

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Activated Rat Stellate Cells Express *c-met* and Respond to Hepatocyte Growth Factor to Enhance Transforming Growth Factor β 1 Expression and DNA Synthesis.
(活性化星細胞における *c-met* の発現と肝細胞増殖因子による Transforming Growth Factor β 1 発現と DNA 合成促進作用。)

氏 名 池田 均

緒言

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor: HGF) は、肝細胞のみならず多くの細胞の増殖を促進する作用に加え、ある種の癌細胞に対しては増殖を抑制し、さらに器官形成・細胞運動にも関与することから、multipotential factor として注目されている。HGF の受容体である *c-met* は、従来、間葉系由来である非実質細胞には発現しないとされ、従って HGF は実質細胞にのみ作用すると考えられてきた。肝臓においても、実質細胞である肝細胞以外の非実質細胞である星細胞・類洞内皮細胞・Kupffer 細胞に対する HGF の作用の報告は無い。

一方、ラットの肝臓における HGF の作用を検討する過程で、HGF が肝組織中の TGF β (Transforming Growth Factor β) の発現を低下させることが観察された。TGF β は、肝臓において、主に非実質細胞で産生されることが知られている。従って、この事実は、HGF が肝非実質細胞にも直接作用する可能性を示唆するものである。

さらに、HGF を線維肝ラットに投与すると肝線維化が抑制されることが報告された。肝線維化の成立過程において、線維の産生細胞は、主に非実質細胞の星細胞であることが近年明らかとされている。従って、HGF による肝線維化抑制効果は、これ

が星細胞に直接作用した結果であるとも推察される。

本研究では、星細胞における *c-met* 発現と、これに対する HGF の作用につき検討した。

方法

雄性 SD ラットの肝臓からプロナーゼ・コラゲナーゼ消化とメトリザミド密度勾配遠心法により星細胞を単離精製し、プラスチックディッシュ上で培養した。培養 3 日目・10 日目の細胞を各々非活性化細胞・活性化細胞として実験に供した。肝細胞は同ラットの肝臓からコラゲナーゼ消化と低速遠心法により単離し、培養した 3 日目のものを使用した。*c-met* mRNA 発現量はノーザンブロット法により、蛋白発現量はウエスタンブロット法により検討した。また、線維肝は、ラットに四塩化炭素 0.5 ml/kg 体重を週 2 回、8 週間腹腔内に投与することにより作成した。HGF の結合実験は ^{125}I で標識した HGF を用いて行った。DNA 合成量は ^3H -thymidine の取込みにより、コラーゲンと TGF β 1 の mRNA 発現量はノーザンブロットにより、平滑筋 α アクチン蛋白発現量はウエスタンブロットにより、TGF β 1 蛋白発現量はミンク肺上皮細胞 (Mv1Lu cell) を用いた bioassay により、それぞれ検討した。

結果

①星細胞における *c-met* の発現

c-met mRNA の発現は、培養 3 日目の非活性化星細胞には見られなかったが、培養 10 日目の活性化星細胞においては認められた。活性化星細胞における *c-met* mRNA 発現量は培養肝細胞の約 10 分の 1 であった。*c-met* 蛋白発現も、同様に活性化星細胞においてのみ認められた。活性化星細胞に対して HGF は特異的に結合し、Scatchard 解析による K_d 値は 1.5 nM であった。

単離直後の星細胞における、*c-met* mRNA の発現は、正常ラットからの星細胞では見られなかったが、線維肝ラットからの星細胞では認められた。

②星細胞に対する HGF の作用

(1)増殖に対する作用

10 ng/ml の HGF を培養 10 日目の培養液に添加すると、活性化星細胞の DNA 合成は対照の約 1.5 倍となった。この DNA 合成の上昇は 100 ng/ml の濃度でも同等であった。一方、培養 3 日目の非活性化星細胞では HGF を添加しても DNA 合成は変化しなかった。

(2)コラーゲン合成に対する作用

100 ng/ml までの HGF は、培養 10 日目の活性化星細胞のタイプ I プロコラーゲン mRNA 発現量に影響を及ぼさなかった。

(3)平滑筋 α アクチン発現に対する作用

100 ng/ml までの HGF は、培養 10 日目の活性化星細胞の平滑筋 α アクチン蛋白発現量を変化させなかった。

(4)TGF β 1発現に対する作用

10 ng/ml の HGF は培養 10 日目の活性化星細胞の TGF β 1 mRNA 発現量を対照の約 2 倍に増加させた。その増加量は 100 ng/ml の濃度でも同等であった。10 ng/ml の HGF 添加後の TGF β 1 mRNA 発現量は 12 時間をピークとして次第に増加したが、72 時間では対照量にまで低下した。

