

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博士	氏名	浅井 慶子
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Expression of Neurotrophin and Neurotrophin Receptor and Activation of Stellate Cells in Mouse Liver Regeneration (マウス肝再生における <i>neurotrophin</i> とその <i>receptor</i> の発現及び肝星細胞の活性化の検討)</p> <p style="text-align: right;">共著者名 玉川 進、山本 雅大、本望 聡、吉江 真澄、 徳差 良彦、柳沼 裕二、小川 勝洋</p> <p style="text-align: center;">未公表</p> <p style="text-align: center;">研 究 目 的</p> <p>肝癌はヒトの代表的な悪性腫瘍の一つであるが、発癌の分子的メカニズムは未だ不明な点が多い。その解明において様々な実験動物による実験モデルが存在するが、マウス 2/3 部分肝切除モデルもその一つである。マウス 2/3 部分肝切除モデルでは短期間に残存肝細胞の分裂増殖が起こり数日以内に肝重量が回復する。この反応には様々な増殖因子、サイトカインを介した肝構成細胞の相互作用が必要であり、特に HGF、IL-6、TNF-α 等の働きが注目されている。なかでも nerve growth factor (NGF) は肝癌で発現が亢進している事が明らかにされた、neurotrophin family に属する増殖因子の一つである。NGF は主に神経細胞の分化・生存を促進する事が知られている。NGF には高親和性レセプターである TrkA と低親和性レセプターである p75NTR の二種類のレセプターが知られているが TrkA が主に神経細胞の分化、生存に寄与している。p75NTR に関しては TrkA の補助的役割を担いまたアポトーシスに関わることも指摘されているが未だ不明な点が多い。肝組織においては肝星細胞にその発現があるとの報告もある。本研究において NGF を含めた neurotrophin 及びその receptor の経時的推移とそれが肝再生へ及ぼす影響に関して検討した。また、p75NTR の発現を認める</p>			

おり、炎症、免疫、癌の増殖・進展等の様々な生物学的反応に関与することが明らかになってきた。NGF は性質の全く異なる 2 種類のレセプターに結合する。その一つは TrkA で、チロシンキナーゼ活性を有し、リン酸化反応によって細胞内シグナルが伝達され、おもに細胞の分化や生存に関与する。もう一方のレセプターの p75NTR は TNF α レセプターファミリーに属し、キナーゼ活性を持たず、リガンドが結合するとレセプターの細胞質ドメインに様々な細胞内蛋白がリクルートされて、アポトーシスや生存のシグナルを伝達する。

本研究ではマウス肝再生過程で neurotrophin とそのレセプターの発現を経時的に解析し、また、特に肝星細胞に注目し、星細胞のもつ様々な増殖因子及びサイトカインとしての作用、さらにレセプター発現細胞としての性格とその働き、及び NGF の本来の作用である神経線維誘導能について検討した。

材 料・方 法

実験材料：生後 7-8 週齢の雄性 B6C3F1 マウスに対し、エーテル麻酔科で Higgins & Anderson 法に従い 2/3 部分肝切除を行った。対象としては開腹後部分肝切除を行わない sham-operation マウスを用いた。術後経時的に開腹して残存肝組織を採取し、液体窒素にて凍結後、-80 °C で保存した。また組織学的解析の材料については肝臓を 4 %パラホルムアルデヒド-PBS 溶液にて灌流固定後、パラフィン包埋し連続切片を作製した。

RT-PCR:凍結肝組織より Total RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を作製した。Neurotrophin では β -NGF、BDNF、NT-3、それらのレセプターである TrkA、TrkB、TrkC、p75NTR、さらに肝再生に重要な働きをするという HGF の特異的プライマーを合成し、cDNA をテンプレートとして PCR を行い、これらの mRNA の発現を検討した。

