星細胞による肝細胞増殖制御

宇山直樹^{*1)}, 河田則文^{*2)}, 奥山裕照・髙原康行・山岡義生^{*1)}

Rat stellate cells regulate proliferation of rat hepatocytes in culture

This study was aimed to reveal the stellate cell-derived factors that regulate hepatocyte proliferation in culture. Rat hepatocytes and stellate cells were cultured in serum-free Williams-E medium. We used hepatocyte mono-culture and two different co-cultures of hepatocytes and stellate cells; 1) co-culture on the same surface (Co-mix.) and 2) co-culture without contact between hepatocytes and stellate cells using a culture insert (Co-sep.). Changes in the number and the DNA synthesis of hepatocytes was estimated. Although the number of hepatocyte decreased to 76% of the original at 48 h after starting mono-culture, it was kept at 106% in Co-mix. and increased to 135% in Co-sep. The hepatocyte DNA synthesis was enhanced by carbenoxolone, gap junction blocker, in Co-mix. and reduced by NK 1 in each co-culture. PD 153035, an EGF receptor specific inhibitor, had no effect. Heparitinase-I (20 mU/ml) and sodium cholate (25 mM) reduced the hepatocyte DNA synthesis in Co-sep. to 71%. Activation of MAPK was induced in hepatocytes stimulated by conditioned mediums. These results indicated that hepatocyte proliferation was stimulated in the presence of stellate cells through HGF, extracellular heparan sulfate, and heparan sulfate proteoglycan, and might be negatively regulated by gap junction-dependent mechanism.

Rec. 3/18/2002, Acc. 5/30/2002, pp481~487

Naoki Uyama^{*1)}, Norifumi Kawada^{*2)},

Hiroaki Okuyama・Yasuyuki Shimahara・Yoshio Yamaoka^{*1)}

key words : hepatocyte, stellate cell, HGF, heparan sulfate, heparan sulfate proteoglycan

肝細胞の再生に肝非実質細胞(クッパー細胞, 星細胞, 類洞内皮細胞, 胆管上皮細胞など)が重要な役割を果たすことは広く知られている。最近, 非実質細胞のなかで最も肝細胞近傍に存在し, 細胞外マトリックス, 種々の増殖因子や炎症性メディエーターなどを産生する星細胞の役割が, 肝再生や線維化との関連から注目されている。正常肝に存在する星細胞は, 細胞体内にビタミン A を含有し, 類洞内皮と肝細胞に挟まれた空間(Disse 腔)に存在している(静止期星細胞)。また, 星細胞は長い樹状突起を有し, 類洞を肝細胞側から取り巻いて pericyte として機能し, 肝微小循環を調節することも示されている。また, その樹状突起の一

部は肝細胞にも接着しており, 肝細胞-星細胞間の情報伝達に深く関わっている可能性が指摘されている。

しかし, 障害肝の星細胞, あるいは, プラスチックディッシュ上で培養された星細胞では, 細胞内のビタミン A 含量が著減し, 活発に増殖を開始するとともに種々の細胞外マトリックスを産生ようになることが知られている(活性化星細胞)。これらの一連の変化は“星細胞の活性化”と称され, その際細胞内の平滑筋 α アクチンの発現が高度となり, 筋線維芽細胞(myofibroblast)としての性格を獲得する。

星細胞が肝細胞の再生に関与する機構には, ① 星細胞によるサイトカインや増殖因子の産生と分泌, ② 星細胞による細胞外マトリックスの産生, ③ 肝細胞-星細胞間の細胞接触による調節, などが関与すると考えられる。

^{*1)} Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University 京都大学大学院医学研究科消化器外科学講座

^{*2)} Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆脾病態内科学講座

星細胞は、肝細胞増殖因子である上皮増殖因子(epidermal growth factor: EGF), 肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)やトランスフォーミング増殖因子アルファ(transforming growth factor- α : TGF- α)などを産生し、肝細胞の増殖に関与することが指摘されている¹⁻⁴⁾。

また、非実質細胞が産生する細胞外マトリックス物質も肝細胞の増殖・分化に関わる可能性が報告されている。特に、星細胞は基底膜成分であるラミニンやIV型コラーゲン、プロテオグリカン、さらには線維状コラーゲンであるI型コラーゲンを産生する。星細胞は解剖学的に肝細胞と接触しており、星細胞が産生するこれらの細胞外マトリックス物質が肝細胞索の類洞側域に沈着して肝細胞機能に影響を及ぼすことは容易に推測される。実際、ラミニンを含むEHS(Engelbreth-Holm-Swarm mouse tumor)ゲル上で培養された肝細胞は形態がよく保たれ、チトクロームP-450の活性およびアルブミン産生能とも長期にわたり維持されると報告されている⁵⁾。また、ラミニンのように細胞外マトリックスが細胞増殖効果や増殖因子機能の調節・修飾を行う可能性も報告されている。