TGF β 1蛋白量は 10 ng/ml の HGF により対照の約 1.5 倍に増加した。

(5)c-*met* 発現に対する作用

10 ng/ml の HGF は培養 10 日目の活性化星細胞の c-*met* mRNA 発現量を対照の約 2 倍に増加させた。100 ng/ml の濃度でも、その増加量は同等であった。10 ng/ml の HGF 添加後の c-*met* mRNA 発現量は 12 時間をピークに次第に増加したが、72 時間では対照量にまで低下した。

考察

星細胞は肝線維化過程において、活発に増殖し、コラーゲンなど線維成分を過剰に産生する。また、平滑筋 α アクチンなど収縮蛋白の発現、収縮能亢進、PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) の受容体発現も伴い、次第に筋線維芽細胞様に形質変換していく。この状態は活性化と呼ばれている。一方、星細胞をプラスチックディッシュ上で培養すると、肝線維化過程における活性化と同様の変化が起こることが知られている。本研究において、まず培養による星細胞の活性化に伴い、c-*met* が発現することが mRNA・蛋白レベルで確認され、同細胞における HGF の特異的結合が認められた。さらに、c-*met* mRNA は四塩化炭素投与により形成されたラット線維肝より単離した活性化星細胞においても発現していた。

星細胞の活性化に伴う受容体発現の変化としては、PDGF 受容体発現の亢進、TGF β 受容体発現の低下が知られている。前者については、PDGF が星細胞の増殖を促進することから、肝線維化過程における星細胞の増殖を合目的的に説明する現象として意義づけられているが、後者の意義については、線維化を促進する TGF β の受容体が発現低下するだけに不明である。今回明らかとなった星細胞活性化過程における c-*met* 発現に関連して興味を持たれるのは、c-*met* が、myogenic precursor cell に発現し、細胞運動に関連するとの報告である。星細胞も、活性化により筋線維芽細胞様に形質変換し、細胞運動を活発に行う。従って、ある細胞が筋細胞の形質を獲得することや細

胞運動が、*c-met* の発現と関連する可能性が推察され、HGF と肝線維化との関連は、これらの点が検討された上で明らかとなろう。

我々は HGF による肝線維化抑制に着目し、肝線維化に主要な役割を果たす星細胞に対する HGF の直接作用について明らかにする目的で本研究を行った。その結果、培養活性化星細胞において HGF が DNA 合成を促進し、TGF β 1 産生を亢進させることが明らかとなった。従来、HGF は培養星細胞の DNA 合成には影響しないとされてきたが、これらの結果は培養 3 日目の非活性化細胞で得られたものである。受容体が発現していない細胞で HGF の作用が認められなかったことは、当然の結果と考えられる。星細胞の増殖が肝線維化の主徴であり、TGF β 1 が線維化を促進するサイトカインであることを考慮すると、活性化星細胞における HGF の DNA 合成促進と TGF β 1 産生亢進作用は、HGF が肝線維化を促進することを示唆する。一方、ラット線維肝モデルや肝線維化を来すヒト慢性肝疾患において肝組織中の HGF 発現量や血中 HGF 量が増加していることが報告されている。このラット線維肝モデルにおいて、HGF を投与することにより肝線維化が抑制される事実は奇妙である。HGF が高濃度となると線維化を抑制する可能性が想定される。しかし、*in vitro* で HGF を 100 ng/ml の高濃度としても、活性化星細胞に対する作用は 10 ng/ml の濃度で得られた作用と同様であったことから、HGF による肝線維化抑制作用が星細胞に対する直接作用によるとは考えにくい。他方、HGF の肝線維化抑制は血中 GOT・GPT 値の低下を伴うことが示されており、肝細胞障害が軽減された結果、二次的に肝線維化が抑制されたとも考えられる。最近、HGF が脂肪肝、急性肝不全に対しても治療効果を有するとの報告が相次いだ。これらの事実を考え合わせると、肝細胞壊死や炎症を HGF が抑制することによる肝線維化抑制と考えると説明し易い。いずれにしても HGF の肝線維化抑制作用の機序は不明であり、今後の検討が必要である。

我々は、星細胞の活性化過程で *c-met* が発現することを初めて見出し、従来、HGF が作用しないとされてきた同細胞における HGF の増殖促進と TGF β 1 産生亢進作用を明らかとした。この現象が肝線維化に如何に関連するかについて、さらに検討する価値があると考えられよう。