

氏名・(本籍)	柿原直樹(大阪府)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第338号		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位授与年月日	平成12年3月27日		
学位論文題目	Hypoxic conditions restore lost sensitivity to the growth inhibitory effect of transforming growth factor beta-1(TGF β -1) in proliferating rat hepatocytes in vitro (低酸素条件下培養肝細胞における TGF β -1 の感受性に関する検討)		
審査委員	主査 教授	服部 隆 則	
	副査 教授	木村 博	
	副査 教授	小玉 正 智	

論文内容の要旨

【目的】

Transforming growth factor β -1 は肝細胞において、DNA 合成抑制因子および apoptosis を誘導する因子として知られている。TGF β -1 は肝切後早期より血中に分泌されるが、その DNA 合成抑制効果はみられず肝再生が開始される。

肝再生時には、肝細胞の増殖が肝類洞細胞の増殖より著しく速いために、肝細胞は細胞集塊を造り一時的な低酸素状態に陥る可能性が報告されている。

そこで増殖期肝細胞の TGF β -1 に対する感受性、および低酸素条件における増殖期肝細胞の TGF β -1 に対する感受性の変化を検討した。

【方法】

- 1) ラット初代肝細胞培養を10日間施行し、BrdU labeling index を用いて培養、2、4、6、8、10日目における増殖期肝細胞数を計測した。
- 2) 培養2、5、8、10日目における TGF β -1 の効果を検討するため、TGF β -1 投与48時間後に肝細胞を propidium iodide (以下PI) で染色し、核内の DNA 量を FACS-can で測定した。また培養2、5、8日目の肝細胞における、TGF β receptor type I, II, III mRNA の発現を、Northern blot 法にて検討した。
- 3) TGF β -1 投与後の S 期肝細胞の変化をみるため、TGF β -1 投与後 BrdU でパルスラベリングした後、FITC で label した抗 BrdU 抗体と PI で肝細胞を染色し、FACS-can で S 期肝細胞数の変化を測定した。
- 4) 培養肝細胞に対する低酸素の影響を検討するため、四隅に0.3mmの脚をつけた7×7 cmのガラス板を作成し、このガラス板下の肝細胞が低酸素(培地中酸素分圧=2 mmHg)であることを計測確認した。これを培養2、5、8、10日目に被せ肝細胞を12時間低酸素状態とし、肝細胞核の DNA 量を FACScan で測定した。
- 5) 増殖期肝細胞に対する TGF β -1 と低酸素の影響を検討するため、培養8日目の肝細胞を低酸素条件に置き、TGF β -1 投与後の肝細胞の DNA を FACScan で、また TGF β receptor mRNA の発現を Northern blot 法にて検討した。

【結果】

- 1) 10日間の初代培養肝細胞において、増殖期肝細胞数は培養7日目までわずか数%であったが、培養8日目には約30%に上昇した。
- 2) 培養2、5、10日目では TGF β -1 投与により、80%以上の肝細胞に apoptosis が誘導されたが、培養8日目では apoptosis の誘導は30%に減少した。また TGF β receptor type I, II, III mRNA は、培養2、5、10日目の発現量に比べ培養8日目では低下していた。
- 3) 培養8日目では TGF β -1 投与で、S 期肝細胞数の割合に変化は認められなかった。

- 4) また肝細胞を低酸素条件にした結果、培養2、5、10日目には約70%以上の肝細胞に apoptosis が誘導されたが、培養8日目では apoptosis の誘導率は30%と低下した。
- 5) 培養8日目において、TGF β -1 投与により30%の肝細胞に apoptosis が誘導されたが、低酸素条件下肝細胞に TGF β -1 投与すると、80%以上の肝細胞に apoptosis が誘導された。また低下していた TGF β receptor type I, II, III mRNA の発現量は、低酸素条件下では培養2、5日目の発現量にまで上昇した。

【考 察】

10日間に渡る長期間の初代肝細胞培養を用いて、肝細胞の増殖を検討したところ、Block らの報告とほぼ同様に、培養8日目に肝細胞は DNA 合成期となることが確認された。この長期間培養は、肝再生における TGF β -1 および低酸素条件の、肝細胞に対する効果を検討するには有用と考えた。

そこで、培養2、5、8、10日目に TGF β -1 を投与しその効果を検討したところ、約30%の肝細胞が増殖期にある培養8日目において、TGF β -1 の効果は増殖期肝細胞において有意に抑制された。また TGF β receptor type I, II, III mRNA の発現も低下していた。このことから増殖期でない肝細胞は、TGF β -1 により増殖抑制を受けるが、増殖期肝細胞では、その receptor の発現低下により増殖抑制を受けないことが示唆された。

次に増殖期肝細胞を低酸素条件下に置き TGF β -1 を投与したところ、80%以上の肝細胞に肝細胞死が誘導され、同時に低下していた TGF β receptor type I, II, III mRNA が再発現した。すなわち増殖期肝細胞は、低酸素条件に陥ることで TGF β receptor を再発現し、TGF β -1 に対する感受性を回復することが示唆された。Martines-Hernandez と Amenta は、肝細胞の増殖は肝類洞細胞の増殖より速く開始され、増殖期肝細胞は一時的に細胞集塊を造る。その後肝類洞細胞の増殖によって再生肝の再構築が行われ、増殖期肝細胞は一時的な低酸素状態に置かれる可能性を報告した。また Braum らは、肝再生時における TGF β -1 の役割は、肝細胞の異常増殖を制御するものではないかと提言した。

今回の検討で肝再生時における TGF β -1 の役割は、肝切後早期に肝細胞は増殖期にはいるため、血中の TGF β -1 上昇にもかかわらず肝再生が開始されたが、増殖が進み細胞集塊を造ることにより肝細胞は低酸素条件下に置かれ、TGF β -1 に対する感受性を回復することで、肝再生を終息させるか、肝細胞増殖におけるチェック機構の一因となる可能性が示唆された。

【結 論】

増殖期肝細胞 TGF β -1 に対する感受性が低下している。しかし低酸素条件に置くことで TGF β -1 の感受性が亢進し、失っていた TGF β -1 の作用が再発現することが判明した。

論文審査の結果の要旨

TGF β -1 は肝細胞の増殖抑制因子とされているが、増殖制御の実体はよく分かっていない。申請者は、ラット肝細胞初代培養系の細胞増殖を BrdU で調べ、培養2、5、8と10日目に TGF β -1 を投与し、増殖能の変化、apoptosis (AP) の出現と TGF β receptor の type I, II と III の mRNA の発現などについて調べている。また、これらの低酸素下における変化について検討している。

その結果、初代培養肝細胞の大半は培養8日目に同調的に DNA 合成すること、TGF β -1 を投与すると、培養2、5と10日目には70%以上の肝細胞に AP がおこるのに対し、8日目の増殖期肝細胞では30%ほどに AP の誘導が抑えられること、TGF β receptor mRNA の発現は、2と5日に比して、8日目には低下することが分かった。一方、培養細胞を低酸素下におくと、TGF β -1 投与と同様の変化がみられたが、低酸素下に TGF β -1 を投与すると、AP の誘導率と TGF β receptor mRNA の発現量が再び上昇した。これらのことより、増殖期肝細胞は TGF β -1 に対する感受性が低下しているが、低酸素下では回復することが分かった。

本研究は、肝再生早期における TGF β -1 の役割を明らかにしたもので、肝再生のメカニズム解明に有用であり、博士(医学)授与に値するものと認める。