

oval cell の増殖・分化と細胞外基質

上塚 浩司

①

oval cellの増殖・分化と細胞外基質

上塚 浩司

目次

第1章	緒言	1
第2章	oval cellの動態	5
第3章	細胞外基質の動態	27
第4章	類洞壁細胞の動態	45
第5章	総括	75
	謝辞	80
	参考文献	82

第1章 緒言

oval cellは肝に存在すると考えられている潜在的な幹細胞であり、肝細胞と胆管上皮細胞の両方に分化する能力を有していると考えられており (Hayner et al. 1984; Germain et al. 1985, 1988; Evarts et al. 1987; Sirica 1995)、肝障害後の再生過程で肝細胞の再生抑制がある場合に増殖してくるとされている (Thorgeirsson 1993)。

障害後の肝再生過程におけるoval cellの役割を研究するための実験モデル系としては、塩酸D-ガラクトサミン (GalN) 投与による急性肝炎モデルが良く知られている (Lemire et al. 1991; Daveba and Sharitz 1993)。GalN誘発肝炎モデルの場合には、GalN投与により引き起こされるウリジン欠乏により肝細胞の再生増殖が抑制されるため、それに代わってoval cellの増殖が開始すると考えられている (Farber et al. 1973; Decker and Keppler 1974)。

しかし、肝内におけるその解剖学的位置も含め、oval cellの増殖・分化の動態に関しては未だ不明な点が多い。その理由の一つに、これまで利用されてきた実験系ではいずれもoval cellの増殖がごく一過性にしか認められないため、その動態を詳細に解析することが困難であったことが挙げられる。

一方、このoval cellの増殖・分化に影響を及ぼす肝内の微小環境因子を考えた場合、細胞外基質の動態が重要であると考えられる。細胞外基質は、従来、組織を構築するための足場あるいは空隙を埋める間充組織としてのみ機能していると考えられてきた。しかし、最近、細胞外基質が組織を構築している実質細胞の分化や増殖などの調節・制御に深く関わっていることが次第に明らかになってきた (Bruijn et al. 1988; Reif et al. 1990; Martinez-Hernandez 1991)。例えば、胎児発生過程での細胞外基質による分化誘導や、in vitroの細胞培養系における細胞外基質の種類に応じた培養細胞の性状変化などが報告されている。細胞外基質は、インテグリンなどの接着分子を通じ、周囲細胞との直接的な接着によって細胞-基質間の相互作用を調節する機構のほかに (von der Mark and Kuhl 1985; Ruoslahti and Pierschbacher 1986; Tamkun et al. 1986; Urushihara and Yamada 1986; Dedhar et al. 1987)、細胞外基質に増

殖因子をつなぎとめ、保留しておき、炎症などの環境変化に応じて保留をほどこし、局所での増殖因子濃度を調節するといった間接的な調節機構も知られてきている (Ruoslahti et al. 1994)。したがって、肝内の細胞外基質の動態がoval cellの増殖および分化の調節に影響を及ぼしている可能性は大きい。

こうした肝内の細胞外基質の産生細胞としては、類洞壁に存在する伊東細胞の関与が大きいものと考えられている (Arenson et al. 1988)。加えて、伊東細胞は各種サイトカインや増殖因子の分泌を介して肝炎の動態を調節しているとの報告も多い (Hu et al. 1993)。したがって、細胞外基質の動態とoval cellの増殖と分化との関連を考える場合には、伊東細胞の動態も押さえておく必要がある。また、伊東細胞と同じく類洞壁に存在するクッパー細胞は、単球・マクロファージ系の細胞で、各種サイトカインや増殖因子の分泌機能を有することが知られており (Kamimura and Tsukamoto 1995)、伊東細胞と同様、影響因子のひとつとして重要であると思われる。

本研究では、試験系としてミニラットを用い、GalN誘発肝炎モデルでoval cellの増殖・分化の動態を検索した。ミニラット (Jcl: Wistar-TgN (ARGHGEN) 1N1s strain) は、成長ホルモンに対するアンチセンス遺伝子の挿入により成長ホルモンの発現が抑制されたトランスジェニック動物で、発育抑制があり、由来系統であるWistarラットと比較すると体重が約半分である (Matsumoto et al. 1993, 1995)。

成長ホルモンは肝再生に関与していることが知られており、2/3肝部分切除を施した下垂体切除ラットでは、肝再生の遅延が報告されている。この肝再生の遅延は外因性の成長ホルモンを投与することによって回復する (Untermann and Phillips 1986; Hemingway and Cater 1958; Rabes and Brandle 1969; Uthne and Uthne 1972; Ekberg et al. 1992)。我々はミニラットで2/3肝部分切除実験を試みたところ、肝細胞の分裂・増殖の指標としてのBromodeoxyuridine (BrdU) およびproliferating cellular nuclear antigen (PCNA) のラベル率が、Wistarラットに比較して、切除の24~48時間後に有意に低い

値を示した (Uetsuka et al. 1997)。このことから、ミニラットではGalN誘発肝炎モデルにおいて、他の系統のラットを用いた実験系よりも、oval cellの増殖がより長期にわたって観察されることが期待された。

本研究では、ミニラットにGalNで誘発した肝炎モデルを用い、まず最初に、oval cellの動態を明らかにする。ついで、細胞外基質の動態を解析し、これとoval cellの動態との関連を明らかにする。さらに、細胞外基質の産生に関与していると考えられている類洞壁細胞の動態および2種類の増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF, Transforming growth factor- β 1: TGF- β 1) の動態を詳細に検索し、これらとoval cellの動態との関連を明らかにする。

第2章 oval cellの動態

序

緒言で述べたように、oval cellは肝の幹細胞分画の祖先であると見なされ、成熟肝細胞の再生能力が抑制された状況下ではoval cellの増殖による肝再生が起こるとされている(Thorgeirsson 1993)。ところで、塩酸D-ガラクトサミン(GalN)は、ウリジンヌクレオチドの欠乏による肝細胞の壊死を引き起こし、肝細胞の分裂、再生を抑制するため(Farber et al. 1973; Decker and Keppler 1974)、いわゆるoval cellの増殖が一過性に観察される(Lemire et al. 1991; Daveba and Sharitz 1993)。しかし、このoval cellの発生と分化の過程についてはいまだ不明な点が多い。

本章では、Wistarラット由来のトランスジェニック動物で、アンチセンス遺伝子の導入により成長ホルモンの発現が抑制されており(Matsumoto et al. 1993, 1995)、肝部分切除後の肝細胞再生の抑制がある(Uetsuka et al. 1997) Jcl: Wistar TgN (ARGHGEN) 1N1s系統のラット(ミニラット)を用い、GalN投与後の肝でのoval cellの増殖と分化の動態を、病理組織学のおよび免疫組織化学的に検索した。

材料および方法

動物

6週齢の雄のミニラット (Jcl: Wistar-TgN (ARGHGEN) 1Nts strain) (体重: 95~115 g) を日本生物科学研究所より寄贈していただいた。動物は実験に供するまでの2週間の馴化期間およびその後の実験期間中、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、14時間人工照明(7:00-21:00)の動物室でアイソレーター内で飼育した。動物は、プラスチック製ケージに5匹ずつ収容し、市販の固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業(株), 東京)および上水道水を自由に摂取させた。

投与材料

塩酸D-ガラクトサミン (GalN) は、Sigma Chemical Co. (MO, USA) より購入した。GalNは、生理食塩水を溶媒として100mg/mlの濃度で溶解し、投与液とした。

GalNの投与

実験群として40匹のミニラットに、週に1回、1000mg/kgのGalNを最高4週にわたって腹腔内投与した。30匹には同量の生理食塩水を投与し、対照群とした。初回投与から12, 24, 36, 48, 72時間後、5, 7日後、および2, 3, 4週後に、実験群4匹、対照群3匹を、それぞれエーテル麻酔下で安楽殺し、肝を採取した (Fig.1)。肝は目的に応じて、10%中性緩衝ホルマリンあるいは1%グルタールアルデヒドで固定するか、未固定のままドライアイス/アセトンで急速凍結した。

病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリンで固定した肝から常法にしたがって4 μm のパラフィン切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色を施して鏡検した。

免疫組織化学的検査

安楽殺した動物から肝を採取後、迅速に肝のスライスを作製し、未固定のままコンパウンド中に包埋し、ドライアイス/アセトンで急速凍結して-80℃で保存した。免疫染色には、1次抗体として抗ヒトサイトケラチン7・マウスモノクローナル抗体 (OV-TL 12/30, DAKO, Japan) と抗ラット α フェトプロテイン・ヒツジポリクローナル抗体 (Nordic Immuno-logical Laboratories, CA, USA) を用いた。6 μ m の凍結切片を保存材料より作製し、サイトケラチン7の染色用には-20℃のアセトンで10分間、 α フェトプロテインの染色用には4℃の4%パラホルムアルデヒド溶液で10分間、それぞれ固定した。免疫染色はアビジン・ビオチン・コンプレックス (ABC) 法にしたがい、Vector ABCキット (Vector Lab. Inc., U.S.A.) を用いて実施した。免疫染色後の核染にはメチル・グリーン染色液を用いた。

電子顕微鏡による病理組織学的検査

安楽殺した動物から採取した肝を小さく切り出し、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) で作製した1%グルタルアルデヒド液で4℃で3時間固定した後、同緩衝液で作製した1%四酸化オスミウム液で後固定して、エポキシ・リジン樹脂 (Epok 812, Oken Co., Tokyo, Japan) に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、JEOL 1200EX電子顕微鏡 (JEOL Co., Ltd., Tokyo, Japan) で観察した。

結 果

体重の変化

GalN投与群と対照群の体重の変化をFig. 2に示した。対照群では時間経過に沿って着実に体重が増加したのに対し、GalN投与群では初回投与の2日後から3日後に顕著な体重減少が見られ、その後、体重は増加に転じたが、初回投与の4週後にいっても対照群よりは有意に低い値に留まった。

病理組織学的所見

GalN投与群の肝では、初回投与の24時間後から、グリソン鞘周囲性にリンパ球・好中球を主体とする炎症細胞浸潤が観察されるようになり (Fig.3)、その後炎症巣は肝細胞壊死を伴いながら拡大していき、48時間後には最も顕著となって、肝細胞壊死を伴う多数の大型炎症巣が肝小葉内に観察された (Fig.4)。その後、炎症細胞浸潤は次第に減弱していき、5~7日後にはほとんど観察されなくなった。

一方、GalN投与の72時間後からグリソン鞘とその周囲実質との移行部位に小型の卵円形上皮細胞の出現が観察され始めた (Fig.5)。この小型上皮細胞は次第に増殖してグリソン鞘周囲から肝小葉内に侵入し、7日後には肝小葉内に拡大して、小塊状、線条状、あるいは微細管腔状の構造を形成して増生していた (Fig.6)。GalN初回投与の2週以降は、小型上皮細胞は主として微細管腔構造を形成して増生していた (Fig.7)。

免疫組織化学的所見

免疫染色では、GalN投与の7日までは、これらの小型細胞のほとんどが胎児性肝細胞マーカーである α フェトプロテインと胆管上皮細胞マーカーであるサイトケラチン7の両方に陽性を示した (Fig.8)。しかし、GalN初回投与の2週後には、小型

細胞の多くが α フェトプロテインに対する染色性を消失した。初回投与の4週後にはグリソン鞘周囲に存在する少数の小型細胞が α フェトプロテインとサイトケラチン7の両方に陽性を示すほかは、ほとんど全ての小型細胞がサイトケラチン7にのみ陽性を示した (Fig.9)。

電子顕微鏡所見

電子顕微鏡観察では、これらの小型細胞は肝細胞と胆管上皮細胞の中間型の特徴を示した。すなわち、これらの細胞の核は、電子密度が低くて淡明で、均質であり、円形～卵円形をしており、また細胞内小器官の発達は乏しかった。GalN投与の7日後には、線条状および小塊状に増殖している小型細胞と比較して、微細管腔状に増殖している小型細胞の方が細胞内小器官の発達が良かった (Fig.10)。その後、これら小型細胞の電顕所見には特に大きな変化は認められなかった。

考 察

GalN投与によるミニラットの肝炎は、その病理組織学的所見に基づき、初回投与から7日後までの急性肝炎期と、初回投与から2~4週後までの亜急性肝炎期とに分類でき、また、急性肝炎期はさらに、炎症の顕著な48時間後までの炎症期と、その後7日目までの小型上皮細胞の増殖期とに分類することが出来る (Fig.11)。急性肝炎期の炎症期で、48時間後に炎症細胞浸潤がピークとなることは、Jonkerら (1990) のWistarラットでの報告と一致しているが、彼らの報告ではoval cellの増殖については一切触れていない。

急性肝炎期の増殖期から亜急性肝炎期に観察された増殖小型細胞は、その免疫組織化学的性状と電子顕微鏡観察の所見から、いわゆるoval cellと考えられた。また、免疫染色の結果からは、亜急性肝炎期にoval cellが胆管上皮細胞系へと分化していることが示唆されたが、肝細胞系への分化を示唆する所見は組織切片上では観察されなかった。ラット肝で増殖するoval cellの分化については胆管上皮細胞への分化を報告したものが多く (Renato et al. 1992)、肝細胞への分化を報告したものは少ない。その中で、Lemireら (1991) は、GalN投与後の早期に³Hでoval cellをラベルし、その後の肝内でのラベル化細胞の動態を追跡して、肝細胞への分化を示唆し、DavevaとShafritz (1993) やGoldingら (1995) は、in situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学とを組み合わせた手法により、ラットのGalN肝炎でoval cellの肝細胞への分化を示唆している。また、電子顕微鏡所見で肝細胞への分化を示唆した報告もあるが (Alisonetal.1993)、今回の検索ではそのような所見は認められなかった。

一方、oval cellが最初にグリソン鞘とその周囲の実質との境界部に出現し、その後、肝小葉内へと増殖、侵入していくという今回示された所見は、oval cellがグリソン鞘近辺で小葉内胆管が小葉間胆管へと移行するヘリング管に由来すると推察しているこれまでの報告を支持するものである (Factor et al. 1994; Fausto 1990; Sell 1990;

Sigal et al. 1992; Wilson and Leduc 1958)。

本章で示した通り、ミニラットでは投与の7日後においてもoval cellの増殖が依然として明瞭に観察された。すなわち、我々の行った予備実験を含め、これまでの他の系統のラットを用いた実験結果 (Lemire et al. 1991) と比較すると、ミニラットでは、我々の予想通り、GalN肝炎で出現するoval cellの増殖期間が有意に延長することが示された。これは、ミニラットでは成長ホルモンの合成が抑制されていることと関連があると思われる。この点に関しては、緒言でも述べた通り、下垂体切除ラットでは部分切除後の肝再生が遅延し、この肝再生遅延は成長ホルモン投与により回復することが報告されている (Untermann and Phillips 1986; Hemingway and Cater 1958; Rabes and Brandle 1969; Uthne and Uthne 1972; Ekberg et al. 1992)。また、我々のミニラットでの同様の実験 (Uetsuka et al, 1997) では、ミニラットの由来系統であるWistarラットと比較して、肝部分切除の24~48時間後の肝細胞のbromodeoxyuridine (BrdU) およびproliferating cellular nuclear antigen (PCNA) のラベル率に有意差 (ミニラットがWistarラットよりも低い) が見られた。こうした所見から、ミニラットでの成長ホルモンの合成抑制が肝細胞の再生に負の影響を及ぼし、oval cellの増殖の延長を誘導している可能性が十分に考えられる。

結論として、ミニラットではGalN投与により出現するoval cellの増殖期間が他の系統のラットと比較して延長すること、および、oval cellはまずグリソン鞘周囲に出現し、ついで肝小葉内へと侵入して行き、微細管腔状構造をとりつつ胆管上皮細胞系へと分化することが明示された。oval cellの増殖が長期にわたって観察されることから、ミニラットのGalN肝炎モデルは、oval cellの研究に非常に有用であると考えられる。

