

[別紙1]

論文の内容の要旨

論文題目 EGFおよびHGF/SFの肝細胞増殖作用の
相加性についての検討

指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

福神浩兼

肝細胞増殖には様々な増殖因子が関与しているが、取り分けEGF、HGF/SFは強力な増殖作用を有し、生理的に重要な増殖因子であることが知られている。ラット初代培養肝細胞に、最大反応量のEGFおよびHGF/SFの両者を同時に作用させると、そのDNA合成には相加性が認められる、という現象は以前より報告されていた。興味深い現象であるが、これまでその詳細な機構に関しては明らかにされていない。

シグナル伝達の側面からみると、EGFおよびHGF/SFはいずれも一回膜貫通型のチロシンキナーゼ型の受容体を介して、その増殖シグナルを細胞内に伝達している。もし両者が全く同じシグナル伝達経路を介しているとしたら、両者とも最大反応量を作用させているので、この相加性は生じないはずである。EGFおよびHGF/SFの下流のシグナル伝達経路には複数のものが関係していることが知られているが、相加性におけるその異同に関しては明らかではない。

また、解剖学的な側面からみると、肝臓の80%を占める実質細胞は均一な集団ではなく、肝小葉内においてZonationの存在することが知られている。肝細胞が門脈側あるいは中心静脈側のどちらに位置するかにより増殖面での性状が異なり、門脈周囲領域の肝細胞(periportal hepatocyte, 略してPPH)はEGFに対して、中心静脈周囲領域の肝細胞(perivenous hepatocyte, 略してPVH)はHGF/SFに対して優位に増殖反応を示すことが知られている。初代培養肝細胞はこれらの混在した細胞であると考えられるが、EGFおよびHGF/SFを同時に作用させた場合、増殖反応の相加性がこれらの反応性の異なる細胞の共存に起因す

るかどうかは明らかではない。

従って、肝細胞増殖作用の相加性の検討には、肝臓の Zonation による肝細胞の heterogeneity に関する側面と増殖因子に関連したシグナル伝達経路に関する側面を考える必要がある。そこで、本研究ではこの EGF および HGF/SF による肝細胞増殖作用の相加性について、1) 肝細胞の Zonation からのアプローチ、および 2) 増殖因子のシグナル伝達経路からのアプローチ、により検討を行った。

まず肝臓の Zonation の観点から EGF と HGF/SF の相加性について検討を行った。Quistorff らのジギトニン/コラゲナーゼ灌流法により、PPH、PVH をラットの肝臓から分離した。PVH: PPH のグルタミン合成酵素 (glutamine synthetase) 活性比は約 13 倍の活性があり、良好な分離効率であった。

そこで、PPH、PVH に対して、10 nM EGF、0.1 nM HGF/SF、10 nM EGF + 0.1 nM HGF/SF を作用させ、DNA 合成を測定した。各々単独で作用させた場合、PPH では EGF > HGF/SF、PVH では HGF/SF > EGF であり、分離が良好であることを示していた。EGF と HGF/SF を同時に作用させると単独の場合より有意に DNA 合成が亢進し、相加性を認めた。すなわち、PPH、PVH において最大反応量の EGF および HGF/SF で誘導される DNA 合成に相加性のあることが明らかとなり、初代培養肝細胞で認められた相加性は、異なる反応性を有する細胞の共存によるものではなく、PPH、PVH の各々が相加性を有していることによるものであることが示された。

次に、細胞内シグナル伝達機構の点から、EGF と HGF/SF の相加性を検討した。EGF と HGF/SF は、いずれも一回膜貫通型のチロシンキナーゼ型受容体を介してそのシグナルを細胞内に伝達しており、MAP キナーゼカスケードはその代表的なものである。そこで、EGF、HGF/SF の投与後に誘導される p42/p44 MAP キナーゼ活性の相加性について検討した。MAP キナーゼ活性は、EGF、HGF/SF 投与後 3 分で測定を行った。

ラット初代培養肝細胞に 10 nM EGF、0.1 nM HGF/SF、10 nM EGF + 0.1 nM HGF/SF を作用させ、MAP キナーゼ活性を測定した。EGF + HGF/SF では MAP キナーゼ活性の相加性は認められなかった。

次に、PPH および PVH に対して 10 nM EGF、0.1 nM HGF/SF、10 nM EGF + 0.1 nM HGF/SF を作用させ、MAP キナーゼ活性を測定した。EGF + HGF/SF では MAP キナーゼ活性の相加性は認められなかった。

すなわち、初代培養肝細胞、PPH、PVH において、10 nM EGF、0.1 nM HGF/SF で誘導される MAP キナーゼ活性には、相加性は認められないことが明らかとなった。また、MAP キナーゼ活性のパターンは、初代培養肝細胞、PPH、PVH のいずれにおいても EGF > HGF/SF のパターンを示し、Zonation による違いは認められなかった。

以上の結果から、本研究により次のことが明らかとなった。(1) ラット初代培養肝細胞において最大反応量の EGF および HGF/SF の同時投与で認められた DNA 合成の相加性は、門脈周囲肝細胞 (PPH) および中心静脈周囲肝細胞 (PVH) でも同様に認められたことより、異なる反応性を有する細胞の共存によるものではなく、肝実質細胞が持つ固有の性質であること。(2) シグナル伝達に関する検討では、初代培養肝細胞、PPH、PVH において EGF および HG

F/SFで誘導される p42/p44 MAPキナーゼ活性に相加性は認められなかった。

相加性に関してDNA合成と p42/p44 MAPキナーゼ活性に相関が認められなかったことより、並列型の細胞内シグナル伝達機構の存在が推測され、相加性を有するシグナル伝達経路の候補として、

- 1) p42/p44 MAPキナーゼ以外のMAPキナーゼファミリーに関係する経路
- 2) MAPキナーゼカスケード以外の経路

などの可能性が考えられた。

p42/p44 MAPキナーゼは古典的MAPキナーゼファミリーのERK1/ERK2に対応するものであるが、最近、この経路とは別に MEK5 - ERK5/BMK1の経路が増殖に関係していることが報告されていることから、このERK5/BMK1を介する経路が関与している可能性も考えられた。

初代培養肝細胞を 100 nM wortmannin で処理後、10 nM EGF、0.1 nM HGF/SFを作用させDNA合成を測定したところ、EGF+HGF/SFでは相加性は不明瞭となった。wortmannin はPI3キナーゼの特異的阻害剤であることから、このことは肝細胞増殖においてPI3キナーゼを介する経路がMAPキナーゼカスケード以外の経路として機能しており、相加性に対して何らかの役割を果たしている可能性があることを示すものと考えられた。

生体内における肝再生の初期過程において、EGFおよびHGF/SFが協同して肝細胞に作用することが知られている。肝細胞にEGF、HGF/SFが各々単独で作用するよりも両者が同時に作用する方が有意に増殖が促進し、相加的であることが実験的に示されたが、このことは肝再生初期における肝細胞増殖が促進的に行われていることを意味し、個体の生存に有利に働いていると思われる。従って、肝細胞増殖の相加性の機構を解明することが、将来的に肝再生を促進する新たな治療法の開発につながる可能性があり、臨床的にも重要と考えられた。