一方、ヘパリンとよく似た構造を持つヘパラン硫酸(heparan sulfate: HS)のようなグリコサミノグリカン(二糖の繰り返し構造からなる酸性多糖)やコア蛋白質に一つ以上のヘパラン硫酸が結合したヘパラン硫酸プロテオグリカン(heparan sulfate proteoglycan: HSPG)のように増殖因子の効果を調節・修飾するものもある。HSPGには、パルカンのように分泌型のHSPG以外にシンデカンのような細胞膜型HSPGがある。細胞表面上に存在するHSPGは、そのHS鎖にHGFやFGFを結合させ、組織における増殖因子の貯留・濃縮、さらには分解阻止に働くと考えられている⁶⁾。また、HSや分泌型HSPGは、HGFやFGFなどのヘパリン結合性増殖因子と結合し、増殖作用を増強することも報告されている⁷⁾。

細胞間結合にはタイト結合のように細胞相互を結びつける結合とギャップ結合のようにイオンや

その他の分子を移動させるための結合の2種類がある。ギャップ結合は、コネキシンなどの膜貫通型蛋白が結合してつくられる細胞間チャンネルで、1 kDa以下の小分子を隣接する細胞に直接伝えることによって、細胞の増殖や分化に関わっているといわれている。肝細胞は、コネキシン26と32を発現して、肝細胞間ギャップ結合を形成している。非実質細胞においては、星細胞がコネキシン43を発現しているが、星細胞間および星細胞-肝細胞間におけるギャップ結合は分離培養細胞において認められているものの、生体内における発現とその意義については詳細な検討がない⁸⁾。

以上のようなメカニズムによって星細胞は肝細胞の再生に大きく関わる可能性がある。本稿では、このように多様な働きを持った星細胞が肝細胞の増殖・分化に及ぼす役割およびそのメカニズムについて概説する。

肝細胞/星細胞共培養における肝細胞増殖の変化

肝細胞の増殖・分化に及ぼす星細胞の役割に関する研究として、立野らの報告がある。立野らはラットから分離した非実質細胞分画に存在する小型肝細胞を血清、EGF、ニコチンアミド、L-アスコルビン2リン酸、ジメチルスルホキシドを含んだ培養液中で培養したところ、小型肝細胞を分化能および増殖能を維持しながら長期培養できることを示した。その際、小型肝細胞のコロニー周囲に存在していた星細胞が、小型肝細胞の分化能および増殖能の維持に関連している可能性があることを報告している⁹⁾。

筆者らは、成熟肝細胞の増殖に星細胞が関与しているかどうかについて、肝細胞単独培養群、細胞接触を伴う共培養群、細胞接触を伴わない共培養群を作成し、各細胞の経時的形態変化について調べた(図1)。単独培養肝細胞は時間経過とともに細胞が伸展していくが、接着細胞数は減少していった。細胞接触を伴う共培養群の培養開始12時間後では、肝細胞とその周囲の静止期星細胞が星細胞の突起で接触していた。共培養開始48時間後、肝細胞周囲の星細胞は活性化し、肝細胞と星

図 1 共培養のシェーマおよび経時的形態変化

A : 肝細胞単独培養

a : 開始後 12 時間後, b : 開始後 48 時間後, 細胞は進展するが, 接着肝細胞数は減少している。

B : 細胞接触を伴う共培養

c : 開始後 12 時間後×100, d : 開始後 12 時間後×300, 星細胞は時間とともに肝細胞周囲に集積する, 矢印は星細胞, 星印は肝細胞, e : 開始後 48 時間後×100, f : 開始後 48 時間後×300, 時間とともに星細胞は transformation を起こし, 肝細胞周囲を囲む, 肝細胞数は維持されている, 星印は肝細胞, 矢印は星細胞。

C : 細胞接触を伴わない共培養

g : 開始後 12 時間後×100, h : 開始後 48 時間後×100, 肝細胞数の著大な増加を認めた。

図2 単独培養および共培養の BrdU 染色像
培養開始 48 時間後の BrdU 染色。
a, d: 肝細胞単独培養
a: 位相差顕微鏡像×100, d: 明視野像×100
b, e: 細胞接触を伴う共培養
b: 位相差顕微鏡像×100, e: 明視野像×100
c, f: 細胞接触を伴わない共培養×100
c: 位相差顕微鏡像×100, f: 明視野像×100
単独培養にくらべ、細胞接触を伴う共培養および
細胞接触を伴わない共培養の肝細胞のほうが
DNA 合成能が亢進している。