要 約

アンチセンス遺伝子の導入により成長ホルモンの産生が抑制されたトランスジェニック動物であるJcl: Wistar TgN (ARGHGEN) 1Ntsラット(ミニラット)に、1000mg/kgの塩酸D-ガラクトサミン(GalN)を1週間に1回、4週間にわたって腹腔内投与した。肝では肝細胞壊死を伴うリンパ球・好中球を主体とする炎症細胞浸潤が投与の48時間後に最も顕著となり、その後、炎症巣は次第に減退して5~7日後には消失した。投与の72時間後の肝では、グリソン鞘とその周囲の実質との移行部に小型の卵円形細胞が観察され、この小型細胞は次第に増殖して小葉内へと侵入し、7日後には肝小葉内で小塊状、線条状あるいは微細管腔状の構造を形成して明瞭に増殖していた。この細胞は、免疫組織化学的に胎児性肝細胞マーカーである α フェトプロテインと胆管上皮細胞マーカーであるサイトケラチン7の両方に陽性を示し、電子顕微鏡所見と合わせて、いわゆるoval cellであると考えられた。他の系統のラットと比較すると、ミニラットではGalN投与後のoval cellの増殖が延長していたが、この増殖延長には成長ホルモンの合成抑制による肝細胞の再生抑制が関与しているものと推察された。一方、GalN初回投与の2週後以降の肝では、oval cellの微細管腔状の増殖が小葉内で目立つようになり、また、免疫組織化学的に α フェトプロテインに陽性を示すoval cellは減少し、4週後にはグリソン鞘周辺の少数のoval cellのみが α フェトプロテインとサイトケラチン7の両方に陽性を示すほかは、サイトケラチン7にのみ陽性を示した。この結果から、oval cellは胆管上皮細胞系へと分化することが明示された。

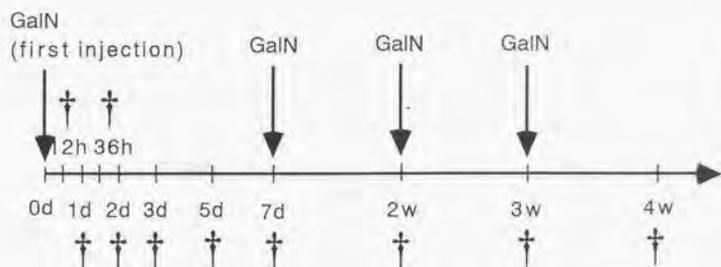


Fig.1 Experimental design. Forty rats were intraperitoneally (ip) administered with 1000mg/kg b.w. of D-galactosamine hydrochloride (GalN) (\downarrow) once a week for 4 weeks. The injection volume was adjusted to 10ml/kg b.w. using 0.9% saline. Thirty rats received the same volume of 0.9% saline and served as controls. Four experimental rats and 3 control ones were killed by exsanguination under ether anesthesia at 12, 24, 36, 48 hours and 3 and 5 days and 1, 2, 3 and 4 weeks after the first GalN-administration, respectively (\uparrow).

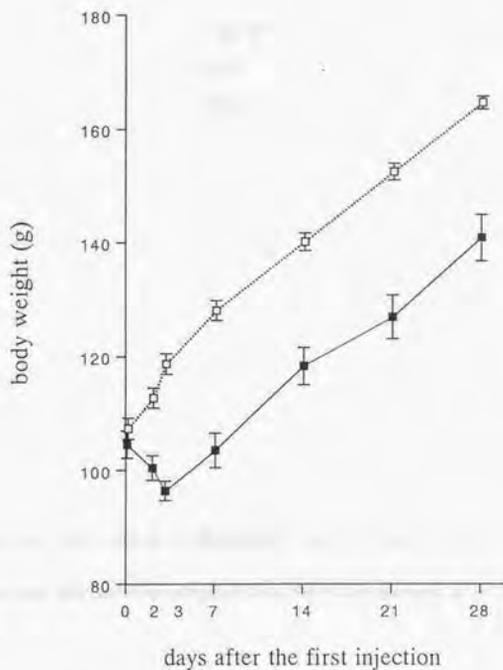


Fig.2 Changes in body weights.
 ■: Experimental group ; □: Control group.
 Each point represents the mean value and the vertical bar the standard errors.

Fig.3

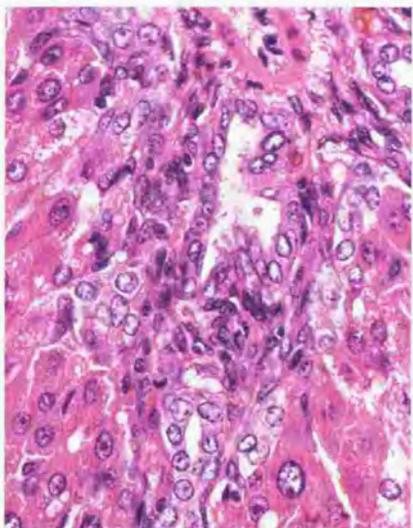
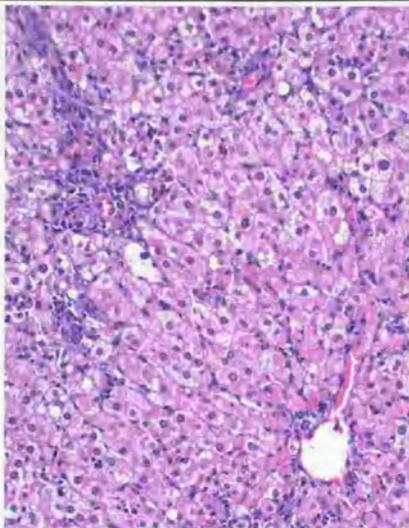
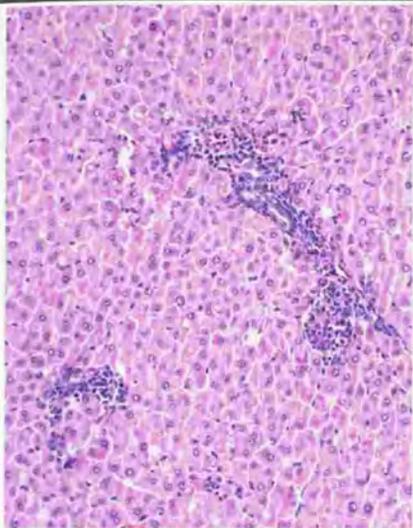
Fig.4

Fig.5

Fig.3 Liver of a Mini rat at 12 hours after the first GalN-injection. Small foci of necrotic hepatocytes with inflammatory cell infiltration are sporadically seen. HE, x200.

Fig.4 Liver of a Mini rat at 48 hours after the first GalN-injection. Many small foci of inflammatory cell infiltration are seen. HE, x200.

Fig.5 Liver of a Mini rat at 72 hours after the first GalN-injection. Proliferation of small epithelial cells is seen in the periportal area. HE, x640.



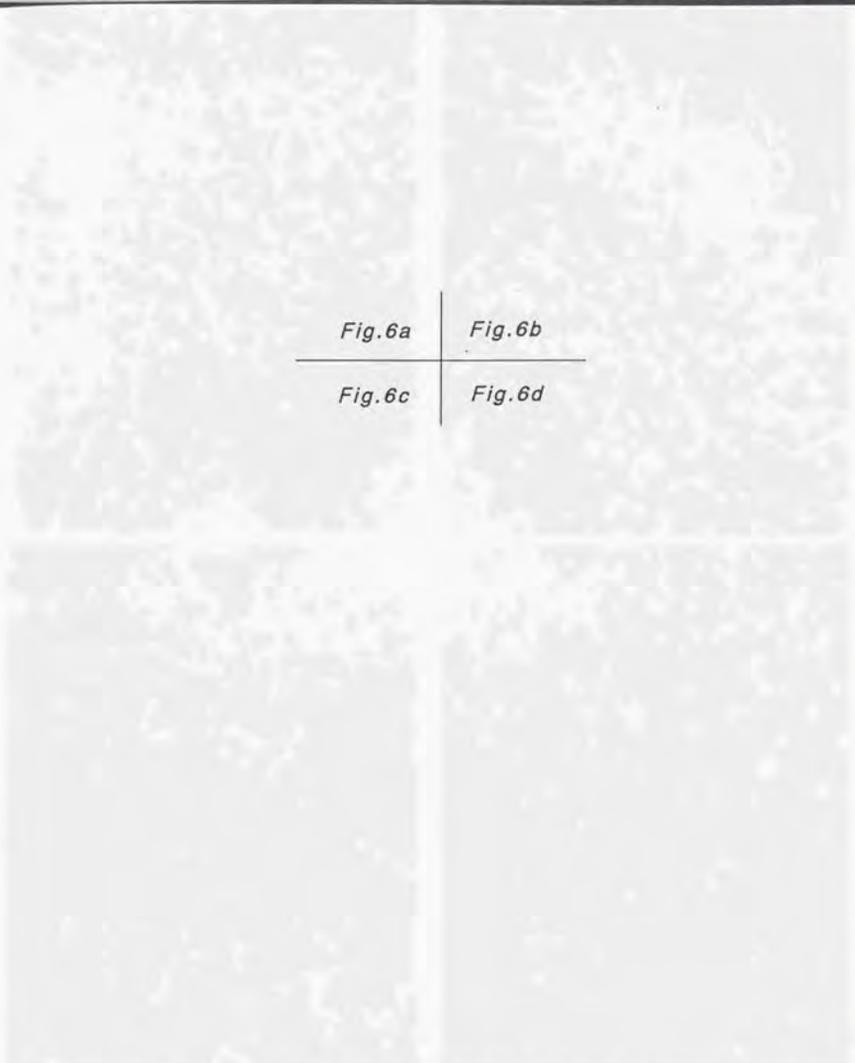


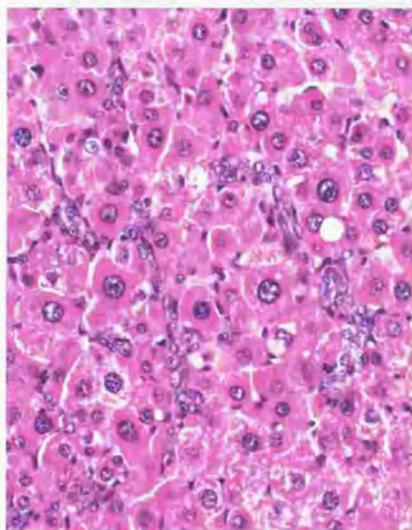
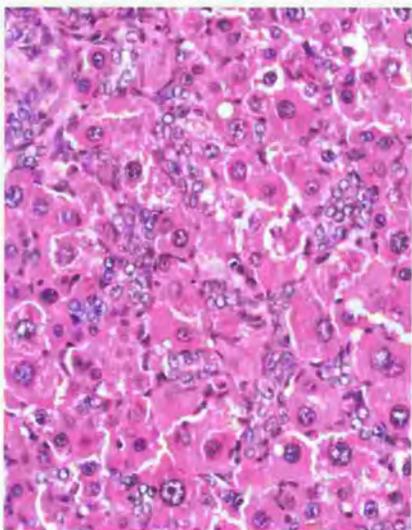
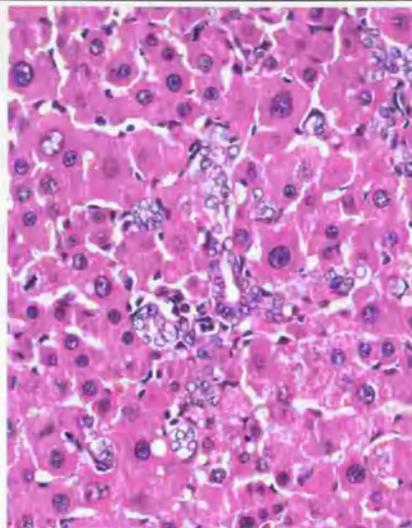
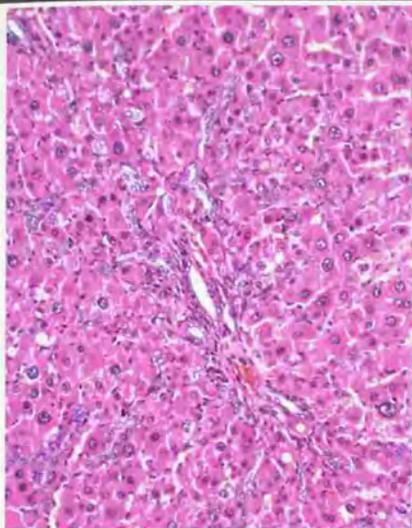
Fig. 6a

Fig. 6b

Fig. 6c

Fig. 6d

Fig. 6 Prominent proliferation of small epithelial cells is seen in the hepatic lobules at 1 week after the first GalN-injection (a). The small epithelial cells make up duct-like structures (b). Some proliferate in clusters (c) or radiate in rows (d) between the hepatocyte plates. HE, (a) x200, (b) (c) (d) x400.



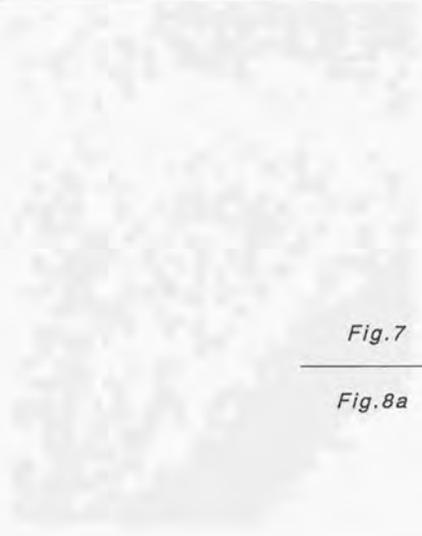


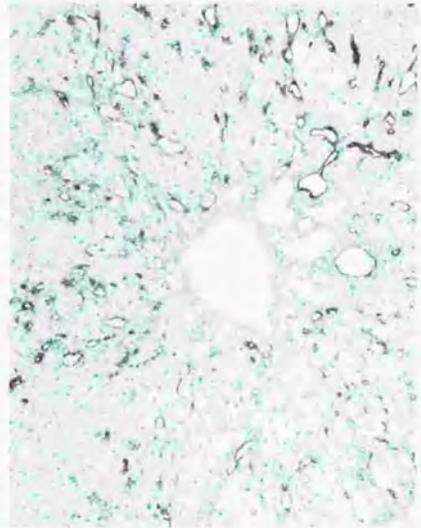
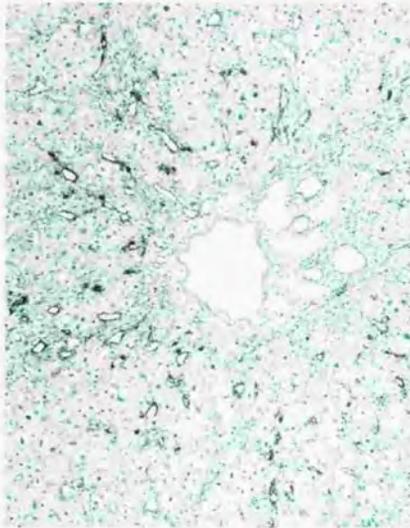
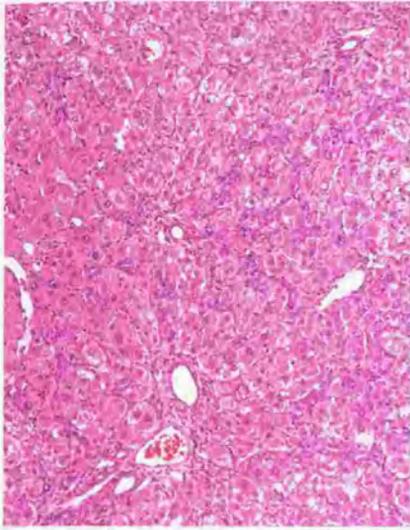
Fig.7

