

日本財団補助金による

1997年度日中医学協力事業助成報告書

— 中国人研究者・医療技術者招聘助成 —

財団法人 日中医学協会

理事長 中 島 章 殿

1998年 3月 10日

I. 招 へ い 責 任 者 佐藤 信 弘 
所属機関 順天堂大学 消化器内科 職名 主任教授
所 在 地 〒113 東京都文京区本郷 2-1-1 電話 03-3813-3111
EXT. 3304
招へい研究者氏名 郭 新 彪
所属機関 順天堂大学 消化器内科
職 名 医学部 協力 研究員

II. 日 本 滞 在 日 程

1997年9月4日	来日
1997年9月5日～	当研究室にて研究活動
1998年8月31日	帰国予定



アルコールによる肝障害の機構について

— 細胞間コミュニケーションの役割

はじめに

アルコール性肝障害は最終的に肝硬変、肝臓癌に進展し、肝疾患の主要な成因の一つとなっている。従来、日本を含む東アジアにおいては、アルコール性肝硬変は欧米に比し少なかった。しかし、最近生活習慣の変化につれ、飲酒量が増大し、アルコール性肝疾患は増えつつある。

正常な肝臓は強力な再生能を持ち、物理的あるいは化学的な障害を受けた後、数週間以内にはもとのサイズまで回復できる。アルコールの肝臓への影響は、肝再生障害があげられる。大酒家、短期間または長期間にわたるアルコールを摂取させた動物では、肝臓の再生能がかなりの障害を受け、アルコールによる肝臓の不可逆的变化に繋がると思われる。現在のところ、アルコールによる肝再生障害の機構についてまだよく分かっていない。アルコールが投与された動物では、ポリアミン合成の障害や増殖因子に対する細胞感受性の低下などが指摘されている。

ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは細胞の増殖、分化において重要な役割を果たしている。肝切除を受けた動物では、肝細胞間コミュニケーションは最初に低下し、肝再生に伴い、徐々に回復し、最終的に肝切除前と同じ程度にまで回復する。細胞間コミュニケーションを通じて、肝再生に重要な情報伝達物質が交換されると考えられ、とくに肝再生後期の協調した細胞機能の回復に重要と思われる。多くの研究から、細胞間コミュニケーションは肝再生過程をコントロールする役割を果たしていることが示唆されている。

本研究では、アルコールによる肝再生障害機構を明らかにする研究の一環として、アルコールの肝細胞間コミュニケーションに及ぼす影響を *in vitro* において検討した。

方法

1 肝細胞の分離と初代培養

正常な雄性ラット（体重 200 g 前後）より *in situ* コラーゲンナーゼ灌流法で doublet 肝細胞を作成した。Leibovitz's L-15 培地で細胞浮遊液を作り、直径 6 センチのプラスチックディッシュに細胞を撒いて、37°C, 100% 空気条件下で培養を行った。2 時間後に培地を交換し、アルコールの作用を検討した。

2 肝細胞間コミュニケーションの測定

マイクロピペットを用い蛍光色素である Lucifer Yellow CH を肝細胞に注

入し、倒立蛍光顕微鏡下で doublet 肝細胞間色素の移動を観察し、それをギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの指標とした。

3 ギャップ結合蛋白であるコネキシン32細胞内分布の間接蛍光免疫染色

培養肝細胞を液体窒素で凍結し、 -20°C にて風乾させた後、ギャップ結合蛋白であるコネキシン32のモノクローナル抗体を用い、通常の免疫蛍光染色法に従って染色を行った。肝細胞のコネキシン32分布は共焦点レーザー蛍光顕微鏡下で観察、撮影した。