細胞の細胞体間に細胞接触を認めた。細胞接触を伴わない共培養群では、時間が経つにつれ、肝細胞は腫大・伸展していくのが観察された。

肝細胞単独培養群では、経時的に細胞数は減少して 48 時間後、96 時間後には、培養開始時のそれぞれ 76.3%, 48.6% にまで減少した。一方、細胞接触を伴う共培養群では肝細胞数の有意な増加は認めなかったが、単独培養群にくらべ生存細胞数が 48 時間後に有意に維持された (106%)。興味深いことに、細胞接触を伴わない共培養群では 48 時間後において肝細胞数は 135% と有意に増加し、また他群と比較しても有意に肝細胞数が維持されることが明らかとなった。以上の結果は BrdU の取込みにより評価した肝細胞 DNA 合成能でも確認された (図 2)。

以上のことから、肝細胞は星細胞と共培養することによって無血清下でも増殖することが明らかとなった。また、星細胞と肝細胞との接触が必要とされないことから、星細胞が産生・分泌する物質が肝細胞の増殖に関わる可能性があることが判明した。

細胞接触の関与

Rojkind らは、肝細胞と星細胞を共培養すると肝細胞—星細胞間にギャップ結合が形成されると報告している⁸⁾。細胞膜状ギャップ結合の形成を阻害するといわれているカルベノキソロン ($C_6H_4O_7Na_2$, 10 $\mu g/ml$) を細胞接触を伴う共培養に添加したところ肝細胞の DNA 合成能は約 1.5 倍に増加した。しかし、肝細胞単独培養や肝細胞 + HGF (10 ng/ml) 添加培養および細胞接触を伴わない共培養では、肝細胞の DNA 合成能はカルベノキソロンで影響されなかった。

本知見は、肝細胞—星細胞間のギャップ結合が肝細胞の増殖を抑制している可能性を示唆し非常に興味深い。

肝細胞の増殖を刺激する星細胞由来の因子はなにか？

(1) 細胞増殖因子

星細胞が産生する生理活性因子のなかで肝細胞に対して増殖的に作用するものとして HGF, EGF, TGF- α が報告されている^{2,3)}。そのなかでも、最も肝細胞増殖活性が強い HGF は特に静止期星細胞に発現しており、活性化とともに発現が減弱する。HGF の持つ多様な生理活性はすべて c-Met 受容体を介して伝達されと考えられている。c-Met 受容体はリガンドと結合した後、チロシンキナーゼを活性化し自己リン酸化される。その後、さまざまなシグナル伝達アダプター (PLC γ , Grb2) が会合し、増殖刺激が核へと伝達される。その主要な経路は Grb2-Ras-MAPK 経路である。また、PI 3 Kinase の活性化も肝細胞増殖に関与していると報告されている。

HGF が共培養における肝細胞維持に関与するかどうかについて検討した。はじめに培養開始後

72時間の単独培養および共培養群における HGF の受容体である c-Met 受容体の発現に関して調べたところ発現量に変化はなかった。つぎに星細胞単独培養、細胞接触を伴う、あるいは伴わない、共培養のおおのの培養上清中 HGF 濃度は、それぞれ 3.7, 5.6, 2.4 ng/ml であった。分離した肝細胞にさまざまな濃度のリコンビナントラット HGF を添加して無血清下で 48 時間培養した後、肝細胞 BrdU L.I. を調べたところ、5 あるいは 50 ng/ml の HGF による肝細胞 BrdU L.I. は、14% と 44% であった。

この結果から細胞接触を伴わない共培養群の HGF 濃度は 2.4 ng/ml しかないにもかかわらず、BrdU L.I. が、HGF の最大効果を超過していることが判明した。また、HGF の拮抗剤である NK 1 の両共培養群における肝細胞 DNA 合成能への効果を調べたところ、両共培養群とも約 60% にまで減少し HGF の関与が考えられた。

他の肝細胞増殖因子である EGF と TGF- α は EGF 受容体を介して増殖刺激を細胞に伝達する。EGF 受容体もリガンドと結合した後、チロシキナーゼを活性化し自己リン酸化される。その後、さまざまなシグナル伝達アダプター (PLC γ , Shc, Grb 2 など) が会合し、増殖刺激が伝達される。その主要な経路は Shc-Grb 2-Ras-MAPK 経路である。単独培養群および共培養群の肝細胞における EGF 受容体の発現は両群に差はなかった。また、EGF 受容体の阻害剤である PD 153035¹⁰⁾には肝細胞増殖抑制効果はみられなかった。