Fig.8a

Fig.8b

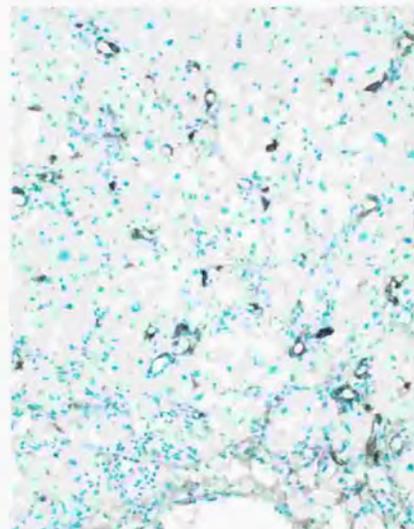
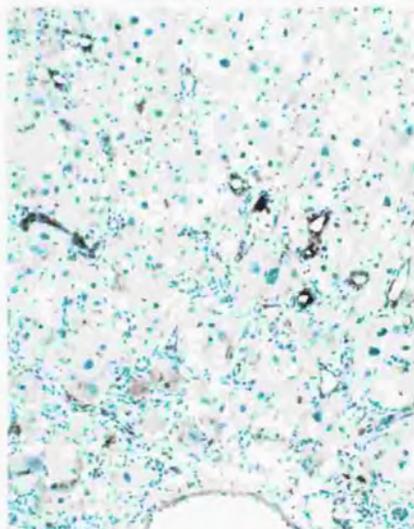
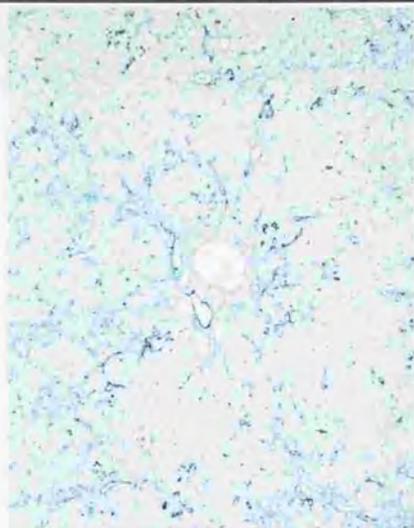
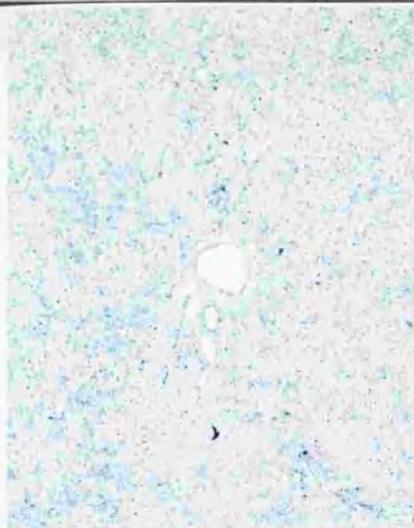
Fig.7 Prominent proliferation of small epithelial cells is seen in the hepatic lobules at 4 weeks after the first GalN-injection. Most of the cells make up duct-like structures. HE, x120.

Fig.8 Liver of a Mini rat at 1 week after the first GalN-injection. Many small epithelial cells are positive for both α -fetoprotein (a) and cytokeratin 7 (b). Immunostaining, x100.



<i>Fig.9a</i>	<i>Fig.9b</i>
<i>Fig.9c</i>	<i>Fig.9d</i>

Fig.9 Liver of a Mini rat at 4 weeks after the first GalN-injection. Most of the small epithelial cells lose their positive stainability for α -fetoprotein (a), and almost all of them are positive only for cytokeratin 7 (b). A few small epithelial cells in the periportal area are positive for both α -fetoprotein (c) and cytokeratin 7 (d). Immunostaining, (a) (b) x50, (c) (d) x200.



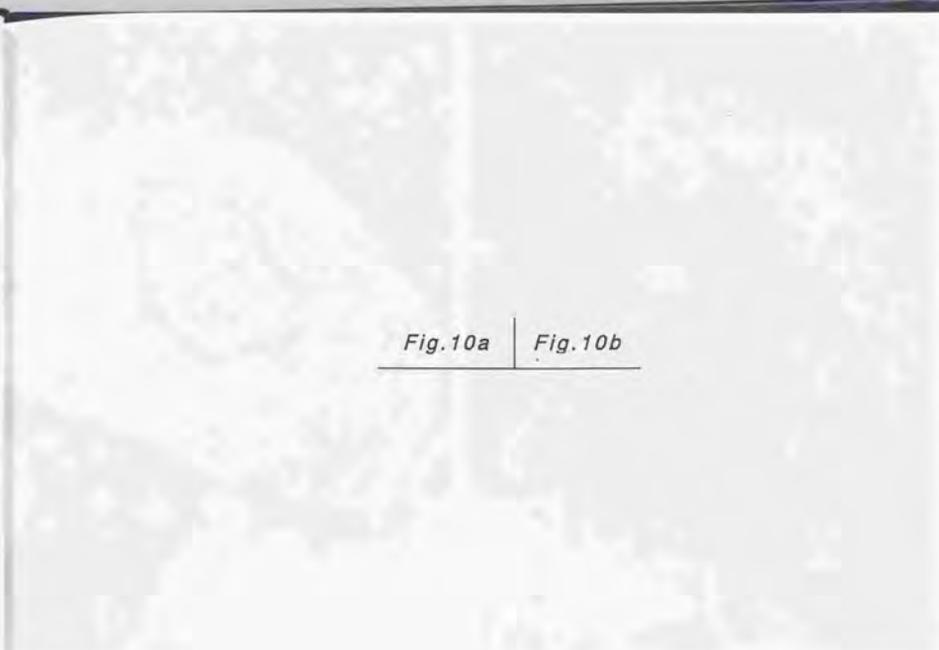
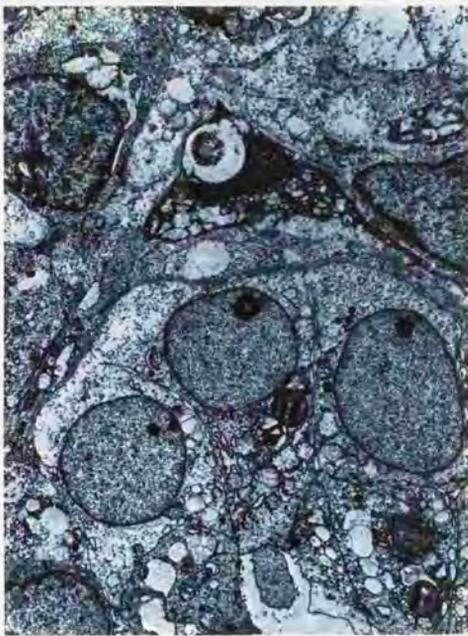
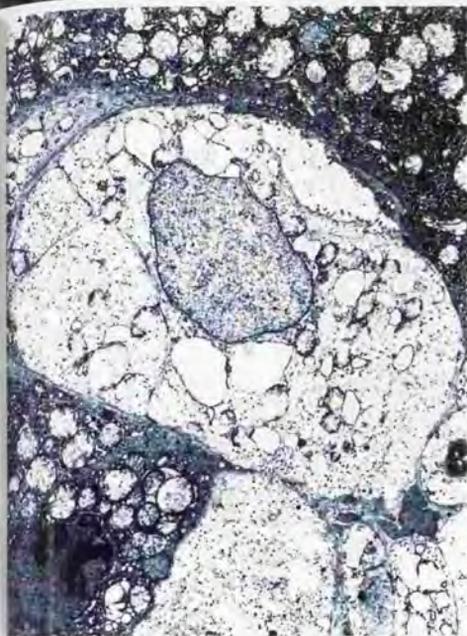


Fig. 10a

Fig. 10b

Fig. 10 Small epithelial cells in the liver of a Mini rat at 7 days after the first GalN-injection. The cells have electron-lucent round to oval nuclei and scanty intracytoplasmic organelle (a). Intracytoplasmic organelle are somewhat more developed in the cells making up a duct-like structure (b). Electron microscopy (a) x4,800, (b) x3,750.



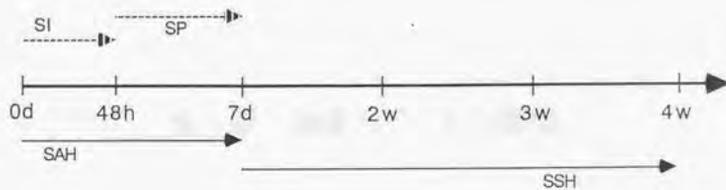


Fig.11 Stage of GalN-induced hepatitis in Mini rats.

SI: Stage of Inflammation

SP: Stage of Small Epithelial Cell Proliferation

SAH: Stage of Acute Hepatitis

SSH: Stage of Subacute Hepatitis

第3章 細胞外基質の動態

序

第2章では、ミニラットのGalN誘発肝炎において、oval cellは組織学のおよび免疫組織化学的に胆管上皮細胞系へと分化することを明示した。このoval cellの増殖と分化に影響を及ぼす肝内微小環境因子の一つとして、本章ではまず細胞外基質の動態について検索を行なう。

緒言でも述べた通り、細胞外基質は従来組織を構築するための足場あるいは空隙を埋める間充組織としてのみ機能していると考えられてきたが、最近では組織を構築している細胞の形態発現や増殖などに対して直接的あるいは間接的に調節・制御の機能を果たしていることが明らかとなってきた (Bruijn et al. 1988; Reif et al. 1990; Martinez-Hernandez 1991)。すなわち、細胞外基質は、インテグリンなどの接着分子を介して周囲細胞との直接的な接着による細胞-基質間相互作用を調節するほかに (von der Mark and Kuhl 1985; Ruoslahti and Pierschbacher 1986; Tamkun et al. 1986; Urushihara and Yamada 1986; Dedhar et al. 1987)、細胞外基質に増殖因子をつなぎとめておき、炎症などの環境変化に応じて係留をほどこき、局所での増殖因子濃度を調節するといった間接的な調節機構も知られてきた。したがって、oval cellの増殖および分化に細胞外基質の動態が影響を及ぼしている可能性は高い。

そこで、本章では、免疫組織化学的手法により、GalN投与後のミニラットの肝における細胞外基質成分 (フィブロネクチン、ラミニン、4型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン) の動態について詳細に検索した。

材料および方法

動物

6週齢の雄のミニラット (Jcl: Wistar-TgN (ARGHGEN) 1Nts strain) (体重: 95~115 g) を日本生物科学研究所より寄贈していただいた。動物は実験に供するまでの2週間の馴化期間およびその後の実験期間中、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、14時間人工照明 (7:00-21:00) の動物室でアイソレーター内で飼育した。動物は、プラスチック製ケージに5匹ずつ収容し、市販の固型飼料 (MF, オリエンタル酵母工業㈱, 東京) および上水道水を自由に摂取させた。

投与材料

塩酸D-ガラクトサミン (GalN) は、Sigma Chemical Co. (MO, USA) より購入した。GalNは、生理食塩水を溶媒として100mg/mlの濃度で溶解し、投与液とした。

GalNの投与

実験群として、28匹のミニラットに1000mg/kgのGalNを週に1回、4週間にわたって腹腔内投与した。21匹には対照群として同量の生理食塩水を投与した。初回投与から48、72時間後、5、7日後、および2、3、4週後に、実験群4匹、対照群3匹を、それぞれエーテル麻酔下で安楽殺し、肝を採取した (Fig.1)。肝は目的に応じて、10%中性緩衝ホルマリンで固定するか、あるいは未固定のままドライアイス/アセトンで急速凍結した。

病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリンで固定した肝から常法にしたがって4 μm のパラフィン切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色を施して鏡検した。

免疫組織化学的検査

安楽殺した動物から肝を採取後迅速に肝のスライスを作製し、未固定のままコンパウンド中に包埋してドライアイス/アセトンで急速凍結後、 -80°C で保存した。保存材料より $6\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製して、 -20°C のアセトン中で10分間固定した後、免疫染色に使用した。1次抗体として、抗マウスラミニン・ウサギポリクローナル抗体、抗ウシフィブロネクチン・ウサギポリクローナル抗体、抗マウス4型コラーゲン・ウサギポリクローナル抗体（以上全て、L.S.L. Co., Japan）、および抗ヘパラン硫酸プロテオグリカン・マウスモノクローナル抗体（Seikagaku Co., Tokyo, Japan）を使用した。免疫染色はアビジン・ビオチン・コンプレックス（ABC）法にしたがい、Vector ABCキット（Vector Lab. Inc., U.S.A.）を用いて実施した。免疫染色後の核染にはメチル・グリーン染色液を用いた。

結 果

病理組織学的所見

第2章の結果と同様であった。

免疫組織化学的所見

GalN投与群では、初回投与の48時間後に、類洞壁に沿ってフィブロネクチンとラミニンの沈着が観察された (Fig.2)。72時間後には類洞壁沿いのフィブロネクチンとラミニンの沈着はより顕著となり、さらに、グリソン鞘とその周囲の実質との境界部に出現したoval cellの周囲には、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着が観察された (Fig.3)。

GalN投与群では、初回投与の7日後にはoval cellの増殖はグリソン鞘周囲の実質内へと拡大し、こうした増殖oval cell周囲には依然としてヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着が観察された (Fig.4)。フィブロネクチンとラミニンの沈着は、類洞壁に沿った部位に加え、増殖oval cellの周囲でも観察された。また、4型コラーゲンの沈着もほぼ同様、類洞壁と増殖oval cellの周囲で顕著となっていた (Fig.5)。

初回投与の2週後以降には、類洞壁に沿ったラミニンとフィブロネクチンの沈着は次第に減少していき、4週後にはフィブロネクチンの沈着はほとんど消失した。ラミニンに関しては、類洞壁沿いの沈着は消失したが、増殖oval cellが形成する微細管腔状構造周囲の沈着は依然として観察された。一方、4型コラーゲンおよびヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着は依然としてoval cell周囲で顕著であった (Fig.6)。

考 察

発生過程や種々の実験的処置後における肝の細胞外基質の変化は、最近発表された多くの研究やレビューで報告されている (Martinez-Hernandez et al. 1991; Reif et al. 1990; Martinez-Hernandez 1984, 1985; Bucher et al. 1990; Rojkind 1991; Milani et al. 1989; Ogawa et al. 1986; Bissell et al. 1990)。本章の結果では、oval cellの増殖の始まる以前のGalN投与48時間後には、類洞壁に沿ってフィブロネクチンとラミニンの沈着量の増加が観察された。JonkerらのWistarラットを使用したGalN誘発急性肝炎(1992)では、フィブロネクチンの沈着は壊死性炎症領域や類洞壁およびグリソン鞘で投与の12時間後より観察され始め、48時間後に最大となり、72時間後には沈着は減弱していた。このように、Jonkerらの報告では本章の結果よりもフィブロネクチン沈着の開始、増強、消失ともに早期に起こっているが、フィブロネクチンの沈着が細胞外基質成分の中で最も早期に起こっている点は共通している。この点、障害に対する組織修復に関する研究の大半で、組織の種類を問わず、フィブロネクチンの沈着は最初期の現象として観察されており (Contard et al. 1991; Casscells et al. 1990; Hurme et al. 1991; Wysocki and Grinnell 1990; Kuncio et al. 1991)、フィブロネクチンは炎症細胞の浸潤に関連し、その後の細胞外基質の沈着のための足場を提供するものと考えられている (Kuncio et al. 1991)。一方、ラミニンについては、ラットの肝部分切除の実験で、肝再生の初期ステージの間の肝細胞の増殖刺激と肝細胞特異的機能の維持とに関して、肝細胞-ラミニン相互作用が重要であることが示唆されている (Kato et al. 1992)。

