

氏名(本籍)	井上 千代子
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第 1022 号
学位授与年月日	平成元年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程) 内科学系専攻
学位論文題目	初代培養肝細胞の増殖機構の解析と長期延命化 I Expression of the insulinoma gene <u>rig</u> during liver regeneration and in primary cultured hepatocytes (再生肝, 初代培養肝細胞におけるrigの発現) II Nicotinamide prolongs survival of pri- mary cultured hepatocytes without involving loss of hepatocytespecific functions (ニコチン酸アミドによる初代培養肝細胞の機 能保持と延命効果)
論文審査委員	(主 査) 教授 多田 啓也 教授 森 昌造 教授 岡本 宏

論文内容要旨

初代培養肝細胞は、再生肝や正常肝細胞の増殖・分化の機構を知るための実験系として近年注目されてきている。

第一の論文で著者は、再生肝のみならず初代培養肝細胞にも、著者らが先にインスリノーマから単離し構造を決定した（参考論文：Inoue, C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6659-6662 (1987)）新しい増殖関連遺伝子 *rig* (rat insulinoma gene) が発現していることを発見した。即ち、ラット初代培養肝細胞を同調培養して細胞周期の解析に用い、*rig* mRNA の発現をNorthern法により、また *rig* 蛋白質の細胞内局在を抗 *rig* 蛋白質抗血清をもちいた間接免疫蛍光抗体法により検討したところ、*rig* は G₁ 期に発現し、*rig* 蛋白質は S 期（DNA 合成期）に核に集積する核蛋白質であることが明らかとなった（Inoue, C. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 1302-1308 (1988)）。

しかしながら、従来の培養条件では初代培養肝細胞は培養後 5-7 日以内に急速に肝特異機能を失い死滅してしまう。これを長期に分化機能を保ったまま増殖・継代させることは初代培養肝細胞研究の大きな課題であり、そのためにはより優れた培養条件の検討が必要であると考えられた。

そこで第二の論文では、著者は、培養に伴う細胞内 NAD 含量の低下・涵渇が肝細胞の死滅に密接に結びついている可能性を見だし、NAD の前駆体であり、またポリ ADP-リボース合成酵素阻害剤でもあるニコチン酸アミドを用いて初代培養肝細胞の増殖促進と長期延命化を試みた。初代培養肝細胞はニコチン酸アミドを 10mM の濃度で培地に添加することにより、EGF（上皮細胞増殖因子）とインスリンにより誘導した肝細胞の DNA 合成を約 2 倍促進したのみならず、細胞は培養開始時の 2.7 倍の細胞密度に達するまで活発に増殖を続けた。また肝細胞はその後も死滅することなく少なくとも 33 日間、viable な状態を保った。ニコチン酸アミドの添加は、アルブミン遺伝子の発現やデキサメサゾンとグルカゴンによる tryptophan oxygenase 遺伝子の発現誘導性などの肝特異機能の保持にも効果があった。長期培養期間中、細胞内 NAD 含量は *in vivo* の肝細胞と同等かやや高いレベルを保ち続けた。

以上の結果から、ニコチン酸アミドを培地に添加し、細胞内 NAD 含量を維持することにより、増殖促進、延命、そしてさらには、分化機能を保持した肝細胞を培養できる可能性が示唆された（Inoue, C. et al. J. Biol. Chem. (1989) in press）。

長期に延命した初代培養肝細胞を用いることにより、今後、人工肝臓等の開発に新しい道が開かれることも考えられる。

審査結果の要旨

井上 千代子

初代培養肝細胞は、再生肝や正常肝細胞の増殖・分化の機構を知るための実験系として近年注目されてきている。

第一の論文で著者は、再生肝のみならず初代培養肝細胞にも、著者が先にインスリノーマから単離し構造を決定した新しい増殖関連遺伝子rig (rat insulinoma gene) が発現していることを発見した。即ち、ラット初代培養細胞を同調培養して細胞周期の解析に用い、rig mRNAの発現をNorthern法により、またrig蛋白質の細胞内局在を抗rig蛋白質抗血清を用いた間接免疫蛍光抗体法により検討した結果、rigはG₁期に発現し、rig蛋白質はS期（DNA合成期）に核に集積する核蛋白質であることを明らかとした。

しかしながら、従来の培養条件では初代培養細胞は培養後5～7日以内に急速に肝特異機能を失い死滅してしまう。これを長期に分化機能を保ったまま増殖・継代させることは初代培養肝細胞研究の大きな課題であり、そのためにはより優れた培養条件の検討が必要であると考えられた。

第二の論文では、著者は、培養に伴う細胞内NAD含量の低下・涸渇が肝細胞の死滅に密接に結び付いている可能性を見出し、NADの前駆体であり、またポリADP-リボース合成酵素阻害剤でもあるニコチン酸アミドを用いて初代培養肝細胞の増殖促進と長期延命化を試みた。初代培養肝細胞はニコチン酸アミドを10mMの濃度で培地に添加することにより、EGF（上皮細胞増殖因子）とインスリンにより誘導した肝細胞のDNA合成を約2倍促進したのみならず、細胞は培養開始時の2.7倍の細胞密度に達するまで活発に増殖を続けた。また肝細胞はその後も死滅することなく少なくとも33日間、viableな状態を保った。

以上の研究成果は、初代培養肝細胞の増殖機構並びにその長期延命化に新知見を加えたものであり、医学博士の授与に価すると判定された。