免疫染色：免疫染色は抗 NPY, p75NTR, desmin を一次抗体として ABC 法にて行った。NPY 陽性線維はグリソン鞘動脈壁に特に多く認められるため、グリソン鞘の動脈壁周囲の陽性線維の数を計測し、血管全周の長さを NIH image を用いて数値化したものと比し相対的に評価した。p75NTR 及び desmin 陽性細胞は視野は 400 倍で合計 10 視野を計測した。又、一部のマウスには屠殺一時間前に BrdU 50 μ g/体重 g を腹腔内投与して抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色により BrdU 標識率を測定した。

肝星細胞及び肝細胞の初代培養：肝星細胞、肝細胞は生後 7-8 週齢のマウスから分離した。肝星細胞の分離はプロテアーゼ・コラゲナーゼ灌流法により全細胞を分離したのち、Optiprep 法により星細胞のみを分離・精製した。これらの細胞は無血清 DMEM 溶液、無血清 NGF 添加 DMEM、血清添加 DMEM、血清・NGF 添加 DMEM を用いて培養し、経時的に形態変化を観察すると共に、培養開始 3 日目の生細胞数を MTT 法にて測定した。一方、コラゲナーゼ灌流法により肝細胞を分離し、Percoll 法により生細胞を精製したのち、上記の星細胞の各培養上清を用いて培養し、3 日目の生細胞数を MTT 法により測

定した。

結 果

Neurotrophin の発現：RT-PCR の結果、NGF は正常肝ではごくわずかしか発現していなかったが、部分肝切除群では術後 12 時間目から増加し 14 日目まで発現が見られ、3 日目でピークを示した。sham operation 群では、部分肝切除群に比較して発現の上昇はごくわずかであった。BDNF、NT-3 は正常でもごくわずかに見られたが、部分肝切除群、sham operation 群のいずれにおいても経時的変化は見られなかった。

Neurotrophin receptor の発現：TrkA、TrkB、TckC は、RT-PCR でいずれも発現が低く、正常、部分肝切除及び sham operation 群で変化が見られなかった。p75NTR は術後 12 時間目より発現上昇して 3-4 日でピークを示し、その後、断時低下した。p75NTR 免疫染色では肝星細胞に一致して陽性反応が見られ、正常肝組織では一部の肝星細胞に陽性であったが、部分肝切除後は陽性肝星細胞が増加して 3-4 日でピークに達し、その後、低下した。一方、sham operation 群では p75NTR 陽性星細胞の増加はわずかであった。さらに、肝星細胞での p75NTR 発現を確認するために、正常肝組織及び部分肝切除後 3 日目の肝組織より分離した肝星細胞で RT-PCR により p75NTR の発現を調べたところ、全肝組織に比較して強い発現がみられた。

肝星細胞の活性化と HGF の産生：分離肝星細胞を初代培養したところ、正常から分離したものは無血清 DMEM ではほとんどが数日以内に死滅したが、術後 3 日目の肝星細胞は著明に突起を延して伸展・大型化し、活性化星細胞の特徴を示した。それらの星細胞の培養上清を初代培養肝細胞に加えたところ、細胞数の増加が見られた。この働きが HGF によるか否かを明かにするために、RT-PCR により HGF の発現を検討したところ、正常肝ではほとんど発現していなかったが、再生肝では術後 12 時間から上昇して 3-4 日目でピークに達し、その後低下した。さらに分離肝星細胞について RT-PCR により HGF の発現を調べたところ、正常肝、再生肝から分離した肝星細胞のいずれにも HGF の発現が見られた。また、分離星細胞では IL-6 の発現も確認された。

NGF の肝星細胞に対する作用：正常及び術後 3 日目の再生肝から分離した肝星細胞を無血清条件下で NGF を添加したところ、非添加にくらべて生細胞数が減少した。しかし、血清添加の条件では NGF のこの効果は見られなかった。一方、正常肝より分離した肝星細胞では NGF の有無にかかわらず培養後生細胞数は減少した。