Jonkerら(1992)は、WistarラットのGalN誘発肝炎において、フィブロネクチン、ラミニン、1型コラーゲン、3型コラーゲン、4型コラーゲンの変化について報告しているが、いずれの細胞外基質成分も本章のミニラットでの結果に比較して早期に消失した。一方、ミニラットの肝では細胞外基質の沈着は初期には時間経過とと

もに進行し、肝小葉内で増殖するoval cellの周囲に顕著に観察されるようになったことから、この違いはミニラットでのoval cellの増殖延長と関連があるものと思われる。

また、本章の免疫組織学的検索結果から、ミニラットの肝では、フィブロネクチンとラミニンは、グリソン鞘とその周囲の実質との境界部から始まって肝小葉内に拡大していく増殖oval cellの侵入に何らかの役割（例えばoval cellの侵入の道すじをつける等）を果たしていることが示唆された。これに対し、4型コラーゲンの沈着は、増殖oval cellの多くが微細管腔状構造を形成するようになる7日後に顕著となることから、oval cellの微細管腔状構造の形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

GalN初回投与の2週後以降には、増殖oval cellの周囲のラミニン、4型コラーゲン、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着は一層明瞭になっていくが、これらの細胞外基質成分は基底膜構成成分として知られているものであり（Rauterberg et al. 1981; Schuppan 1990; Martinez-Hernandez and Amenta 1993）、oval cellの周囲に基底膜を構成することによりoval cellの胆管上皮細胞系への分化を誘導している所見であると考えられる。このように、増殖oval cellの周囲への基底膜構成成分である細胞外基質の沈着が増強するのは対照的に、肝内のフィブロネクチンの沈着は消失していく。フィブロネクチンもまた基底膜構成成分の一つであるとする論文も見られるが（Hahn et al. 1980）、Martinez-HernandezとAmenta（1993）によれば、フィブロネクチンは基底膜成分には含まれていない。

本章の結果では、急性肝炎期の増殖期の初めから、他の基底膜成分の沈着に先立ち、増殖oval cellの周囲にヘパラン硫酸プロテオグリカンの明瞭な沈着が観察された。Gressner（1994）は、プロテオグリカンは肝の線維増生期に細胞機能の調節や細胞外基質の超分子構造の維持に潜在的に重要な役割を果たしており、また、プロテオグリカンの合成は筋線維芽細胞型である活性化した伊東細胞がその主体を担い、

TGF- β 1がその刺激の重要な役割を果たすことを示した。したがって、ヘパラン硫酸プロテオグリカンはoval cell周囲の伊東細胞により産生され、他の基底膜成分であるラミニンや4型コラーゲンの沈着に関与していることが示唆される。また、プロテオグリカンの中のデコリンやビグリカンは、TGF- β 1と結合することが報告されていることから (Yamaguchi et al. 1990; Ruoslahti and Yamaguchi 1991; Massague 1992)、他のプロテオグリカン成分がTGF- β 1の局所濃度の空間的調節機構を介してヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着に関与し、さらに伊東細胞の活性化や細胞外基質産生を調節していることも考えられる。

細胞外基質成分は密接な接着を通じて実質細胞の分化や増殖に影響を及ぼすことが知られており、細胞-基質間の相互作用はインテグリンなどのような特異的な形質膜レセプターを通じて発揮される (von der Mark and Kuhl 1985; Ruoslahti and Pierschbacher 1986; Tamkun et al. 1986; Urushihara and Yamada 1986; Dedhar et al. 1987)。したがって、oval cellがどのような接着分子を発現しているのかは不明であるが、oval cellの周囲に沈着した細胞外基質成分が、oval cellとの直接的な接触を通じて、oval cellの分化や増殖に影響を及ぼしていることも考えられる。

結論として、ミニラットのGalN肝炎では、まず、フィブロンectinとラミニンがグリゾン鞘周囲から小葉内へのoval cellの誘導に関与し、ついで増殖oval cellの周囲の基底膜構成成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニンおよび4型コラーゲンの沈着がoval cellの胆管上皮細胞系への分化を誘導したものと考えられ、このように、細胞外基質の沈着は、直接的および間接的にoval cellの増殖および分化を調節していることが示唆された。

要 約

ミニラットのGalN誘発肝炎で観察されるoval cellの増殖と分化に影響を及ぼす肝内微小環境因子の1つとして、細胞外基質の動態について検索を行なった。ミニラットに1000mg/kgのGalNを投与した後に起こる急性肝炎の炎症期には、肝の類洞壁に沿ってラミニンとフィブロネクチンの沈着が観察された。増殖期になるとoval cellの周囲でまず最初にヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着が見られ、その後、ラミニン、フィブロネクチン、4型コラーゲンの沈着が観察された。亜急性肝炎期には、類洞壁沿いのフィブロネクチンとラミニンの沈着は次第に消失した。oval cellの周囲ではフィブロネクチンの沈着は見られなくなり、基底膜構成成分（ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン、4型コラーゲン）の沈着だけが目立った。この結果から、oval cellはラミニンとフィブロネクチンの沈着に誘導されてグリソン鞘周囲から肝小葉内に侵入し、ついでoval cell周囲に沈着した基底膜成分（ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン、4型コラーゲン）に支えられて胆管上皮細胞系へと分化することが示された。すなわち、細胞外基質の沈着は、直接および間接的にoval cellの増殖と分化を調節していることが示唆された。

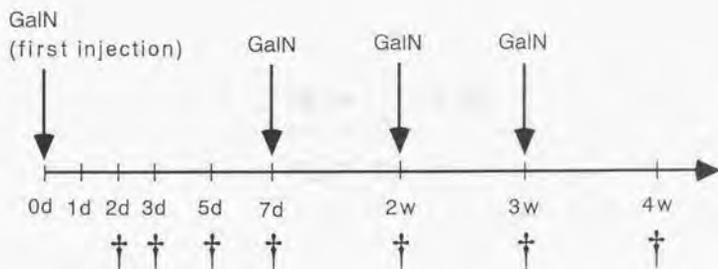


Fig.1 Experimental design. Twenty-eight rats were intraperitoneally (ip) administered with 1000mg/kg b.w. of D-galactosamine hydrochloride (GalN) (↓) once a week for 4 weeks. The injection volume was adjusted to 10ml/kg b.w. using 0.9% saline. Twenty-one rats received the same volume of 0.9% saline and served as controls. Four experimental rats and 3 control ones were killed by exsanguination under ether anesthesia at 2, 3, 5 and 7 days and 2, 3 and 4 weeks after the first GalN-administration, respectively (†).

Fig.2a

Fig.2b

Fig.3

Fig.2 Liver of a Mini rat at 48 hours after the first GalN-injection. The amounts of fibronectin (a) and laminin (b) increase along the sinusoidal lining. Immunostaining, x200.

Fig.3 Liver of a Mini rat at 72 hours after the first GalN-injection. The amount of heparan sulfate proteoglycan increases around the oval cells proliferating in the periportal area. Immunostaining, x240.

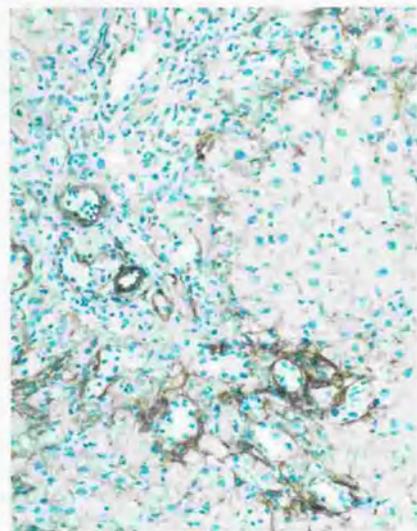
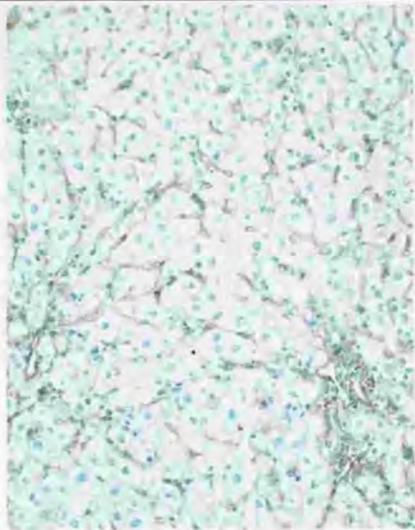
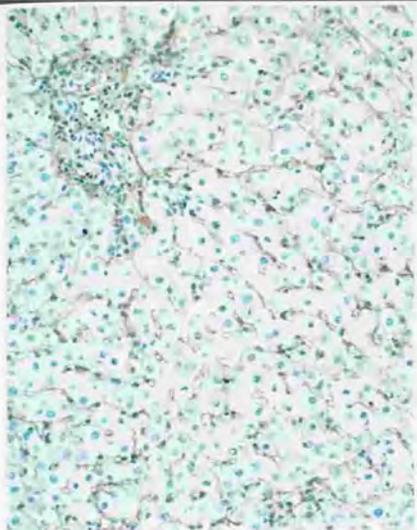
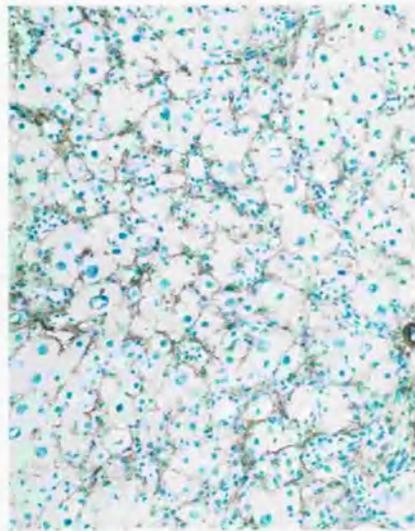
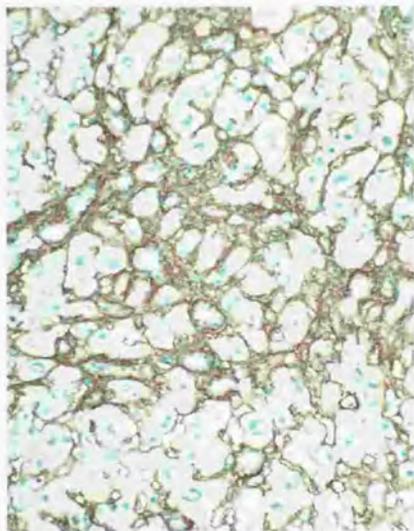
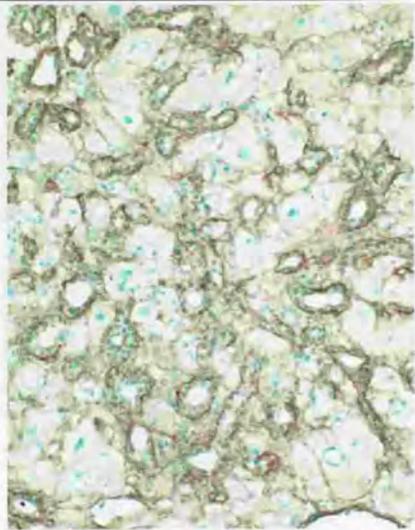
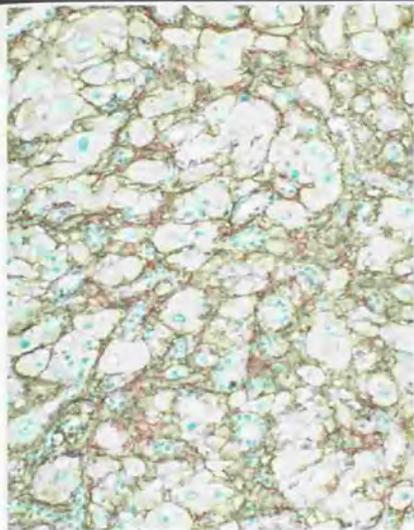




Fig.4 Liver of a Mini rat at 7 days after the first GalN-injection. Prominent deposition of fibronectin (a), laminin (b), type4 collagen (c) and heparan sulfate proteoglycan (d) is seen around the proliferating oval cells. Immunostaining, x200.



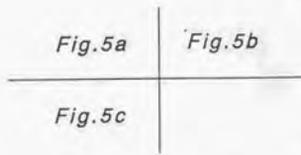


Fig.5 Liver of a Mini rat at 4 weeks after the first GalN-injection. Deposition of fibronectin (a) almost disappears, and that of laminin (b) is left only along the outer lining of the duct-like structures. On the other hand, deposition of type4 collagen (c) is still apparent. Immunostaining, x200.

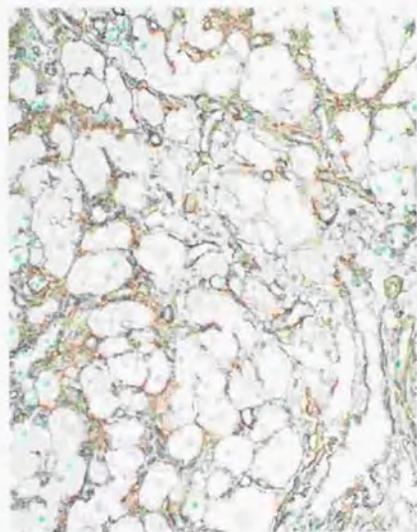
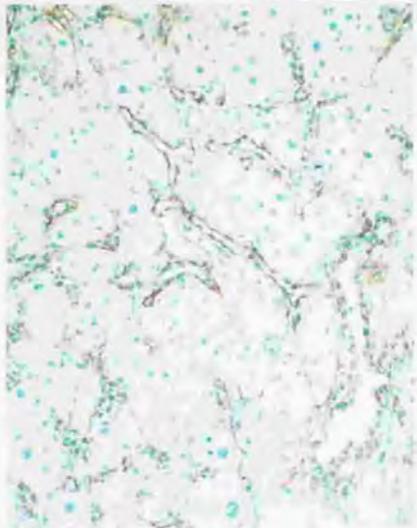


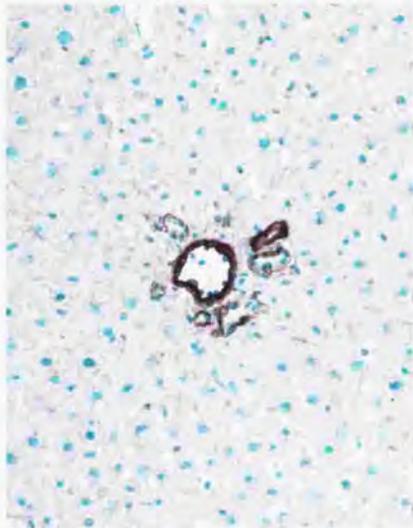
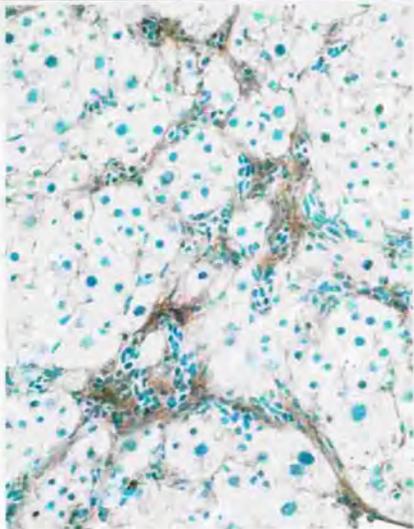
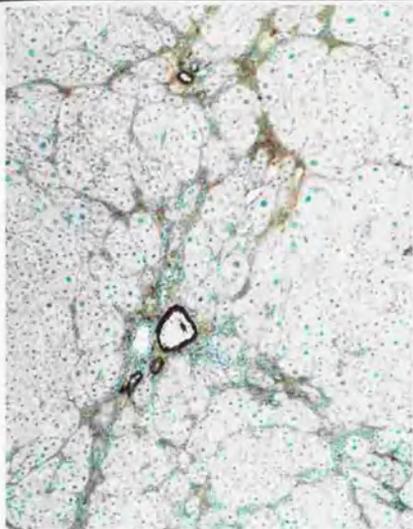


Fig. 6a

Fig. 6b

Fig. 6c

Fig. 6 Liver of a Mini rat at 4 weeks after the first GalN-injection. Deposition of heparan sulfate proteoglycan is still apparent (a, b). In portal area, positive stainings for heparan sulfate proteoglycan are observed in the wall of hepatic artery and vein and the basement membrane of bile duct (c). Immunostaining, (a) x100, (b) x320, (c) x320.