星細胞単独培養、細胞接触を伴う共培養、細胞接触を伴わない共培養のおおのの培養上清によって培養肝細胞に p 42/p 44 MAPK 活性化が誘導されるが、その活性化は MEK の阻害剤である PD 98059 によって抑制されるものの、PD 153035 では抑制されなかった。

以上の結果から星細胞由来肝細胞増殖因子としては EGF や TGF- α よりもむしろ HGF が主として関与していることが判明した。しかしながら、HGF のみでは細胞接触を伴わない共培養による肝細胞増殖促進効果は説明できず、星細胞が産生分泌する因子のなかで上記以外の因子が関わって

いる可能性があると考えられた。

(2) 細胞外マトリックスの関与

星細胞は、コラーゲンやラミニン以外にヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンや分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるパルカンを産生・分泌する¹¹⁾。ヘパラン硫酸や分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンには HGF の増殖効果を高める効果があると報告されている。事実、分離肝細胞をヘパラン硫酸およびパルカン存在下に HGF で刺激し、肝細胞の DNA 合成能を調べると、ヘパラン硫酸およびパルカン (1 μ g/ml) はともに単独では肝細胞増殖効果はないものの、HGF 存在下にて肝細胞増殖効果を約 1.5 倍に高めた。

そこでヘパラン硫酸の分解酵素であるヘパリチナーゼ (20 mU/ml)¹²⁾を肝細胞単独培養および共培養に添加し肝細胞の DNA 合成能について調べた。単独培養および単独培養に HGF (10 ng/ml) を添加した実験では、ヘパリチナーゼの効果はないものの、共培養における肝細胞の DNA 合成はヘパリチナーゼにより 71% にまで減弱した。また、プロテオグリカンの合成阻害剤である亜塩素酸ナトリウム (NaClO₃, 25 mM)¹³⁾を用いても同様の結果が得られた。

以上より、共培養において星細胞が産生するヘパラン硫酸のようなグリコサミノグリカンや分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンが肝細胞増殖に関与していることが考えられた。

(3) その他のメディエーターの関与

上記の実験で細胞接触を伴わない共培養における肝細胞の増殖効果は培養液中の HGF 濃度とヘパラン硫酸およびパルクンの相乗効果だけでは説明できず、他の因子の関与が考えられる。一つの候補として、FGF-1 があげられる。FGF-1 は培養肝細胞の DNA 合成能を高めるといわれているが、その効果は HGF や EGF の効果よりは弱い。しかし、ラット肝部分切除 4 時間後より劇的に FGF-1 の発現が亢進し、またその発現の亢進は肝細胞および非実質細胞の両分画で認められていることから肝再生になんらかの重要な働きを行っている可能性が示唆されている¹⁴⁾。

図3 星細胞による肝細胞増殖機構

肝細胞は星細胞由来の HGF およびヘパラン硫酸、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの作用によって増殖した。また、星細胞と肝細胞の細胞接触によって肝細胞の増殖は抑えられ、その作用は両細胞間に存在するギャップ結合による可能性が考えられた。

HS：ヘパラン硫酸

HSPG：ヘパラン硫酸プロテオグリカン

一方、プロスタノイドも一因子として候補にあがる。一般に、プロスタノイドは非実質細胞で産生され、炎症性サイトカインなどに反応して放出され肝細胞に作用すると考えられている¹⁵⁾。実際、星細胞においても $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGD_2 、 PGI_2 、 PGE_2 、 LTC_4 、 LTB_4 が産生されていることが報告されている。そのなかには、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 のように EGF などの増殖因子の作用を強めると報告されているものもあり、肝再生に重要な働きを行っている可能性が考えられる。

また、星細胞はビタミン A 代謝に関与しており¹⁶⁾、ビタミン A の代謝の代謝物であるレチノイドもまた組織の分化・増殖に関与する可能性が指摘されている¹⁷⁾。しかし、筆者らの検討したところ、レチノイド自体には単独および HGF の存在下においても肝細胞増殖効果は認められなかった。