研究結果と考察

われわれはまず肝細胞間コミュニケーションの培養における経時的な変化を見た。培養早期には肝細胞間がよくカプリングされ、高いレベルの細胞間コミュニケーションが維持されているが、その後は徐々に低下し、9時間目に肝細胞間の色素移動率は10%程度までになった。肝細胞のコネキシン32の分布も細胞間コミュニケーションと一致する変化を見せている。これは今までの報告と一致しており、通常の培養条件ではコネキシン32のような膜蛋白はかなり速い速度で減少していくことが分かった。その結果、コネキシンで構築されるギャップ結合も機能しなくなり、最終的に細胞間コミュニケーションの低下に繋がると思われる。

そこで、肝細胞間コミュニケーションに対し、アルコールはどう影響しているかを *in vitro* において検討した。アルコールを添加した培養肝細胞では肝細胞間コミュニケーションの減少がほとんど見られず、培養9時間目でも80%に維持されており、しかも、この作用はアルコール濃度に依存していることが分かった。免疫蛍光染色でも、アルコールで処理した肝細胞は対照群細胞より細胞間にコネキシン32が多く分布していることが分かった。上記で述べたように、ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションは細胞の増殖、分化の引き金のような働きをしており、組織のホメオシスの維持に重要であると言われている。以上の所見から、アルコールがギャップ結合蛋白の turnover に何らかの影響を与えていることが示唆され、その肝再生障害機構を考える上で非常に興味深いと思われる。

アルコールによる肝障害はその代謝と深く関わっているとされている。肝臓ではアルコールが主にアルコール脱水素酵素によってアセトアルデヒドに代謝され、後者はさらにアルデヒド脱水素酵素の触媒で酢酸となる。アセトアルデヒドは生体内の種々の蛋白と結合して蛋白を変性させ、その機能に障害を与えると考えられている。酢酸も ATP の分解を助長し、肝細胞の酸化ストレスの増加に繋がると考えられる。そこで、われわれはアルコールのギャップ結合蛋白の turnover に対する作用過程にその代謝の関与を調べた。アルコール脱水素酵素およびアルデヒド脱水素酵素の抑制剤である 4-methylpyrazole と pargyline をそれぞれアルコールといっしょに培養液に添加して調べたところ、

両抑制剤はアルコールの肝細胞間コミュニケーションへの維持作用には影響を与えなかった。このことから、エタノールで処理された肝細胞で見られた細胞間コミュニケーションの維持はその直接作用によるもので、代謝の関与は少ないことが示唆された。

無処置の肝細胞に比べて、アルコールで処理されたものは培養ディッシュの上であまり伸展せず、細胞が球形に維持されたことが今回の研究で分かった。これはエタノールが細胞の骨格系への影響によるものと思われる。細胞形の保持は細胞膜上ギャップ結合蛋白の維持と何らかの関わりがあると思われ、今回の研究ではこのことについても検討した。細胞骨格の維持に微小管とアクチンが重要な役割を果たしていると言われている。そこで、肝細胞間コミュニケーションに対するアクチンの重合を阻害するサイトカラシン B と微小管の形成を阻害するコルヒチンの作用を検討した。サイトカラシン B またはコルヒチンで細胞の伸展が阻止され、一晚培養しても細胞は球形のままであった。しかし、細胞間コミュニケーションに対する作用は両者では異なっており、コルヒチンで処理した doublet 肝細胞間に色素がスムーズ移動しているのに対し、サイトカラシン B 群の細胞は無処置群細胞と同様、培養 9 時間目時点では色素の移動がほとんど見られなくなった。以上のことから、培養肝細胞における細胞間コミュニケーションの維持には微小管が関わっていることが示唆され、エタノールが細胞骨格の重要な要素である微小管の機能を修飾することで、ギャップ結合蛋白の turnover に影響を与えていると考えられる。

結語

アルコールは濃度依存的に培養肝細胞で見られた細胞間コミュニケーション減少を遅延させた。これはアルコールの直接的な作用によるもので、その代謝物質アセトアルデヒドおよび酢酸は関与していないと思われる。アルコールが細胞骨格の重要な要素である微小管の機能を修飾することでギャップ結合蛋白の turnover に何らかの影響を与え、正常な肝再生機構の障害に繋がると考えられる。