第4章 類洞壁細胞の動態

序

第3章では、oval cellの増殖と分化に影響を及ぼす肝内微小環境因子の1つとして、細胞外基質の動態について検索を行なった。本章では類洞壁に存在する伊東細胞とクッパー細胞の動態について検索する。

緒言でも述べた通り、肝内の細胞外基質の産生細胞としては、類洞壁に存在する伊東細胞の関与が強く示唆されている (Arenson et al. 1988)。また、伊東細胞は各種のサイトカインや増殖因子の分泌を介して肝炎の動態の調節に関与しているとの報告も多い (Hu et al. 1993)。したがって、oval cellの増殖と分化に対する細胞外基質の影響を考える場合には、伊東細胞を抜きにしては考えられない。一方、伊東細胞と同じく類洞壁に存在するクッパー細胞は、単球・マクロファージ系の細胞で、各種のサイトカインや増殖因子の分泌機能を有することが知られており (Kamimura and Tsukamoto 1995)、伊東細胞と同様、oval cellの動態に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

増殖因子には様々なものが知られているが、なかでもTGF- β 1は多数の実験モデルでその動態が解析されており、各種増殖因子の中でも最も主要なものの一つである。TGF- β 1の作用は実に多様であるが、oval cellの増殖・分化の調節との関連で考えると、細胞増殖抑制作用と細胞外基質産生促進作用が重要である。一方、HGFは細胞増殖を促進し、TGF- β 1と拮抗的に作用することが知られている (Nakamura et al. 1985; Yasuda et al. 1996)。

本章では、まず、伊東細胞とクッパー細胞の動態について免疫組織化学的に検索し、ついで、TGF- β 1とHGFについて、免疫組織化学的な検索を行ない、さらに、competitive RT-polymerase chain reaction (PCR) とin situ hybridizationの手法を用いて、それぞれの肝内での含量および分布の推移について検索した。

材料および方法

動物

6週齢の雄のミニラット (Jcl: Wistar-TgN (ARGHGEN) 1Nts strain) (体重: 95~115 g) を日本生物科学研究所より寄贈していただいた。動物は実験に供するまでの2週間の馴化期間およびその後の実験期間中、室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、14時間人工照明(7:00-21:00)の動物室でアイソレーター内で飼育した。動物は、プラスチック製ケージに5匹ずつ収容し、市販の固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業株, 東京)および上水道水を自由に摂取させた。

投与材料

塩酸D-ガラクトサミン (GalN) は、Sigma Chemical Co. (MO, USA) より購入した。GalNは、生理食塩水を溶媒として100mg/mlの濃度で溶解し、投与液とした。

GalNの投与

実験群として、32匹のミニラットに、1000mg/kgのGalNを週に1回、4週間にわたって腹腔内投与した。残りの24匹には対照群として同量の生理食塩水を投与した。初回投与から1、2、3、5日後、および1、2、3、4週後に、実験群4匹、対照群3匹を、それぞれエーテル麻酔下で安楽殺し、肝を採取した (Fig.1)。肝は目的に応じて、10%中性緩衝ホルマリンあるいは1%グルタルアルデヒドで固定するか、未固定のままドライアイス/アセトンで急速凍結した。

病理組織学的検査

10%中性緩衝ホルマリンで固定した肝から常法にしたがって4 μm のパラフィン切片を作製し、hematoxylin-eosin (HE) 染色を施して鏡検した。

免疫組織化学的検査

安楽殺した動物から肝を採取後、迅速に肝よりスライスを作製し、未固定のままコンパウンド中に包埋して、ドライアイス/アセトンで急速凍結し、 -80°C で保存した。保存材料より $6\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した後、 -20°C のアセトンで10分間固定した。1次抗体として、抗ニワトリデスミン・ウサギポリクローナル抗体（伊東細胞のマーカー）（Medac社、ドイツ）、抗ヒト α 平滑筋アクチン・マウスモノクローナル抗体（活性化伊東細胞のマーカー）（1A4, DAKO, Japan）、抗ラットED2抗体・マウスモノクローナル抗体（肝クッパー細胞のマーカー）（BMA Biomedicals社、スイス）、および抗ヒトtransforming growth factor (TGF) - β 1・ウサギポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA）、抗ラットhepatocyte growth factor (HGF)・マウスモノクローナル抗体（TOYOBO Co., Ltd., Japan）を使用した。免疫染色はアビジン・ビオチン・コンプレックス（ABC）法にしたがい、Vector ABCキット（Vector Lab. Inc., U.S.A.）を用いて実施した。免疫染色後の核染にはメチル・グリーン染色液を用いた。

competitive RT-PCR

ラットHGF遺伝子の増幅に特異的なプライマー（5'-primer, 5'-CCA ACA CAA ACA ACA GTA GG-3'; 3'-primer, 5'-AAC AAT GAC ACC AAG AAC CA-3', 増幅フラグメントサイズ: 585bp）とラットTGF- β 1遺伝子に特異的なプライマー（5'-primer, 5'-GCC CTG GAT ACC AAC TAC TGC TTC-3'; 3'-primer, 5'-TCA GCT GCA CTT GCA GGA GCG CAC GAT CAT-3', 増幅フラグメントサイズ: 340bp）は、Gibco BRL社に委託して合成した。採取した肝より1gをISOGENE（日本ジーン社）10ml中でホモゲナイズした後、total RNAを分離精製し、このtotal RNAの $5\ \mu\text{g}$ を、Gibco BRL社のキット（SUPERSCRIPT Preamplification System）を用いて逆転写反応を行ない、

1st strand cDNAを合成した。この1st strand cDNAは、MBI Fermentas社の *Thermus aquaticus* DNA polymeraseを用いて30サイクルのPCRに使用した。PCR産物は、1xTBE内で2.0%アガロースゲルで電気泳動した。

HGFおよびTGF- β 1のmRNAレベルの定量のためには、CLONTECH Laboratories社のPCR MIMIC Construction Kitを用いたcompetitive PCR法を行なった。競合用テンプレートはキットを使用してHGF, TGF- β 1それぞれに対して作製した。等量のcDNAを段階希釈した競合用テンプレートと同一チューブ内で増幅させ、合成産物はアガロースゲルで電気泳動して解析した。競合用テンプレートから増幅されるフラグメントのサイズは、cDNA由来のものと約150bpの長さの違いがあり (HGF : 395bp vs 585bp ; TGF- β 1 : 436bp vs 340bp)、同一チューブ内での増幅は両者の濃度に依存して起こった。

RNAプローブの準備

ジゴキシゲニン (DIG) でラベルした一本鎖のRNAプローブは、DIG RNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim, Germany) を用いて、使用説明書にしたがって作製した。

in situ hybridization

ミニラットから採取した肝をOCT (ornithine carbamyltransferase) コンパウンド (Miles Lab.) 中に包埋してドライアイス・アセトンで急速冷却後、クリオスタットを用いて厚さ6 μ mの切片を作製した。切片はAPSコートのスライドガラス上に張り付け、風乾した。このようにして作製した組織切片を、3%パラホルムアルデヒドを含むPBS溶液中で30分間固定し、さらにPBSで5分間ずつ3回洗浄した。ハイブリダイゼーションの方法は、Hirotaら (1992) のそれにしたがった。組織切片上でハイブリダイズしたcRNAプローブは、アルカリフォスファターゼ標識の抗ジゴ

キシゲニン抗体（500倍希釈）と4℃で16時間、湿度飽和させたチャンバー内で静置した後、Nucleic Acid Detection Kit（Boehringer Mannheim社）を用いて検出した。反応終了後の切片は、核染色をせずにグリセロールゲル中に封入後、光学顕微鏡下で観察し、写真撮影を行なった。

結 果

病理組織学的所見

第2章のそれと同様であった。

免疫組織化学的所見

GalN投与群では、初回投与の48時間後に肝小葉内の類洞壁でデスミン陽性の伊東細胞の増数がび漫性に観察された (Fig.2)。初回投与の7日後には、デスミン陽性の伊東細胞は類洞壁に加えoval cellの周囲でも観察された。また、 α 平滑筋アクチン陽性の活性化伊東細胞はoval cellの周囲に特異的に観察された (Fig.3)。こうした所見は、初回投与の2週後以降にも観察された (Fig.4)。

一方、GalN投与群の初回投与の48時間後に、類洞壁でED2陽性のクッパー細胞の増数が肝小葉内にび漫性に観察されたが、初回投与の7日後にはクッパー細胞は次第に減数していった。増数したクッパー細胞の分布とoval cellとの間に位置的な関連は見られなかった。4週後には、クッパー細胞の数は対照群とほとんど変わりなくなった (Fig.5)。一方、クッパー細胞の形態は、初回投与の48時間後には細胞質が明瞭に大型化していた (Fig.6)。

ついで、TGF- β 1とHGFの局在部位について免疫組織化学的解析を行なった。TGF- β 1については、GalN投与群の肝では初回投与の48時間後には陽性像は観察されなかったが、72時間後からoval cellの細胞質で陽性像が観察され始め、この陽性染色性は初回投与の4週後にも依然として観察された。また、実験群と対照群の両方で、実験期間を通じて、グリソン鞘の胆管上皮細胞の細胞質が明瞭な陽性像を示した (Fig.7)。

一方、HGFについては、GalN投与群の肝では初回投与の48時間後には陽性像は観察されなかったが、7日後以降の肝では類洞壁に存在する細胞の細胞質で陽性像が

観察された (Fig.8)。この陽性細胞は、oval cellの周囲に限らず、肝小葉内で比較的び漫性に観察された。これらの陽性細胞の同定を、連続切片を用いて免疫組織化学的手法で試みた結果、活性化伊東細胞およびクッパー細胞の双方がHGF陽性であった。

TGF- β 1 とHGFのmRNA量の定量結果

次に肝内のTGF- β 1 とHGFのmRNA含量を、competitive RT-PCRの手法により測定した。その結果、TGF- β 1 は48時間後にピークに達し、その後次第に減少していったが、投与群では実験期間を通じて対照群よりも高い値を示した (Fig.9)。これに対し、HGFは24時間後に一度ピークに達した後、48時間後には急速に減少し、ついで5日後に2回目のピークに達した。その後はTGF- β 1 と同様に次第に減少し、対照群と同等のレベルを示した (Fig.10)。初回投与の4週後にはTGF- β 1 およびHGFともに若干増加の傾向を示した。このように、TGF- β 1 はGalN投与の48時間後に一相性のピークを示し、HGFは24時間後と5日後に二相性のピークを示した。TGF- β 1 およびHGFともにピークが見られたのは急性肝炎期であり、亜急性肝炎期には顕著な増減は観察されなかった。なお、急性肝炎期におけるこれら増殖因子の絶対量は、TGF- β 1 の方がHGFよりも明らかに大きかった (Fig.9, 10)。

in situ hybridizationの所見

TGF- β 1 とHGFに関して、*in situ* hybridizationを行なった。HGFについては、初回投与の7日後以降の肝で増殖oval cellの周囲の類洞壁細胞にのみシグナルが観察された (Fig.11)。一方、TGF- β 1 については、実験期間を通じ、シグナルを検出することは出来なかった。

考 察

oval cellの増殖・分化へのクッパー細胞と伊東細胞の関与を、それぞれに対する特異抗体を用いた免疫染色法により検討した。その結果、急性肝炎期の増殖期から亜急性肝炎期を通じて、oval cellの周囲に限局して α 平滑筋アクチン陽性の活性化伊東細胞が観察された。一方、ED2陽性クッパー細胞は急性肝炎期の炎症期に顕著な増数が認められたが、その後は次第に減数した。また、oval cellとの間に特別な位置的關係は認められなかった。伊東細胞とクッパー細胞はともに各種サイトカインや増殖因子などの液性因子を産生することが知られており、このような液性因子はオートクラインやパラクラインといった作用機構で標的細胞に作用を發揮する。したがって、上記の所見からは、クッパー細胞よりも伊東細胞の方がoval cellに対して液性因子を介した作用を及ぼしている可能性が高いと考えられる。

次に、TGF- β 1とHGFのmRNAの定量を試みた。TGF- β 1は各種増殖因子の中で最も主要なものの一つで、TGF- β 1の有する多様な作用の中でも細胞増殖に対する抑制作用と細胞外基質産生に対する促進効果が重要であると考えられる。一方、HGFは細胞増殖を促進する作用を有し、TGF- β 1と拮抗的に作用するとされている(Nakamura et al. 1985; Yasuda et al. 1996)。competitive RT-PCRの手法を用いた今回のmRNAの定量結果はそれを支持するものであった。すなわち、初回投与の24時間後にはTGF- β 1およびHGFともに明らかな増加を示し、肝内のTGF- β 1はさらに増加して48時間後にピークに達したが、この時点でHGFは対照群と同等のレベルにまで減少した。その後、TGF- β 1が減少していくにつれ、5日後にはHGFは再びピークに達した。初回投与の2週後以降になると、TGF- β 1、HGFともほぼ対照群と同様なレベルで安定した。これは、急性肝炎期の炎症期にはTGF- β 1の絶対量がHGFのそれよりも明らかに大きく、TGF- β 1の細胞増殖抑制作用が優位に働き、HGFのmRNA合成が抑えられているが、急性肝炎期の増殖期にはTGF- β 1の作用が細胞外

基質産生促進に傾くため、拮抗作用が減少してHGFのmRNAの合成が増加してくることを示唆しているものと考えられる。

実際、HGFに対する特異抗体を用いた免疫染色の結果では、抗HGF抗体に陽性を示す細胞は急性肝炎期の炎症期には観察されず、急性肝炎期の増殖期および亜急性肝炎期になって、類洞壁に存在する紡錘形細胞で陽性像が観察された。この時点では、HGF陽性を示す類洞壁細胞は肝内での活性化伊東細胞の分布とは必ずしも一致せず、増殖oval cellの周囲以外の部位でも観察された。このHGF陽性の類洞壁細胞については、増殖oval cellの周囲の陽性細胞は、その分布から伊東細胞であると考えられた。一方、増殖oval cellの周囲以外の部位の陽性細胞は、クッパー細胞ないしは類洞内皮細胞であると考えられた。また、これらの所見から、前者がoval cellの増殖および胆管上皮細胞系への分化に影響を及ぼし、後者はその周囲の肝細胞の増殖に影響を及ぼしていることが示唆された。

一方、HGFのmRNAについてのin situ hybridizationの結果では、増殖oval cellの周囲の類洞壁細胞でのみシグナルが観察された。これは類洞壁を構成する細胞種間でHGFのmRNA合成量が異なっていることを反映しているものと考えられる。

