

Title	タウリン抱合型ウルソデオキシコール酸の肝細胞増殖抑制効果に関する研究
Author(s)	北, 嘉昭
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39040
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	北 嘉 昭
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11824 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	タウリン抱合型ウルソデオキシコール酸の肝細胞増殖抑制効果に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 宮坂 昌之 (副査) 教授 内田 守人 教授 三木 直正

論文内容の要旨

【目的】

近年、ウルソデオキシコール酸(UDC)が自己免疫機序の推定されている原発性胆汁性肝硬変(PBC)に有効であるとの報告がなされている。そのメカニズムの可能性として、UDCの免疫担当細胞の増殖に対する抑制作用が明らかになりつつある。

一方、PBCは増殖性肝疾患と考えられているが、UDCが肝細胞の増殖に直接に影響を与えるかどうかについては明らかにされていない。そこで、本実験では、hHGFで誘導されたラットの初代培養肝細胞のDNA合成に与えるUDCの効果を検討した。

【方法ならびに成績】

ラットから単離した肝細胞を24時間培養後、以下の実験を行った。まず、UDCのタウリン抱合型であるtaoursodeoxycholate(TUDC)および生体内に多く存在するコール酸のタウリン抱合型であるtaurocholate(TC)の肝細胞に対する障害性を肝細胞の培養上清のLDH活性の測定、trypan blue dye exclusion test, fluorescein diacetate(FDA)による蛍光染色によって判定したところ、24時間添加におけるTUDCおよびTCのnon-cytotoxic doseは2mM以下と考えられた。

次に、hHGFの18時間添加によって誘導されたラット肝細胞のDNA合成に与えるTUDC、TCの効果を評価するため、0.125-2mMのTUDCと4ng/mlのhHGFを同時に肝細胞に添加し、18時間培養後に³H-チミジンのDNAへの取り込みを測定した。その結果、TUDC、TCともに0.125-2mMの全ての濃度で、hHGFによって誘導されるDNA合成を濃度依存的に有意に抑制した。また、この効果は、TUDCがTCより全ての濃度で有意に強かった。

また、hHGFの24時間添加によって誘導されたラット肝細胞のDNA合成に与えるTUDCの効果を、肝細胞の核内へのBrdUの取り込みによって評価した。培養肝細胞にhHGF(4ng/ml)を添加してから12時間後に、BrdU(最終濃度50μM)を14時間添加し、肝細胞の核内に取り込まれたBrdUの免疫細胞染色を行った。その結果、WE培養液のみの群では、labeling index(LI)は2±1%であったが、hHGF(4ng/ml)を添加した群では、LIは20±5%と増加した。また、これにTUDC 2mMを追加して添加することによりLIは6±2%まで抑制された。

さらに、TUDCを添加する時期によってDNA合成の抑制の程度に差異が認められるかどうかを検討するため、hHGF(4ng/ml)の添加前3時間とhHGF添加後の18時間を3時間毎に分割してTUDC(2mM)を添加した後、

³H-チミジンのDNAへの取り込みを測定したところ、DNA合成は3時間のTUDCの前処理によって抑制されなかったが、hHGF添加後投与ではいずれの添加時間群でも有意に抑制された。また、この抑制効果は、添加時間が後になるほど大きくなる傾向があり、12-15時間添加時に最大の効果(70%抑制)を示した。

最後にTUDCのhHGFに対する直接的な影響や、hHGFと肝細胞膜上のhHGF-receptorとのbindingを阻害している可能性を除外するために、hHGF(4 ng/ml)を0-3時間、0-6時間、0-12時間添加後に12-18時間TUDC(2 mM)を添加して、DNA合成を測定した。その結果、DNA合成はhHGFの添加時間が長くなるにつれ有意に増加したが、6時間のTUDCの添加によりいずれの群でもTUDCを添加しない群に比して有意な抑制効果が認められた。

【総括】

以上より、TUDCは培養肝細胞の細胞障害性を来さない濃度域で、hHGFにより誘導されるDNA合成を濃度依存的に有意に抑制することが明らかになった。また、TUDCの前処置によってはDNA合成は全く抑制されないこと、TUDCとhHGFが同時に存在しない条件でもこの抑制効果が認められることから、この効果は、TUDCがhHGFの活性や、hHGFと肝細胞膜上のhHGF-receptorとのbindingを直接阻害していることによるものではないことが推察された。また、最大の抑制効果が認められたhHGF添加後12-15時間は、肝細胞へのチミジンの取り込みが高まる時期と一致していることから、TUDCは、hHGFの肝細胞の増殖に関するシグナルが既に伝達されてからの肝細胞の増殖反応に何らかの形で抑制しているのではないかと推察された。

論文審査の結果の要旨

ウルソデオキシコール酸(UDC)が自己免疫機序の推定されている原発性胆汁性肝硬変(PBC)に有効であることは臨床で証明されているが、そのメカニズムの1つとしてリンパ球機能の抑制が考えられている。一方、UDCが最も効果があるとされるPBCの初期には、肝細胞の増殖能が高まっていることが報告されており、この観点から、PBCは肝細胞の増殖性疾患とも言える。しかし、UDCが肝細胞の増殖に直接影響を与えるかどうかについては実験的に明らかにされていなかった。本研究では、この点を明らかにするために、ヒト肝細胞増殖因子(hHGF)で誘導されたラットの初代培養肝細胞のモデルを用いて、肝細胞増殖に与えるUDCの効果について検討した。

本実験では、UDCのタウリン抱合型であるtauroursodeoxycholate(TUDC)を用い、まず、肝細胞に細胞傷害を与えない胆汁酸の濃度と時間の条件下で、hHGFによって誘導された肝細胞のDNA合成に与えるTUDCの抑制効果を検討した。その結果、TUDCは、肝細胞の蛋白合成を全く変化させないにも関わらず、用量依存的にDNA合成を抑制した。また、腫瘍細胞を用いた実験では、TUDCの細胞増殖抑制効果が、可逆的であることと、この効果が細胞周期の停止に帰するものではないことも明らかにした。結論として、TUDCの細胞増殖の抑制効果は、TUDCの界面活性作用によるものではないこと明らかにした。

以上から、本研究はUDCの細胞増殖抑制効果を立証し、臨床的に知られているUDCの効果のメカニズムについて新しい可能性を示唆した上で重要であり、学位に値するものと思われる。