肝神経線維の増加：NPY 陽性の神経線維は正常肝組織ではグリソン鞘に局限し、主に動脈の周囲にわずかに見られ、また、その数は小さなグリソン鞘に比較して大きいグリソン鞘で多かった。一方、再生肝では術後 12 時間目からグリソン鞘の神経線維の密度が増加し、3-4 日目では約 2 倍に達した。

考察

本研究では、2/3 部分肝切除のマウス再生肝で NGF の発現が亢進する事が明らかになった。NGF は主に神経の生存・維持・分化に重要な働きをもつとともに、最近、非神経系組織にも重要な働きを示し、免疫、創傷治癒、発癌などにも関与する事が報告されているが、さらに本研究の結果から肝再生にも深く関与することが明らかになった。NGF の発現は術後 24 時間から発現し、3 日目でピークに達し、7 日目まで持続したことから、肝再生の初期化よりも増殖または終息に関与することが示唆された。一方、他の neurotrophin である BDNF, NT3 については正常肝でわずかに発現していたが、再生肝では変化が見られず、肝再生に積極的に関与する証拠は得られなかった。

NGF の標的となる細胞を調べるために Trk family および p75NTR の発現を調べたところ、p75NTR の発現が増殖期、終息期に一致して上昇した。また、免疫染色により p75NTR は肝星細胞に特異的に発現することが明らかになった。肝星細胞は肝細胞の増殖や生存に関与することから、正常肝と 3 日目の再生肝から星細胞を分離して初代培養を行ったところ再生肝からの星細胞は大きく伸展して活性化状態を示し、HGF, IL-6 を産生することが明らかになった。この結果は、部分肝切除後の肝再生において主に肝星細胞が肝細胞の増殖に必要な因子を産生することを初めて証明したものである。

一方、p75NTR は、リガンドである NGF が結合したのち、細胞質ドメインに様々な蛋白がリクルートされて、時には apoptosis、また時には survival といった複雑な働きをもつレセプターである。そこで分離肝星細胞に対して NGF を加えたところ、細胞死により細胞数が減少した。したがって、肝星細胞は HGF, IL-6 などの肝細胞増殖因子を産生する一方で p75NTR を発現することにより NGF を介して死のシグナルを受け取り、自らの機能を制御している可能性が考えられた。しかし、NGF のこの作用は培養液中に血清を加えることにより消失することから血清中には肝星細胞に対する生存と死の因子が存在し、そのバランスにより生死が決定されているものと考えられる。

一方、もう一つのレセプターである TrkA については正常肝、再生肝で RT-PCR によりごくわずかに検出できたが、再生過程での変化は見られなかった。しかし、TrkA は神経細胞に恒常的に発現しており、また、肝グリソン鞘には神経線維が分布していることから再生肝における神経線維の変化を調べたところ、NGF の発現亢進にともなってグリソン鞘動脈壁に神経線維の増加を認めた。神経細胞は VEGF, NPY のような血管新生因子を産生することから血管の発達と関係している可能性が考えられる。また、我々は以前に肝動脈壁に TrkA の発現が認められる事が報告されていることから、NGF は直接的に血管新生にも関与している可能性も考えられる。





結論

1. マウス肝再生過程では NGF の発現が亢進する。
2. 肝再生過程では、肝星細胞が活性化して HGF, IL-6 を産生する一方、p75NTR を発現して NGF から死のシグナルを受け取り自らの機能を制御すると考えられる。
3. NGF は肝の神経を発達させることにより、肝再生に促進的に働く可能性が考えられる。

参考文献

- Kishibe, K., Yamada, Y. and Ogawa, K. Production of nerve growth factor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrkA in tumor-associated arteries in mice. *Gastroenterology* 122: 1978-1986, 2002
- Roux, P. P. and Barker, P. A.: Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol.* 67: 203-233, 2002

