

Title	Role of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor as a Hepatotrophic Factor in Rat Liver Regeneration After Partial Hepatectomy
Author(s)	木曾, 真一
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39486">https://hdl.handle.net/11094/39486</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">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	木 曾 真 一
博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医 学 )
学 位 記 番 号	第 1 2 2 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 2 月 2 2 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	Role of Heparin - Binding Epidermal Growth Factor - Like Growth Factor as a Hepatotrophic Factor in Rat Liver Regeneration After Partial Hepatectomy (ラット部分肝切除後の肝再生におけるヘパリン結合性EGF様増殖因子の肝再生因子としての役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松 沢 佑 次 (副査) 教 授 鎌 田 武 信 教 授 谷 口 直 之

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目 的】

肝臓はきわめて再生能力の強い臓器であり、実験的にラットの肝臓を70%切除しても7-10日後には元の肝重量、肝機能に回復することが知られている。これまで肝再生因子として hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), epidermal growth factor (EGF) などが知られている。しかし、肝再生の機構はいまだに完全に解明されてはいない。

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) はEGF様のドメインを有し、EGF receptor を受容体とするEGFファミリーの一つである。私共は、これまでにHB-EGFがin vitroで初代培養肝細胞に対して濃度依存性にDNA合成を促進させることを明らかにしてきた。本研究は、部分肝切除後の再生肝におけるHB-EGFの発現動態および発現細胞について検討することにより肝再生におけるHB-EGFの意義を明らかにすることを目的とした。

#### 【方 法】

##### 1. 70%部分肝切除後の再生肝内におけるHB-EGF遺伝子の発現動態

SD系雄性ラット(200g)を用い、HigginsとAndersonの方法に準じ70%部分肝切除を施行した。肝切除施行後0, 1.5, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 120時間目に残存肝からpoly(A)<sup>+</sup>RNAを抽出した。HB-EGFおよびHGF, TGF- $\alpha$ , EGFの遺伝子発現は、rat HB-EGF, HGF, EGF cDNAおよびrat TGF- $\alpha$  oligonucleotideをprobeとして用いNorthern blot法にて検討した。

##### 2. 肝におけるHB-EGF産生細胞の同定

(A) 肝切除後6時間の肝臓をcollagenaseにて灌流し、遠心法にて肝実質細胞と肝非実質細胞に分離し、Northern法にてHB-EGF遺伝子の発現を検討した。

(B) さらにelutriation roterを用い肝非実質細胞をクッパー細胞、類洞内皮細胞、伊東細胞に分離し、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にてHB-EGF遺伝子の発現を検討した。

### 3. 再生肝内における HB-EGF 蛋白の発現

正常肝および肝切除10時間後の肝より膜分画蛋白を分離し、ヘパリンカラムにより精製した後、抗 HB-EGF 抗体を用い Western blot 法にて HB-EGF 蛋白の発現を検討した。HB-EGF 遺伝子を導入し HB-EGF 蛋白を過剰に産生する Vero H 細胞を positive control に用いた。

### 4. 肝再生時の EGF 受容体数の変化

正常肝および肝切除後6, 12, 24時間目の残存肝から膜分画蛋白を分離し、 $[^{25}I]$  標識 EGF を用いた結合実験により肝切除後の EGF 受容体数の変化を検討した。

#### 【成績】

1. HB-EGF 遺伝子は肝切除後1.5時間ですでに発現の上昇をみとめ6時間で発現のピークをとった。densitometer にて遺伝子発現量を測定した結果では切除前に比して最大7倍まで増加していた。肝内 HGF 遺伝子発現はすでに報告されているごとく12時間より上昇し24時間でピークとなった。TGF- $\alpha$  遺伝子は、肝切除6時間でごくわずかに発現を認めそのピークは24~48時間であった。EGF 遺伝子は poly (A)<sup>+</sup> RNA を用いた Northern 法では検出できなかった。一般に肝切除後 DNA の合成は24時間後にピークになるとされているが、これに先立ち HB-EGF 遺伝子発現の著明な上昇が認められた。HB-EGF は、部分肝切除後の肝再生早期に発現すると考えられた。
2. (A) 肝切除後6時間の肝臓から得た肝実質細胞と肝非実質細胞分画で HB-EGF 遺伝子の発現を検討した結果、肝非実質細胞において HB-EGF 遺伝子の著明な発現増加を認めた。  
(B) elutriation roter を用いて分離したクッパー細胞、類洞内皮細胞、伊東細胞における HB-EGF 遺伝子の発現を RT-PCR 法にて検討した結果、主たる HB-EGF の発現細胞はクッパー細胞と類洞内皮細胞であった。このことより HB-EGF は paracrine 機構により肝細胞の増殖を調節していると考えられた。
3. HB-EGF 蛋白は肝切除後10時間で正常肝の約2.8倍に増加しており、HB-EGF は蛋白レベルでも肝切除後の増加を認めた。
4. HB-EGF の受容体である EGF receptor は肝切除後6, 12, 24時間目には、それぞれ正常肝の53.7, 62.1, 77.2%であり、肝切除後早期に receptor の downregulation がみられた。

#### 【総括】

ラット70%部分肝切除後の再生肝内で、HB-EGF 遺伝子は HGF, TGF- $\alpha$  よりも早期に発現し、初期の肝再生に重要な因子であることが明らかになった。HB-EGF は、主としてクッパー細胞、類洞内皮細胞で産生され paracrine 機構により部分肝切除後の肝再生を調節していることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

肝臓の再生能力は、極めて強いことが知られている。これまで、肝再生因子として hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), epidermal growth factor (EGF) などが知られているが、肝再生の機構はいまだ完全に解明されてはいない。

本研究では、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) が強力な肝細胞の増殖促進作用を有することを明らかにするとともに、同増殖因子が再生肝内において TGF- $\alpha$  や HGF 等よりも早期に発現することを明らかにした。さらに再生肝内での HB-EGF の発現細胞が類洞内皮細胞、Kupffer 細胞であることを同定し、HB-EGF が paracrine 機構で肝再生を調節していることを示した。また HB-EGF が in vitro において HGF, TGF- $\alpha$  遺伝子を誘導することを明らかにし、部分肝切除後の再生肝内における HB-EGF を中心とした増殖因子間のネットワークの存在の可能性を示した。

これらの結果は、再生肝における肝再生因子としての HB-EGF の重要性を明らかにした最初の知見であり、肝再生の分子機構解明に資するところ大であり学位に値するものと考えられる。