これに対し、TGF- β 1に対する特異抗体を用いた免疫染色では、実験期間を通じ、増殖oval cellとグリソン鞘内の胆管上皮細胞の細胞質に抗TGF- β 1抗体に対する陽性像が観察された。しかし、この結果は、Lawrenceら(1994)がグリソン鞘内胆管上皮細胞で考察しているように、増殖oval cellとグリソン鞘内胆管上皮の細胞内でTGF- β 1が産生されていることを意味するものではないと考えられる。TGF- β 1は結合蛋白の付いた非活性型として分泌されるが、その活性化のために胆管上皮細胞の膜表面に存在するマンノース-6-リン酸/インスリン様増殖因子2レセプター(M6P/IGF2R)を利用しており、このM6P/IGF2Rに結合することによって、結合蛋白が外れて活性化される。Lawrenceらは、この活性化のための結合の際に、結合蛋白とともに一部のTGF- β 1が胆管上皮細胞内へと取り込まれ、免疫染色ではこの細

胞質内へと取り込まれたTGF- β 1が染まっているものと考察している。こうしたことから、oval cellもその細胞表面に胆管上皮細胞と同様にM6P/IGF2Rを発現している可能性が考えられ、oval cellでの抗TGF- β 1抗体に対する陽性像はoval cellの胆管上皮細胞系への分化を示唆する所見の一つであると解釈することも可能である。

TGF- β 1の産生細胞を明らかにするには、in situ hybridizationにより、そのmRNAを合成している細胞を示す必要がある。しかし、今回のin situ hybridizationの結果では、実験期間を通じて肝組織中でTGF- β 1のmRNAのシグナルを検出することは出来なかった。これには、肝内の細胞の種類によるTGF- β 1のmRNAの合成量の違いが考えられる。Bissellら(1995)は、70%肝部分切除による肝再生モデルと、胆管結紮による肝線維症モデルの両方で、肝細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、伊東細胞のそれぞれを分離精製して、TGF- β 1、 $-\beta$ 2、 $-\beta$ 3のmRNA量の変化をRNase protection assay法を用いて経時的に調べた。その結果、両モデル間でmRNA量の変化の様式に違いが見られ、肝再生モデルでは主として肝細胞のポピュレーションでTGF- β sのmRNA量の増加が見られたのに対し、肝線維症モデルでは伊東細胞のポピュレーションで増加が見られた。しかし、ここで言う増加とは、対照となる正常肝でのそれぞれの細胞ポピュレーションにおけるTGF- β sのmRNA量に対する増加であり、肝細胞ポピュレーションでのmRNA量は他の非実質細胞ポピュレーションでのmRNA量に比べて本来非常に少ない。Bissellらは、肝再生モデルと肝線維症モデルとでのTGF- β sのmRNA産生細胞の違いを、それぞれのモデルで発揮されるTGF- β sの主たる作用の違いに基づくと考察している。すなわち、肝再生モデルでは肝細胞の再生増殖に対する抑制効果が発揮され、肝線維症モデルでは細胞外基質の産生促進作用が発揮されるものと考え、それぞれのモデルで作用の標的となる細胞でTGF- β sのmRNA量が増加することから、TGF- β sの作用機序はオートクラインであると考察している。この考察にしたがえば、今回のモデルでは、急性肝炎期の炎症期にはTGF- β 1は主として細胞増殖抑制作用を発揮し、急性肝炎期の増殖期から亜

急性肝炎期にかけては細胞外基質の産生促進作用が主体となると考えられることから、competitive RT-PCR法による定量で示された急性肝炎期の炎症期で認められた肝内でのTGF- β 1のmRNA量のピークは、肝細胞ポピュレーションでの増加に主として起因するものと推察される。すなわち、肝全体としての増加は大きくとも、個々の肝細胞でのTGF- β 1のmRNA量の増加が小さかったため、in situ hybridizationで検出できなかったという可能性が考えられる。

結論として、免疫染色による結果からはoval cellの増殖・分化に対してはクッパー細胞よりも伊東細胞の関与の方が大きいと考えられた。また、competitive RT-PCRによる定量で、TGF- β 1は初回投与の48時間後に一相性のピークを、HGFは初回投与の24時間後と72時間後に二相性のピークを、それぞれ示した。HGFは、免疫染色とin situ hybridizationの結果から、類洞壁細胞で産生され、なかでも増殖oval cellの周囲では主として活性化伊東細胞により産生されることが示唆された。一方、TGF- β 1については、その産生細胞を特定することは出来なかった。

要 約

ミニラットのGalN誘発肝炎におけるoval cellの増殖と分化に影響を及ぼす肝内微細環境因子の1つとして、肝の類洞壁細胞（伊東細胞およびクッパー細胞）の動態について検索を行なった。その結果、免疫組織化学的検索では、急性肝炎期の増殖期と亜急性肝炎期を通じ、増殖oval cellの周囲に限って活性化伊東細胞の増数が観察された。一方、クッパー細胞数は、oval cellの周囲およびそれ以外の部位でも急性肝炎期の炎症期に著しく増加したが、その後減少した。こうした所見から、伊東細胞がoval cellの増殖に対して液性因子を介したパラクライン機構による調節を行っている可能性が示唆された。ついで、TGF- β 1とHGFの肝内での分布を免疫組織化学的に検索した結果、HGFタンパクは急性肝炎期の増殖期と亜急性肝炎期を通じ、肝小葉内の増殖oval cellの周囲およびそれ以外の部位の類洞壁細胞の細胞質で陽性像が観察された。一方、TGF- β 1タンパクは実験期間を通じて増殖oval cellとグリソン鞘内の胆管上皮細胞の細胞質で陽性像が観察された。さらに、肝内のそれぞれのmRNA量についてcompetitive RT-PCRにより定量を行なった結果、TGF- β 1のmRNAは初回投与の48時間後に一相性のピークを示したが、HGFのmRNAは初回投与の24時間後と5日後に二相性のピークを示した。最後に、in situ hybridizationによる検索結果では、HGFのmRNAは、急性肝炎期の増殖期と亜急性肝炎期を通じ、増殖oval cellの周囲の類洞壁細胞でシグナルが観察されたが、TGF- β 1のmRNAについては実験期間を通じてシグナルを検出することが出来なかった。以上の結果から、oval cellの増殖は主として伊東細胞によるHGFによるパラクライン機構での調節を受けている可能性が示唆され、また、TGF- β 1は急性肝炎期の炎症期には細胞増殖抑制作用が主体となるが、その後、急性肝炎期の増殖期から亜急性肝炎期にかけては細胞外基質産生促進作用が主体となって、伊東細胞による基底膜成分の合成・分泌を介し、oval cellの胆管上皮細胞系への分化を誘導しているものと推察された。

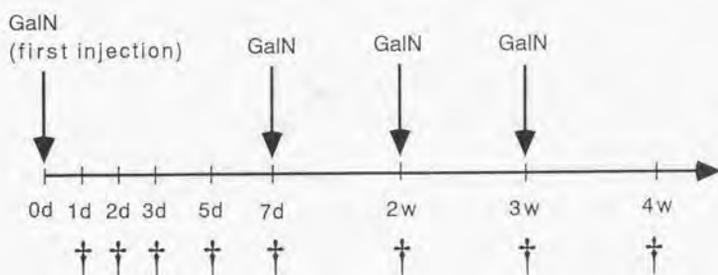
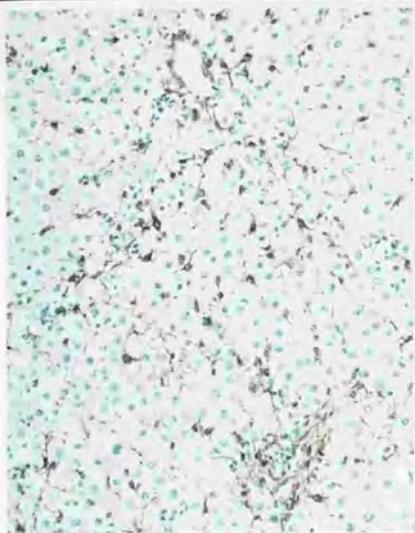


Fig.1 Experimental design. Thirty-two rats were intraperitoneally (ip) administered with 1000mg/kg b.w. of D-galactosamine hydrochloride (GalN) (↓) once a week for 4 weeks. The injection volume was adjusted to 10ml/kg b.w. using 0.9% saline. Twenty-four rats received the same volume of 0.9% saline and served as controls. Four experimental rats and 3 control ones were killed by exsanguination under ether anesthesia at 1, 2, 3 and 5 days and 1, 2, 3 and 4 weeks after the first GalN-administration, respectively (†).



Fig.2

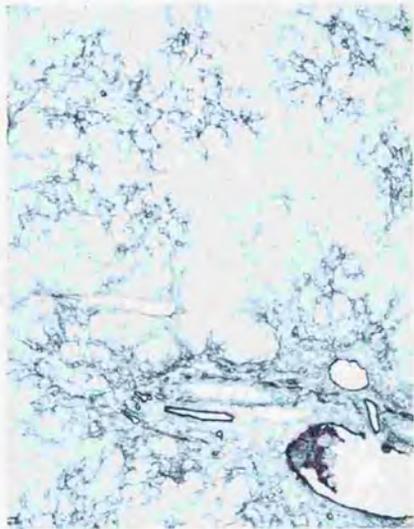
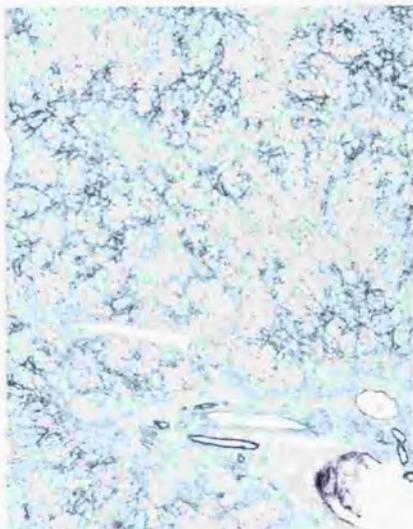
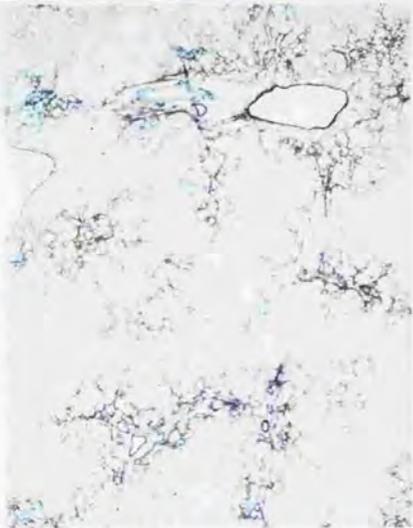
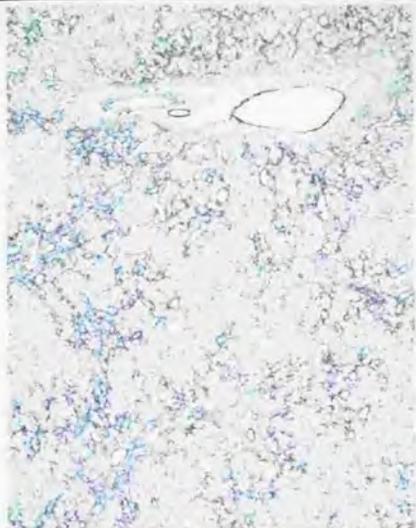
Fig.2 Liver of a Mini rat at 48 hours after the first GalN-injection. The number of Ito cells positive for desmin increases in the hepatic lobules. Immunostaining, x200.



<i>Fig.3a</i>	<i>Fig.3b</i>
<i>Fig.4a</i>	<i>Fig.4b</i>

Fig.3 Liver of a Mini rat at 1 week after the first GalN-injection. Many Ito cells are positive for both desmin (a) and α -smooth muscle actin (b). Immunostaining, x40.

Fig.4 Liver of a Mini rat at 4 weeks after the first GalN-injection. There are many desmin-positive Ito cells (a), a few of which are also positive for α -smooth muscle actin (b). Immunostaining, x50.



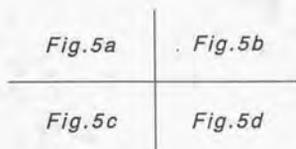
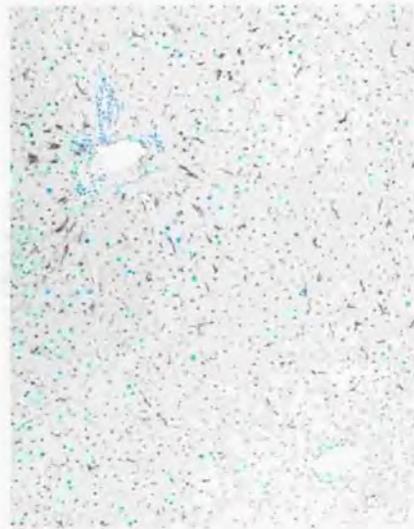
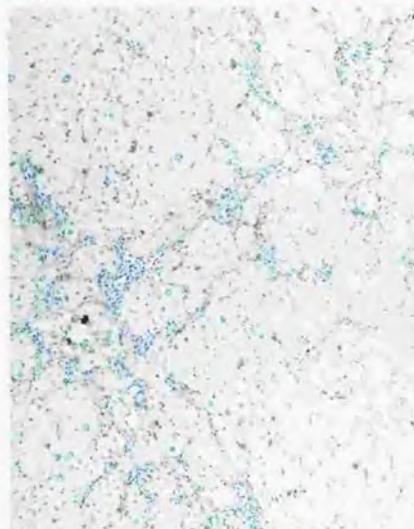
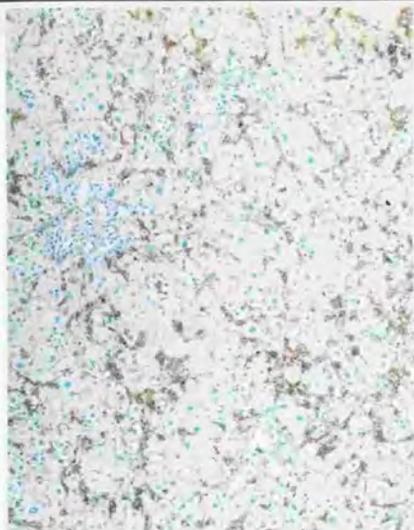


Fig.5 (a) Liver of a Mini rat at 48 hours after the first GalN-injection. The number of Kupffer cells increases in the hepatic lobules. (b) Liver of a Mini rat at 7 days after the first GalN-injection. The number of Kupffer cells decreases gradually. (c) Liver of a Mini rat at 4 weeks after the first GalN-injection. The number of Kupffer cells is almost the same with that in controls. (d) Liver of a Mini rat of control-group. Immunostaining using anti-ED2 antibody, x140.



