胞の増殖を促進させることが判明した。一方、肝細胞—星細胞の細胞間接触によって形成されるギャップ結合が肝細胞の増殖を抑制させる可能性が示唆された。

肝障害後の肝再生において星細胞が重要であることが確認され、その制御が今後の急性肝炎・肝不全治療において展開さ

れると期待される。

### 論文審査の結果の要旨

肝再生における非実質細胞の役割についてはまだ不明な点が多い。本研究では、非実質細胞の一つである星細胞が肝細胞増殖に及ぼす影響について検討された。

無血清下に肝細胞単独培養 (Mono) 群, 細胞接触を伴う共培養 (Co-mix) 群, 細胞接触を伴わない共培養 (Co-sep) 群を作成し比較検討した。Mono 群では, 接着細胞数が減少するのに対して Co-mix 群では維持され, Co-sep 群では有意に増加した。DNA 合成能に関しては, 両共培養群で Mono 群に比べ有意な増加を認めた。両共培養群では, Co-mix 群は Co-sep 群より DNA 合成能亢進の程度が低く, 両細胞の接触が肝細胞増殖抑制に関与している可能性が考えられた。そこで Gap 結合形成阻害剤の肝細胞増殖能への効果を調べたところ, Co-mix 群のみ有意に亢進した。また, 共培養により亢進した肝細胞増殖能は HGF 拮抗剤によって有意に減少したが, EGF 受容体阻害剤では変化がなかった。さらに, ヘパラン硫酸分解酵素及びプロテオグリカン合成阻害剤にて共培養群肝細胞増殖能は有意に低下した。以上の結果は星細胞由来の HGF, ヘパラン硫酸, 分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンによって肝細胞は増殖し, 両細胞間に形成される Gap 結合によって肝細胞増殖が抑制される可能性を示唆する。以上の研究は肝再生の研究及び人工肝臓作製の研究に寄与するところが多い。

したがって, 本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお, 本学位授与申請者は, 平成14年3月27日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。