共培養におけるアルブミン産生能について

Rojkind らは、インスリン、グルカゴン、プロラクチン、成長ホルモン、EGF、リノレイン酸、銅、セレンウム、亜鉛を含む独自の細胞培養液を用いて肝細胞を星細胞と共培養すると肝細胞の分化マーカーの一つであるアルブミン産生能が維持されると報告している⁸⁾。筆者らは、無血清下にて成熟肝細胞を星細胞と共培養しても同じ現象が得られるかを各培養群で調べた。培養開始後の 24 時間では、星細胞単独培養、細胞接触を伴う共培養、細胞接触を伴わない共培養群の肝細胞当りのアルブミン産生能は、 2.9 、 3.0 、 $4.2 \mu\text{g}/10^5 \text{ cells/day}$ で各群に有意差はなかった。つぎの 24 時間のアルブミン産生能も、 1.4 、 2.4 、 $2.7 \mu\text{g}/10^5 \text{ cells/day}$ で各群に有意差はなかった。

以上より、肝細胞のアルブミン産生能に関しては、星細胞よりも培養液中に添加されたインスリン、グルカゴン、プロラクチン、成長ホルモン、EGF、リノレイン酸、亜鉛、銅などが肝細胞のアルブミン産生能の維持に必要であると考えられた。

おわりに

これまで成熟肝細胞の増殖・分化に及ぼす星細胞の役割について調べた筆者らの検討から、図3のような模式図が考えられる。星細胞が産生する HGF などの増殖因子やヘパラン硫酸・分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスが肝細胞の増殖を促進させ、一方で肝細胞—星細胞間の細胞接触によって形成されるギャップ結合を介して肝細胞の増殖を抑制させる可能性が示唆された。しかし、星細胞が産生する HGF とヘパラン硫酸・分泌型ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスだけで共培養の肝細胞増殖は説明できず、他の増殖因子や co-factor および未知の因子の関与をさらに明らかにしていかなければならない。

今後、さらに成熟肝細胞の増殖・分化に及ぼす星細胞の役割およびそのメカニズムについて検討することによって、急性期・慢性期肝疾患の治療および肝細胞移植や人工肝臓の作製に必要なヒト肝細胞の大量培養法の確立に大きく寄与すること

が推測される。

文 献

- 1) Maher JJ : Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 91 : 2244-2252, 1993.
- 2) Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE : Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 15 : 5-11, 1992.
- 3) Mullhaupt B, Feren A, Fodor E, Jones A : Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration. *J Biol Chem* 269 : 19667-19670, 1994.
- 4) Matsumoto K, Nakamura T : Hepatocyte growth factor (HGF) as tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 239 : 639-644, 1997.
- 5) Iredale JP, Arthur MJ : Hepatocyte-matrix interactions. *Gut* 35 : 729-732, 1994.
- 6) Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB : Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 107 : 743-751, 1988.
- 7) Zioncheck TF, Richardson L, Liu J : Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270 : 16871-16878, 1995.
- 8) Rojkind M, Novikoff PM, Greenwel P : Characterization and functional studies on rat liver fat-storing cell line and freshly isolated hepatocyte coculture system. *Am J Pathol* 146 : 1508-1520, 1995.
- 9) Tateno C, Yoshizato K : Long-term cultivation of adult rat hepatocytes that undergo multiple cell divisions and express normal parenchymal phenotypes. *Am J Pathol* 148 : 383-392, 1996.
- 10) Bos M, Mendelsohn J, Kim YM, Albanell J, Fry DW, Baselga J : PD 153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clin Cancer Res* 3 : 2099-2106, 1997.
- 11) Gallai M, Kovalszky I, Knittel T, Neubauer K, Armbrust T, Ramadori G : Expression of extracellular matrix proteoglycans perlecan and decorin in carbon-tetrachloride-injured rat liver and in isolated liver cells. *Am J Pathol* 148 : 1463-1471, 1996.
- 12) Naka D, Ishii T, Shimomura T, Hishida T, Hara H : Heparin modulates the receptor-binding and mitogenic activity of hepatocyte growth factor on hepatocytes. *Exp. Cell Res* 209 : 317-324, 1993.
- 13) Humphries DE, Silbert JE : Chlorate : a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem Biophys Res Commun* 154 : 365-371, 1988.
- 14) Berry MN, Edwards AM : Mechanisms of hepatocyte growth regulation by hormones and growth factors. *The Hepatocyte Review*. (Berry MN, Edwards AM), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2000, p 209-246.
- 15) Kan M : The fibroblast growth factor family. *Liver Growth and Repair*. (Strain AJ, Diehl AM), Chapman and Hall, London, 1998, p 240-260.
- 16) Pinzani M : Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell. *Pharmacol Ther* 66 : 387-412, 1995.
- 17) Sporn MB, Roberts AB : Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 43 : 3034-3040, 1983.