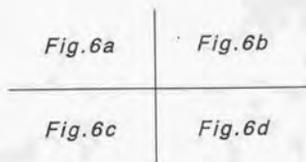
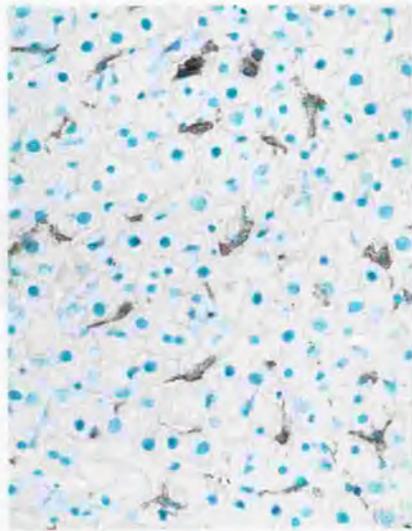
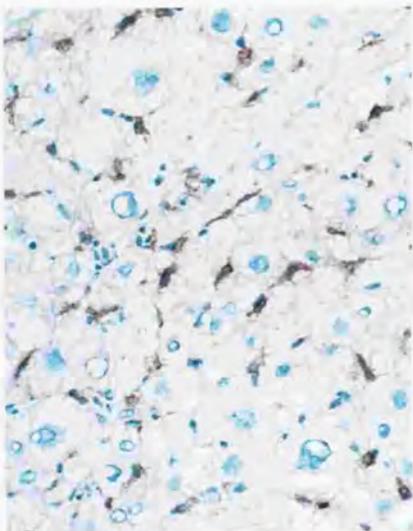
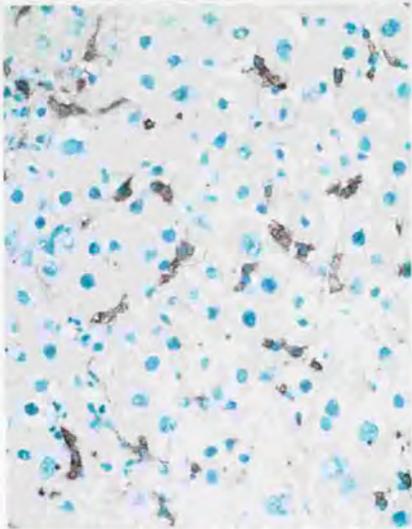
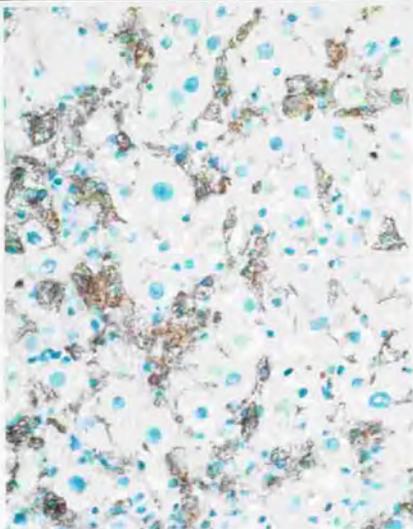


Fig.6 Liver of a Mini rat at 48 hours (a), 7 days (b), and 4 weeks after the first GalN-injection (c). Liver of a Mini rat of control-group (d). The cytoplasm of Kupffer cells is prominently enlarged at 48 hours after the first GalN-injection. Immunostaining using anti-ED2 antibody, x400.



<i>Fig.7a</i>	<i>Fig.7b</i>
<i>Fig.7c</i>	<i>Fig.7d</i>
	<i>Fig.7e</i>

Fig.7 Liver of a Mini rat at 72 hours (a), 7 days (b) and 4 weeks after the first GalN-injection (c, d). Liver of a Mini rat of control-group (e). Through the experimental period, cytoplasm of both oval cells and bile duct epithelial cells shows positive stainability for TGF- β 1. Immunostaining using anti-TGF- β 1 antibody, (a) x240, (b) x240, (c) x120, (d) x400, (e) x320.

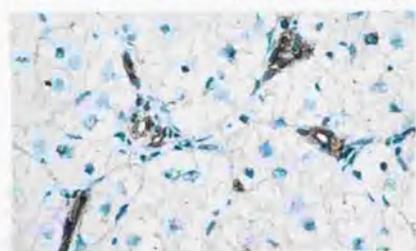
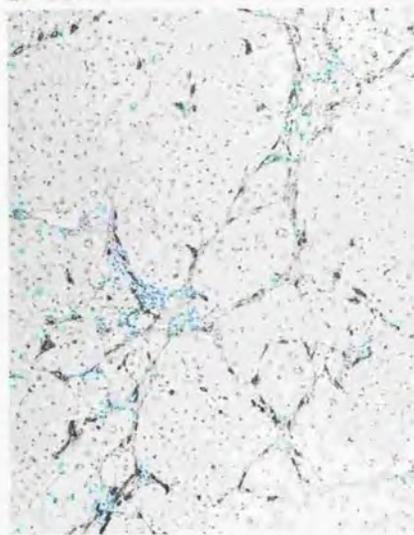
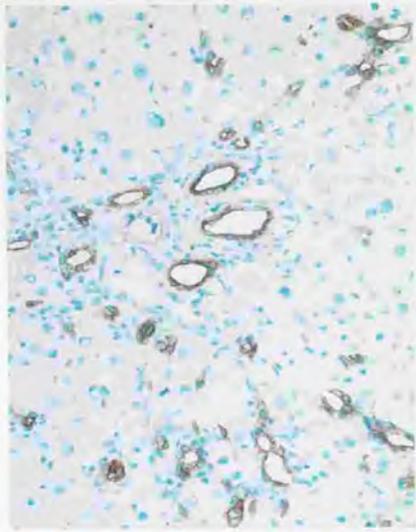
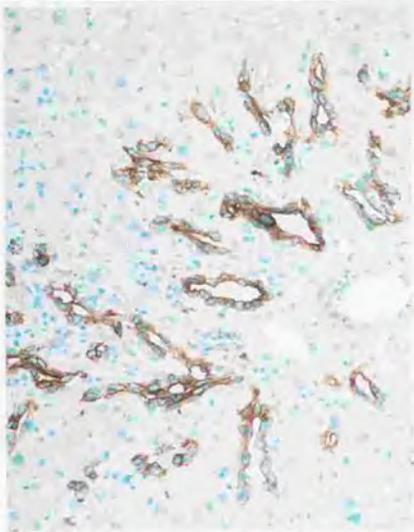




Fig. 8a

Fig. 8b

Fig. 8 Liver of a Mini rat at 7 days after the first GalN-injection. Sinusoidal lining cells positive for HGF are observed both around the proliferating oval cells (a) and among the hepatocytes (b). Immunostaining using anti-HGF antibody, x200.



(A)



(B)

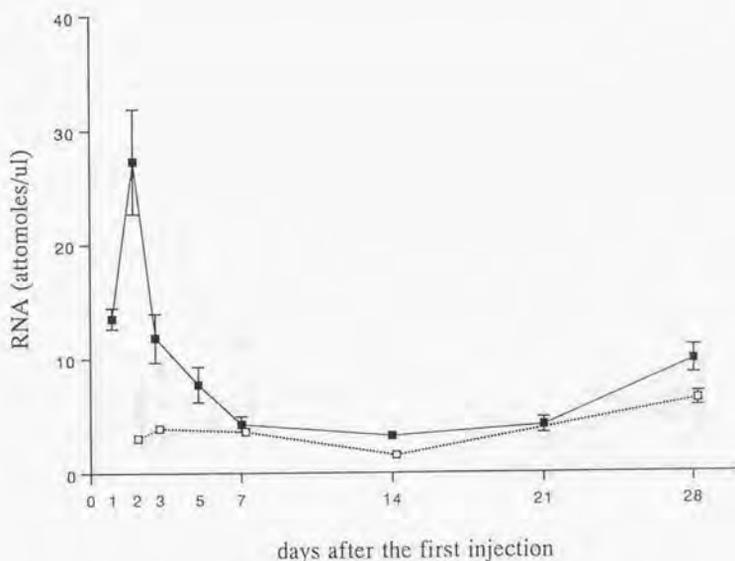


Fig. 9 Changes in contents of TGF- β 1 mRNA by competitive RT-PCR. ■: Experimental group ; □: Control group.

RNA was extracted from the liver of Mini rats and analyzed by RT-PCR with specific primers and a competitor for TGF- β 1 gene as described in Materials and Methods. The products of PCR were analyzed by electrophoresis on an agarose gel (A). The amplified fragment of the competitor (436 bp) was longer than that of TGF- β 1 cDNA (340 bp). For quantification of the level of TGF- β 1 mRNA, the gel was analyzed after electrophoresis with an image analyzer. Each point represents the mean value and the vertical bar the standard errors. Each point represents the mean value and the vertical bar the standard errors.

(A)



(B)

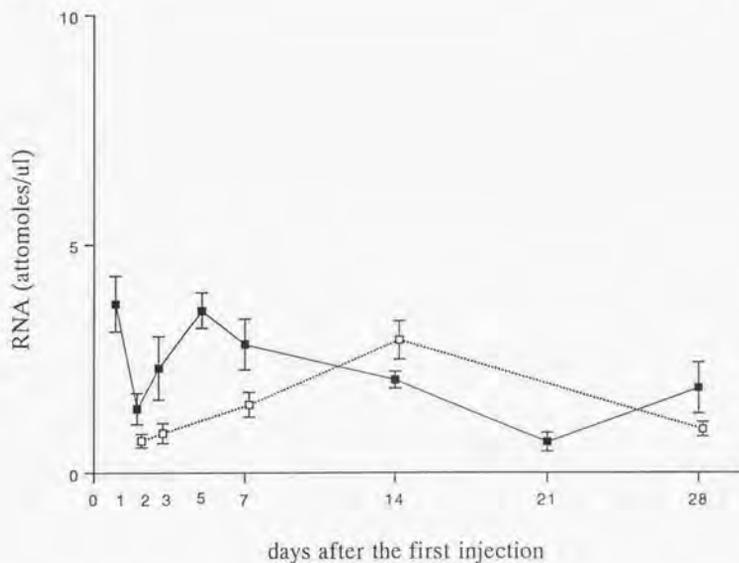


Fig.10 Changes in contents of HGF mRNA by competitive RT-PCR. ■: Experimental group ; □: Control group.

RNA was extracted from the liver of Mini rats and analyzed by RT-PCR with specific primers and a competitor for HGF gene as described in Materials and Methods. The products of PCR were analyzed by electrophoresis on an agarose gel (A). The amplified fragment of the competitor (395 bp) was shorter than that of HGF cDNA (585 bp). For quantification of the level of HGF mRNA, the gel was analyzed after electrophoresis with an image analyzer. Each point represents the mean value and the vertical bar the standard errors.

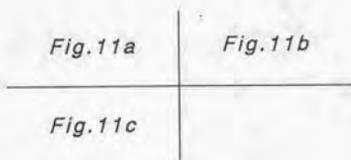
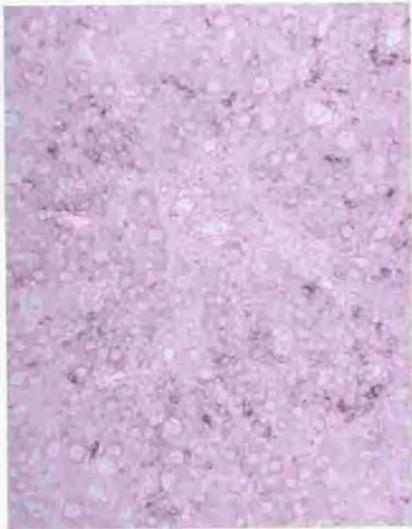
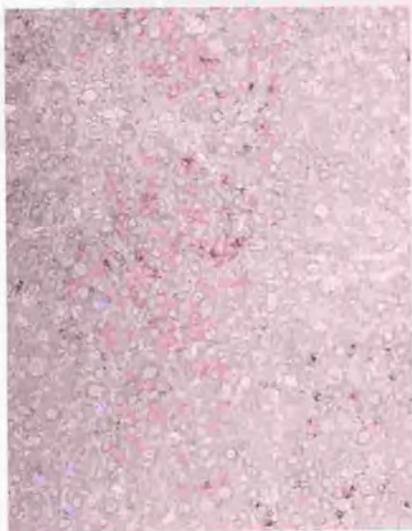


Fig. 11 Liver of a Mini rat at 7 days after the first GalN-administration. Signals for HGF mRNA are observed in the cytoplasm of sinusoidallining cells around the proliferating oval cells. (a) antisense probe, (b) sense probe, and (c) antisense probe. In situ hybridization for HGF mRNA, (a) x160, (b) x160, (c) x200.



第5章 総括

oval cellは肝に存在する幹細胞で、肝細胞と胆管上皮細胞の両方への分化能を有すると考えられており、肝障害後の再生過程で肝細胞の再生抑制がある場合に増殖してくるとされている。しかし、肝内における解剖学的な局在部位も含め、oval cellの増殖・分化の動態に関しては不明な点が多い。その理由の一つに、これまで利用されてきた実験系ではいずれもoval cellの増殖がごく一過性にしか認められないため、その動態を詳細に分析することが困難であったことが挙げられる。一方、細胞外基質は、従来、組織構築のための単なる足場としての認識しか持たれていない存在であったが、最近では細胞との接触を通じて細胞の分化や機能発現に直接的・間接的に影響を及ぼしていることが徐々に明らかにされてきている。

本研究では実験系としてガラクトサミン投与ミニラットの肝を用い、oval cellの増殖・分化の動態を細胞外基質、類洞壁細胞および増殖因子の動態との関連で検索した。試験系として用いたミニラット (Jcl: Wistar TGN (ARGHGEN) 1 Nts strain) は、成長ホルモンに対するアンチセンス遺伝子の導入により、成長ホルモンの合成が抑制されたトランスジェニック動物で、肝細胞の再生抑制があるところから、oval cellの増殖が長期間観察されることが期待できる。得られた結果は下記の通りである。

(1) oval cellの動態

6週齢、雄のミニラットに1000mg/kgのガラクトサミンを1週間に1回、4週間にわたって腹腔内投与した。対照群には同量の生理食塩水を腹腔内投与した。初回投与から1, 2, 3, 5, 7日後、および2, 3, 4週後に肝を採取し、各種の検索を行なった。

肝の病理組織学的検索では、リンパ球・好中球を主体とする炎症細胞浸潤が初回投与の1日後より観察され、2日後には最も顕著となり、肝細胞壊死を伴う多数の大型炎症巣が肝小葉内に観察された(急性肝炎の炎症期)。その後、炎症細胞浸潤は次第に減弱し、7日後にはほとんど観察されなくなった。一方、初回投与の3日

後よりグリソン鞘とその周囲の実質との移行部に小型卵円形細胞が出現し、7日後には肝小葉内で小塊状、線条状あるいは微細管腔状の構造を形成して明瞭に増殖していた（急性肝炎の増殖期）。小型卵円形細胞の増殖は初回投与の2週以降には肝小葉内にび漫性に拡大し、微細管腔構造状の増殖が主体となった（亜急性肝炎期）。

免疫染色では、これら小型上皮細胞のほとんどが胎児性肝細胞のマーカーである α フェトプロテインと胆管上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン7の両方に陽性を示したが、 α フェトプロテインに対する染色性は次第に減少し、初回投与の4週後には小型細胞の多くはサイトケラチン7にのみ陽性を示した。

このように、ミニラットの肝ではガラクトサミンの初回投与後7日目においてもoval cellの増殖が明瞭に観察され、増殖oval cellは胆管上皮細胞系へと分化することが明瞭に示された。

(2) 細胞外基質の動態

oval cellの増殖と分化に関与すると考えられる肝内微環境因子の一つとして、細胞外基質の動態に関して検索を行なった。その結果、急性肝炎期の炎症期には、oval cellの増殖、肝小葉内侵入に先立ち、類洞壁に沿ってラミニンとフィブロネクチンの沈着が観察された。増殖期になると、oval cellの周囲でまず最初にヘパラン硫酸プロテオグリカンの沈着が見られ、その後、ラミニン、フィブロネクチン、4型コラーゲンの沈着が観察された。亜急性肝炎期では、類洞壁沿いのフィブロネクチンとラミニンの沈着は次第に消失した。また、oval cellの周囲ではフィブロネクチンの沈着は見られなくなり、基底膜構成成分であるヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン、および4型コラーゲンの沈着だけが目立った。

以上の結果から、まず、類洞壁に沿ったラミニンとフィブロネクチンの沈着がグリソン鞘周囲から肝小葉内へのoval cellの侵入を誘導し、ついで、増殖oval cell周囲

のヘパラン硫酸プロテオグリカンをはじめとする基底膜成分の沈着がoval cellの胆管上皮細胞系への分化を誘導しているものと推察された。

(3) 類洞壁細胞の動態

細胞外基質とならぶ肝内微小環境因子として、類洞壁に存在する伊東細胞とクッパー細胞の動態について検索した。急性肝炎期の炎症期には、小葉内でびまん性に伊東細胞とクッパー細胞の増数が観察された。その後の急性肝炎期の増殖期から亜急性肝炎期にかけては、活性化伊東細胞の増数はoval cellの周囲でのみ観察され、一方、クッパー細胞数は次第に減少していった。