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	浅井 慶子
審査委員長 <u>葛西真一</u> 			
審査委員 <u>吉田成孝</u> 			
審査委員 <u>原泷保明</u> 			
審査委員 <u>小川 隆洋</u> 			
<h3 style="margin: 0;">学位論文題目</h3> <p style="margin: 0;">Expression of Neurotrophin and Neurotrophin Receptor and Activation of Stellate Cells in Mouse Liver Regeneration</p> <p style="margin: 0;">(マウス肝再生における <i>neurotrophin</i> とその <i>receptor</i> の発現及び肝星細胞の活性化の検討)</p>			
<p>マウス 2/3 部分肝切除モデルでは短期間に残存肝細胞の活発な分裂増殖が起こり、数日内に肝重量が回復する。この反応には様々な増殖因子、サイトカインを介した肝構成細胞の相互作用が必要であるが、特に最近 nerve growth factor (NGF) が肝再生に関与する可能性が報告されている。NGF は neurotrophin family の一つで、主に神経細胞の分化・生存を促進する。NGF には高親和性レセプターである TrkA と低親和性レセプターである p75NTR の二種類のレセプターが知られており、TrkA は主に神経細胞の分化・生存に関与し、p75NTR は TrkA の補助またアポトーシス・生存に関わるとされている。</p> <p>本学位論文提出者らは、第一に肝再生過程における NGF を含めた neurotrophin 及びその receptor 発現の経時的変化を検討した。neurotrophin については、NGF は正常肝ではごくわずかしき発現していなかったが、部分肝切除群では術後 12 時間目から増加して 3 日目でピークを示し、14 日目まで発現が見られた。しかし、sham operation 群では、発現の上昇はごくわずかであった。他の neurotrophin である BDNF、NT-3 は正常でもごくわずかに見られたが、部分肝切除群、sham operation 群のいずれにおいても経時的変化は見られなかった。neurotrophin receptor に関しては、TrkA、TrkB、TrkC は、いずれも発現が低く、正常、部分肝切除及び sham operation 群で変化が見られなかったが、p75NTR は術後 12 時間目より発現上昇して 3-4 日でピークを示し、その後、暫時低下した。p75NTR 免疫染色では肝星細胞に一致して陽性反応が見られ、正常肝組織では一部の肝星細胞にのみ陽性であったが、部分肝切除後は p75NTR 陽性肝星細胞が増加して 3-4 日でピークに達し、その後、低下した。さらに、正常肝組織及び部分肝切除後 3 日目の肝組</p>			

織より分離した肝星細胞で p75NTR の発現を調べたところ、再生肝から分離したもので強い発現がみられた。つぎに、分離肝星細胞を初代培養したところ、正常肝組織から分離したものは無血清培地ではほとんどが数日以内に死滅したが、部分肝切除後 3 日目の肝星細胞は著明に突起を延して伸展・大型化し、活性化肝星細胞の特徴を示した。さらに、再生肝から分離した肝星細胞の培養上清を初代培養肝細胞に加えたところ、細胞数の増加が見られた。この働きが HGF によるか否かを明かにするために、再生肝で HGF の発現を経時的に検討したところ、正常肝ではほとんど発現していなかったのに対して、再生肝では術後 12 時間から上昇して 3-4 日目でピークに達し、その後、低下した。分離肝星細胞についても、再生肝からの肝星細胞では著明な HGF の発現が見られ、さらに IL-6 の発現も確認された。一方、この活性化肝星細胞の培養液中に NGF を加えたところ、著明な細胞死が起り、細胞数が減少し、また再生肝組織内でも肝星細胞のアポトーシスが観察された。以上の結果を総合すると、肝再生に伴って肝星細胞が活性化して HGF、IL-6 を産生し、それらはパラクライン因子として肝細胞の増殖を促進するが、NGF と p75NTR の発現は活性化肝星細胞の細胞死を促進し、増殖反応の終息をもたらす可能性が考えられる。

本論文の結果は、肝再生のメカニズムに関して画期的な知見をもたらしたと言える。また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の結果から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位に値すると判定した。