



Title	Intracellular calcium as a second messenger for human hepatocyte growth factor in hepatocytes
Author(s)	金子, 晃
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39275">https://hdl.handle.net/11094/39275</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	金子
かね こ	あきら 晃
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 11446 号
学位授与年月日	平成 6 年 5 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Intracellular calcium as a second messenger for human hepatocyte growth factor in hepatocytes (肝細胞増殖因子の細胞内情報伝達系としての肝細胞内カルシウム動態の検討)
論文審査委員	(主査) 教授 鎌田 武信 (副査) 教授 中村 敏一 教授 松沢 佑次

### 論文内容の要旨

#### [目的]

肝細胞増殖因子 (HGF) は肝細胞における強力な増殖因子として発見され、肝細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、そのレセプターが tyrosine kinase domain を有する癌遺伝子である c-met product であることが明らかにされ注目を集めているが、レセプター以降の細胞内情報伝達系については明らかにされていない。そこで、我々は HGF の細胞内情報伝達系を解明する目的で、細胞内セカンドメッセンジャーの主役の一つである細胞内 Ca動態について検討し、さらに細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられている  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter の活性化にともなう細胞内 pH の動態についても検討を行った。

#### [方法]

SD系雄性ラット肝臓から 2 step collagenase perfusion 法に従い肝細胞を分離し、5% fetal bovine serum,  $10^{-6}$  M dexamethasone,  $10^{-6}$  M insulin を含む Williams E 培地で type I collagen にて coating 処理したカバーグラス上にまき、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件にて培養した。一定時間培養した肝細胞の培地を  $5 \mu\text{M}$  fura-2/AM を含む Hanks - HEPES buffer (pH7.4) と交換し、60~80分間  $37^\circ\text{C}$  で incubation して fura-2を肝細胞に負荷した。fura-2を負荷した細胞の蛍光は浜松ホトニクスの ARGUS - 100測定システムを用い単一細胞レベルにて測定し、340nm および 380nm 励起による 510nm の蛍光比から、あらかじめ作成しておいた標準曲線を用いて細胞内 Ca 濃度に換算した。細胞内 pH の測定は  $5 \mu\text{M}$  BCECF/AM を含む Hanks - HEPES buffer (pH7.4) にて 60~80分間  $37^\circ\text{C}$  で incubation して BCECF を肝細胞に負荷し、450nm および 490nm 励起による 520nm の蛍光比を測定後、引き続き種々の pH の KCl - nigericin 溶液 (pH7.0~7.8) を灌流し、それらの蛍光比から in situ calibration 法により細胞内 pH に換算した。

#### [成績]

##### (1) HGF 刺激による肝細胞内 Ca動態

0.1nM HGF の刺激により肝細胞内 Ca の周期的な上昇、すなわち Ca oscillation が観察された。この HGF

による Ca oscillation は細胞によって反応までの latency および oscillation の frequency が異なっていた。さらに HGF による Ca oscillation は phenylephrine などの Ca mobilizing hormone によるものとは性状が異なり、やはり肝細胞の増殖因子である EGF 刺激によるものとそのパターンが類似していた。また、細胞外の Ca 濃度を free にしておくと細胞内 Ca の最初のスパイクは認められていたが、それに続くスパイクは消失した。HGF による Ca の反応は濃度依存性が認められ、0.1nM でピークとなった。また、HGF による Ca の反応性は高密度で培養した場合、培養 2 時間から 5 時間でピークとなったが、低密度で培養した場合は培養後速やかに反応性が低下した。

## (2) HGF 刺激による肝細胞 pH 動態

0.1nM HGF の刺激により多くの細胞において細胞内 pH は刺激数分後より徐々に上昇し始め、0.1 程度の上昇を示した後平衡状態となった。この HGF による細胞内 pH の上昇は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter の阻害剤である amiloride の前処置により阻害された。一方、tyrosine kinase inhibitor である genistein の前処置によっても HGF によって引き起こされる細胞内 pH の上昇は抑制された。また、C kinase inhibitor である H7、および A kinase inhibitor である H8 によっては HGF による細胞内 pH の上昇は影響されなかったが、calmodulin inhibitor である W7 によっては細胞内 pH の上昇は抑制された。さらに、細胞内 Ca プールである ER の Ca-ATPase 阻害剤である thapsigargin により HGF による細胞内 Ca の上昇が抑制されると同時に、細胞内 pH の上昇も抑制された。一方、phenylephrine (10  $\mu$  M) の刺激では細胞内 pH の上昇は起こらなかった。

### [総括]

- (1) HGF により肝細胞において Ca oscillation が惹起されたが、この Ca oscillation のパターンは情報伝達系により規定されることが考えられ、HGF においても EGF 同様 PLC- $\gamma$  を介していることが推察された。また、Ca oscillation の形成には細胞外からの Ca の流入が必要であると考えられた。さらに、HGF による Ca の反応が培養の密度および時間依存的であることより、細胞周期依存的に Ca の反応性が規定されることが想定された。
- (2) HGF は肝細胞膜の  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter を活性化し、細胞内 pH の上昇を引き起こした。この HGF による  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter の活性化には tyrosine kinase から Ca, calmodulin の系が関与しているが、同時に他の伝達系の活性化が必要であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

HGF は肝細胞における強力な増殖因子であり、肝細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられている因子である。その作用メカニズムを明らかにするためには HGF の細胞内情報伝達系の解明が必須であり、その解明が待たれるところであったが、本研究において細胞内 Ca が HGF の肝細胞情報伝達系の一つとして働いていることを明らかにした。しかも、そのシグナルが Ca oscillation という形で発現され、その反応性が細胞周期依存性に規定されていることが示唆された。

また、細胞増殖において重要な役割を果たしていると考えられている  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter が HGF によって活性化され、しかもその活性化に Ca - calmodulin の系が関与していることを明らかにした。これらの情報伝達系の解明は HGF による肝細胞増殖のメカニズムを知る上で極めて重要な意味を持つものと考えられる。

本研究は HGF の細胞内情報伝達系の一部を解明した点において独創的であり、学位に値すると判断する。