

氏名(本籍)	たなはしただのり 棚橋紀悟(愛媛県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第1,240号		
学位授与年月日	平成9年1月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Studies on the Growth Control Mechanisms of Liver Parenchymal Cells by Heparin-Binding Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1) (繊維芽細胞増殖因子-1 (FGF-1) による肝実質細胞の増殖制御機構に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	宗像英輔
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部 功
副査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	薬学博士	後藤勝年
副査	筑波大学併任教授	薬学博士	三ツ井洋司 (生命工学工業技術研究所)

## 論文の内容の要旨

肝臓の主要な構成細胞である肝実質細胞（以下肝細胞と略する）の初代培養実験系が確立して以来、肝細胞の増殖を制御する因子が数々同定されてきたが、肝細胞の増殖制御について、多数の増殖因子の存在意義やこれら増殖因子の協同作用のメカニズムなどは未だ解明されていない。本研究は、増殖因子のうち、繊維芽細胞増殖因子-1 (FGF-1) が、肝細胞の増殖制御機構にいかに関与するかを解明することを目的に行ったものである。

FGF-1は肝再生の早い時期に発現が上昇することはすでに明らかにされているが、肝細胞の培養系として従来から用いられてきた無血清培養系におけるFGF-1の増殖刺激活性は、既知の肝細胞増殖刺激因子であるHGF（肝細胞増殖因子）やEGF（上皮増殖因子）に比べて非常に低いことが報告されており、肝再生におけるFGF-1の肝細胞増殖への役割には疑問が持たれてきた。そこで、これまで報告されたFGF-1の低い肝細胞増殖刺激活性の原因を、肝細胞の培養条件の面から再検討した結果、血清および生理的濃度のインスリンの存在下で、FGF-1は、他の増殖因子と同等に肝細胞の増殖を強く刺激する活性を有し、生体中でも肝細胞の増殖に重要な機能を担っていることが示唆された。

次に、FGF-1の血管内皮細胞などへの増殖活性は、FGF-1と結合するヘパリンの添加により増強され、FGF-1とFGFリセプター（高親和性結合部位）の結合が、細胞表面のヘパラン硫酸鎖（低親和性結合部位）により制御されることが知られているが、本研究では、さらにウシ脳由来FGF-1（以下天然型FGF-1と略する）がEGFやHGFと同等に肝細胞の増殖を強く刺激すること、また、天然型FGF-1による肝細胞の増殖刺激はヘパリンの存否に依存しないことならびにG1期後期の核内FGF-1の存否により制御される事を新たに明らかにした。

一方、強力な肝細胞増殖因子であるHGFは、その増殖刺激活性がヘパリンにより阻害されることが知られているものの、これら増殖因子の標的肝細胞の異同については不明な点が多かったが、天然型FGF-1を用いてHGFおよびEGFとの肝細胞増殖刺激における協同作用を調べたところ、個々の増殖因子では全体の肝細胞の約半分が増殖刺激を受けるのに対して、このうち2種の増殖因子の同時添加により約80%が、さらに3種の増殖因子により90%以上の肝細胞が増殖刺激を受けた。これらの事実から、肝細胞のほとんどはFGF-1、EGFあるいはHGFに応

答する細胞であり、一部の重複を含んで互いに区別される増殖因子応答性の異なる細胞集団を形成していることが明らかになった。

このFGF-1応答性の違いを検討するため、結合実験によりFGFリセプターを解析したところ、全細胞にFGFリセプターが均等に存在しており、その存否がFGF-1応答性を規定してはいなかった。一方、FGF-1との架橋実験により、肝実質細胞全体では128-kDaFGFリセプターとともに、79-kDaFGFリセプターが新たに検出された。この79-kDaFGFリセプターは、EGFやHGFによる増殖刺激で選択的に消失した。これは、FGF-1非応答性細胞で79-kDaFGFリセプターが、128-kDaFGFリセプターに対して、より多く発現していることを示している。この79-kDaFGFリセプターは、128-kDa FGFリセプターと異なり、FGF-1刺激により自己リン酸化されなかった。また、79-kDaと128-kDaの両FGFリセプターのヘテロ二量体は、128-kDaFGFリセプターのホモ二量体と比べて、そのリン酸化の程度は明らかに低かった。これは、79-kDaFGFリセプターがFGF-1刺激に対して不活性であり、活性型128-kDaFGFリセプターの機能を阻害することを示している。さらに肝細胞増殖に関連したFGFリセプター蛋白質の変動を免疫学的手法により検討したところ、この蛋白質の大部分は非筋細胞の $\gamma$ -アクチンであることを明らかにし、肝細胞の増殖制御に関する信号伝達経路に $\gamma$ -アクチンが関与している可能性が示された。

### 審査の結果の要旨

本研究は、肝臓の主要な構成細胞である肝実質細胞（以下肝細胞と略する）において、繊維芽細胞増殖因子-1（FGF-1）が強力な増殖因子として作用することを明らかにし、その増殖制御機構の解析を目的とした行つたものである。

その結果、FGF-1は既知の肝細胞増殖因子と同等に強力に肝細胞の増殖を刺激することを見出し、また、肝細胞のほとんどはFGF-1、EGFあるいはHGFに応答する細胞であり、一部の重複を含んで互いに区別される増殖因子応答性の異なる細胞集団により構成されていることも明らかにした。さらに、肝細胞において、完全長型のFGFリセプターとともに、細胞内ドメインを大きく欠く低分子量型FGFリセプターを同定し、この低分子量型FGFリセプターが、FGF-1刺激に応答しない不活性型FGFリセプターであることを示した。この不活性型FGFリセプターがFGF-1非応答性細胞に多く発現していることから、不活性型リセプターが増殖因子応答性を規定するという、生体内における新たな増殖制御機構が示唆されたことになる。また、肝細胞表面には、血管内皮細胞と異なり、FGF-1の増殖刺激作用を十分にサポートするヘパラン硫酸鎖が存在することが明らかになった。この知見をもとに、FGF-1活性が、G1期後期の核内FGF-1の存否により制御されているという、新たなFGF-1活性制御機構を示唆する結果がえられた。

以上を総合すると、FGF-1は肝細胞の強力な増殖因子としてFGF-1応答性の肝細胞集団に作用すること、さらに、その増殖刺激作用は、肝細胞に特有な不活性型FGFリセプターや細胞周期特異的なFGF-1分子の核局在により制御されていることを明らかにした。FGF-1リセプターに関して、非筋細胞の $\gamma$ -アクチンの関与を推定はしたが、その動的挙動にまで言及されていない点がおしまれるものの、本研究の成果はきわめて意義深いと考える。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。