

Title	Effects of growth factors on the growth and differentiation of mouse fetal liver epithelial cells in primary culture
Author(s)	川崎, 貴子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46302">https://hdl.handle.net/11094/46302</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	川崎 (太田) 貴 子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19834 号
学位授与年月日	平成 17 年 10 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Effects of growth factors on the growth and differentiation of mouse fetal liver epithelial cells in primary culture. (各種増殖因子がマウス初代培養胎生中期肝細胞の増殖、分化に及ぼす影響について)
論文審査委員	(主査) 教授 下村伊一郎  (副査) 教授 林 紀夫 教授 門田 守人

## 論文内容の要旨

## 〔 目的 〕

肝臓の原基はマウスにおいて胎生 8 日 (E8) 頃の腹側内胚葉から発生し、その後肝前駆細胞から肝細胞や胆管上皮細胞への分化が起こり、次第に成熟した肝臓となることが知られている。胎生期の肝臓の増殖、分化には各種増殖因子 (GFs) の関与が示唆されているが、胎生中期肝臓における GFs の役割は未だ十分には検討されていない。本研究では、マウス胎生中期肝細胞に対する各種 GFs の増殖及び分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 〔 方法ならびに成績 〕

動物種として ICR マウスを、GFs として HGF、HB-EGF、bFGF、EGF、TGF- $\alpha$  を用いた。マウス胎生中期肝細胞の分離は以下の手順で行った。胎生期肝臓を細かく刻み、肝細胞分離液で細胞を分離後、低張液を用いて、血球系細胞を溶血除去した。得られた細胞を単層培養し、数時間後に培地交換をすることにより非付着細胞を除去した。この方法により胎生期肝臓に含まれていた造血系細胞や非付着細胞が除去され、得られた細胞の大部分は胎生肝細胞 (fetal liver epithelial cells : FLEC) であると考えられた。成熟肝細胞の分離は、コラゲナーゼ液を用いた肝還流法で行った。

発生過程における肝組織での GFs の発現を明らかにする目的で胎生期、新生児期、成熟期の肝臓における HGF、HB-EGF、bFGF、EGF、TGF- $\alpha$  遺伝子発現を SYBR Green、イメージアナライザーを用いた定量的 RT-PCR 法にて検討した。いずれの時期の肝臓においてもこれらの GFs 遺伝子が発現していた。またいずれの GFs も検討した最初のポイントである E12.5 より漸増し、生後 2-4 日目頃に最も多く発現していた。

E13.5、E14.5 の FLEC 及び成熟肝細胞における増殖因子受容体の発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。検討したいずれの時期の肝細胞においても c-met、EGF 受容体、FGF 受容体の遺伝子発現が認められた。c-met は成熟肝細胞で最も多く発現していたが、EGF 受容体、FGF 受容体の発現量は FLEC と成熟肝細胞に明らかな差を認めなかった。これらのことから GFs の発現が胎生期の肝臓の発生に関与している可能性が考えられた。

各種 GFs が FLEC の増殖に及ぼす影響は GFs 非存在無血清培地で培養した細胞をコントロールとして

$^3\text{H}$ -thymidine の取り込みで検討した。コントロール FLEC の DNA 合成は成熟肝細胞の約 2 倍であり、FLEC は成熟肝細胞に比し増殖能が高いことが明らかになった。各種 GFs の添加により DNA 合成能は濃度依存的に増加し、FLEC ではコントロールの約 1.5-2 倍、成熟肝細胞ではコントロールの約 2-4.5 倍となった。FLEC の DNA 合成は各種 GFs により増加するが、本来の増殖能が高いため成熟肝細胞に比し GFs 添加による増加率が低くなった可能性が考えられる。

次に各種 GFs が FLEC の分化に及ぼす影響を明らかにする目的で肝特異遺伝子発現に対する効果を検討した。コラーゲンゲルを用いて FLEC を三次元培養し、各種 GFs 存在下で 6 日間培養後の FLEC における HNF-4、AFP、アルブミンおよび  $\alpha_1$  アンチトリプシン遺伝子の発現量を Northern blot にて検討した。HNF-4 遺伝子の発現は E13.5FLEC では HB-EGF 刺激時に、E14.5FLEC では HGF、HB-EGF 刺激時に高い増加率を示した。AFP 遺伝子の発現は E13.5FLEC では HB-EGF、EGF 刺激時に、E14.5FLEC では HGF、HB-EGF 刺激時に高い増加率を示した。アルブミン遺伝子の発現は E13.5FLEC では HB-EGF、EGF 刺激時に、E14.5FLEC では HGF 刺激時に、 $\alpha_1$  アンチトリプシン遺伝子の発現は E13.5FLEC では HGF、HB-EGF、EGF 刺激時に、E14.5FLEC では HGF、HB-EGF、bFGF、EGF 刺激時にそれぞれ高い増加率を示した。また E14.5FLEC を各種 GFs 存在下で 6 日間三次元培養後に Western blot にてアルブミンの発現を検討した結果、HGF 刺激にてアルブミン蛋白量が最も増加した。以上の結果から今回検討した GFs の中では E13.5FLEC で HB-EGF が、E14.5FLEC で HGF が最も強い分化誘導効果を有すると考えられた。

#### [ 総括 ]

マウス胎生肝組織において HGF、HB-EGF、bFGF、EGF、TGF- $\alpha$  の遺伝子発現を認め、それらの受容体が胎生肝細胞に発現していた。これらの増殖因子は胎生中期肝細胞の増殖を促進するとともに分化誘導にも関与しており、その効果は胎生の時期により異なることが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

各種増殖因子 (GFs) は胎生期発達中の肝臓の増殖、分化に関与すると考えられるが、胎生中期肝臓における GFs の役割はこれまで十分には検討されていない。本研究では各種 GFs (HGF、HB-EGF、bFGF、EGF、TGF- $\alpha$ ) がマウス初代培養胎生中期肝細胞の増殖、分化に及ぼす影響を検討したものである。

胎生中期肝組織において検討した全ての GFs とその受容体の遺伝子発現を認めた。GFs は濃度依存的に FLEC を増加させたが、その増加率は成熟肝細胞に対するものより低いことが示された。HGF、HB-EGF、bFGF、EGF はいずれも FLEC の分化を誘導したが、胎生 13.5 日 FLEC で HB-EGF が、胎生 14.5 日 FLEC で HGF が最も強い分化誘導効果を有することが示された。本研究は胎生中期の肝臓の増殖、分化における増殖因子の作用を明らかにしたものであり学位に値すると考えられる。