こうした細胞の動態を踏まえ、伊東細胞とクッパー細胞に由来すると考えられる増殖因子のうち、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) とhepatocyte growth factor (HGF) に関する解析を行なった。competitive RT-PCRによる定量では、TGF- β 1 mRNA量は初回投与の2日後に一相性のピークを示し、HGF mRNA量は1日後と5日後に二相性のピークを示した。ただし、この間の肝内での絶対量は、TGF- β 1の方がHGFよりも明らかに多かった。亜急性肝炎期では、TGF- β 1とHGFの両方ともに4週後には若干増加に向かう傾向がうかがえた。

免疫染色では、実験期間を通じ、TGF- β 1はoval cellと胆管上皮細胞の細胞質に陽性像が観察され、HGFは急性肝炎期の増殖期と亜急性肝炎期に類洞壁細胞に陽性像が観察された。このHGF陽性の類洞壁細胞は、oval cellの周囲に限らず、それ以外の部位でも観察された。oval cell周囲のHGF陽性細胞は伊東細胞と考えられ、胆管上皮細胞系へと分化するoval cellの増殖・分化に関与しているものと推察された。一方、oval cell周囲以外の部位のHGF陽性類洞壁細胞はクッパー細胞あるいは類洞内皮細胞と考えられ、その周囲の肝細胞の再生・増殖に関与している可能性が考えられた。

in situ hybridizationの結果では、HGFのmRNAに対するシグナルは増殖oval cellの周

围の伊東細胞と考えられる類洞壁細胞にのみ認められた。一方、TGF- β 1 のmRNA に対するin situ hybridizationでは、実験期間を通じてシグナルを検出することが出来なかった。

以上の結果から、ガラクトサミンの投与によりミニラットの肝に誘導されるoval cellの増殖期間は他の系統のラットと比較して有意に延長しており、このoval cellは類洞壁に沿ったフィブロネクチンとラミニンの沈着に伴ってグリソン鞘周囲から肝小葉内へと誘導され、さらに、oval cell周囲への基底膜成分（ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニン、4型コラーゲン）の沈着に伴って胆管上皮細胞系へと分化することが示された。また、このoval cellの増殖・分化に対して、伊東細胞によるパラクライン機構でのHGFを介した調節が示唆された。なお、急性肝炎期の炎症期にはTGF- β 1の細胞増殖抑制作用が主体となり、その後、急性肝炎期の増殖期から亜急性肝炎期にかけてはTGF- β 1の細胞外基質産生促進作用が主体となって、伊東細胞による基底膜成分の合成・分泌を介し、oval cellの胆管上皮細胞系への分化を誘導しているものと推察された。こうした細胞外基質の動態を介した細胞の増殖・分化の機構は、生物学的により普遍的な意義を持つものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行と論文作成にあたり、終始ご指導、ご鞭撻をいただき、ご校閲を賜った東京大学教授・土井邦雄博士に深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究をするに当たり、種々の援助をいただいた東京大学農学部獣医病理学教室の皆様へ深く感謝いたします。

参考文献

- Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Anilkumar TV, Jagoe R and Saffaf CE. (1993). Expression of hepatocyte growth factor mRNA during oval cell activation in the rat liver. *J Pathol* 171; 291-299.
- Arenson DM, Friedman SL and Bissell DM. (1988). Formation of extracellular matrix in normal rat liver: Lipocytes as a major source of proteoglycans. *Gastroenterol* 95; 441-447.
- Bissell DM, Friedman SL, Maher JJ and Roll FJ. (1990). Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology* 11; 488-498.
- Bissell DM, Wang S-S, Jarnagin WR and Roll GJ. (1995). Cell-specific expression of transforming growth factor- β in rat liver: Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 96; 447-455.
- Brujijn JA, Hogendoorn PCW, Hoedemacker PhJ and Fleuren GJ. (1988). The extracellular matrix in pathology. *J Lab Clin Med* 111; 140-149.
- Bucher NLR, Robinson GS and Farmer SR. (1990). Effects of extracellular matrix on hepatocyte growth and gene expression: implications for hepatic regeneration and the repair of liver injury. *Semin Liver Dis* 10; 11-19.
- Casscells W, Kimura H, Sanchez JA, Yu Z and Ferrans VJ. (1990). Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol* 137; 801-810.
- Contard F, Koteliansky V, Marotte F, Dubus I, Rappaport L and Samuel J. (1991). Specific alterations in the distribution of extracellular matrix components within rat myocardium during the development of pressure overload. *Lab Invest* 64; 65-75.
- Dabeva MD and Shafritz DA. (1993). Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 143; 1606-1620.

- Decker K and Keppler D. (1974). Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 71; 78-106.
- Dedhar S, Ruoslahti E and Pierschbacher MD. (1987). A cell surface receptor for collagen type I recognizes the Arg-Gly-Asp sequence. *J Cell Biol* 104; 585-593.
- Ekberg S, Luther M, Nakamura T and Jansson J-O. (1992). Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *J Endocrinol* 135; 59-67.
- Evarts RP, Nagy P, Marsden E and Thorgeirsson SS. (1987). A precursor relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 8; 1737-1740.
- Factor VM, Radaeva SA and Thorgeirsson SS. (1994). Origin and fate of oval cells in Dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* 145; 409-422.
- Farver GAL, Gill G and Konishi Y. (1973). Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am J Pathol* 72; 53-62.
- Fausto N. (1990). Oval cells and liver carcinogenesis: An analysis of cell lineages in hepatic tumors using oncogene transfection techniques. *Prog Clin Biol Res* 331; 325-334.
- Germain L, Goyette R and Marceau N. (1985). Differential cytokeratin and α -fetoprotein expression in morphologically distinct epithelial cells emerging at the early stages of rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 45; 673-681.
- Germain L, Noel H, Gourdeau H and Marceau N. (1988). Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res* 48; 368-378.
- Golding M, Sarraf CE, Lalani E-N, Anikumar TV, Edwards RJ, Nagy P, Thorgeirsson SS and Alison MR. (1995). Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatol* 22; 1243-1253.
- Gressner AM. (1994). Activation of proteoglycan synthesis in injured liver - a brief review of

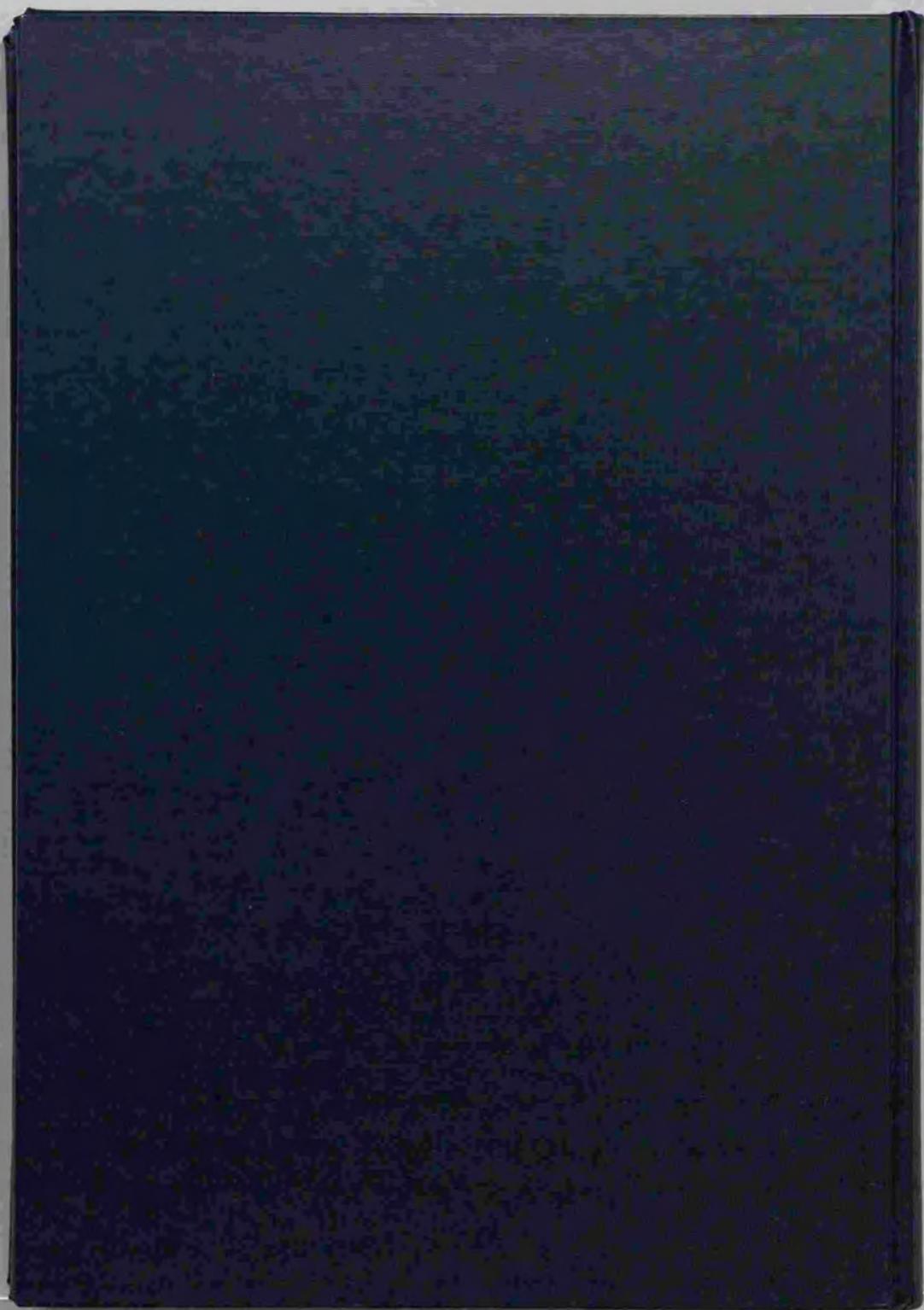
- molecular and cellular aspects. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 32; 225-237.
- Hahn E, Wick G, Pencev D and Timpl R. (1980). Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin, and fibronectin. *Gut* 21; 63-71.
- Hemingway JT and Cater DB. (1958). Effects of pituitary hormones and cortisone upon liver regeneration in the hypophysectomized rat. *Nature* 181; 1065-1066.
- Heyner NT, Braun L, Yaswen P, Brooks M and Fausto N. (1984). Isozyme profiles of oval cells, parenchymal cells, and biliary cells isolated by centrifugal elutriation from normal and preneoplastic livers. *Cancer Res* 44; 332-338.
- Hirota S, Ito A, Morii E, Wanaka A, Tohyama M, Kitamura Y and Nomura S. (1992). Localization of mRNA for c-kit receptor and its ligand in the brain of adult rats: an analysis using in situ hybridization histochemistry. *Mol Brain Res* 15; 47-54.
- Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER and Thorgeirsson SS. (1993). Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat. *Am J Pathol* 142; 1823-1830.
- Hurme T, Kalimo H, Sandberg M, Lehto M and Vuorio E. (1991). Localization of type I and III collagen and fibronectin production in injured gastrocnemius muscle. *Lab Invest* 64; 76-84.
- Jonker AM, Dijkhuis WJ, Kroese FGM, Hardonk MJ and Grond J. (1990). Immunopathology of acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology* 11; 622-627.
- Jonker AM, Dijkhuis FWJ, Boes A, Hardonk MJ and Grond J. (1992). Immunohistochemical study of extracellular matrix in acute galactosamine hepatitis in rats. *Hepatology* 15; 423-431.
- Kamimura S and Tsukamoto H. (1995). Cytokine gene expression by Kupfer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 21; 1304-1309.

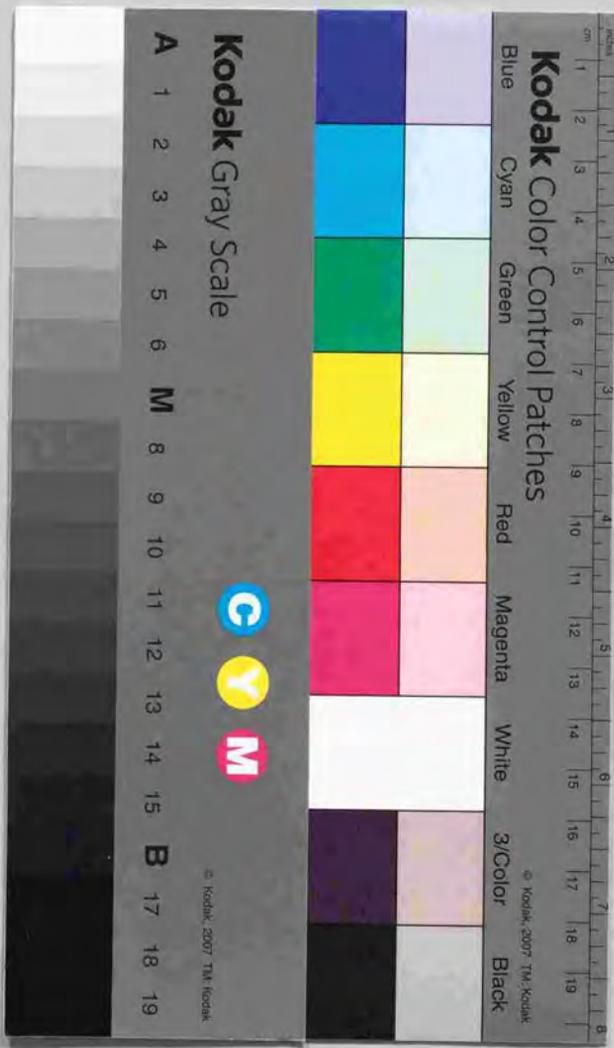
- Kato S, Otsu K, Ohtake K, Kimura Y, Yashiro T, Suzuki T and Akamatsu N. (1992).
Concurrent changes in sinusoidal expression of laminin and affinity of hepatocytes to
laminin during rat liver regeneration. *Exp Cell Res* 198; 59-68.
- Kuncio GS, Neilson EG and Haverty T. (1991). Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis.
Kidney Int 39; 550-556.
- Lawrence AS, Randy LJ, Marwan F, Hugh JT, Kyung SC and William CM. (1994).
Transforming growth factor- β 1 and mannose 6-phosphate / insulin-like growth
factor- II receptor expression during intrahepatic bile duct hyperplasia and biliary
fibrosis in the rat. *Hepatology* 19; 412-417.
- Lemire JM, Shiojiri N and Fausto N. (1991) Oval cell proliferation and the origin of small
hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 139; 535-552.
- Martinez-Hernandez A. (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron
immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 51; 57-74.
- Martinez-Hernandez A. (1985). The hepatic extracellular matrix. II. Electron
immunohistochemical studies in rats with CCl₄-induced cirrhosis. *Lab Invest* 53;
166-186.
- Martinez-Hernandez A and Amenta PS. (1993). The hepatic extracellular matrix. I.
Components and distribution in normal liver [editorial]. *Virchows Archiv A Pathol
Anat* 423; 1-11.
- Martinez-Hernandez A, Martinez DF and Amenta PS. (1991). The extracellular matrix in
hepatic regeneration: localization of collagen types I, III, IV, laminin and
fibronectin. *Lab Invest* 64; 157-166.
- Massague J. (1992). Receptors for the TGF- β family. *Cell* 69; 1067-1070.
- Matsumoto K, Kakidani H, Takahashi A, Nakagata N, Anzai M, Matsuzaki Y, Takahashi Y,
Miyata K, Utsumi K and Iritani A. (1993). Growth retardation in rats whose growth

- hormone gene expression was suppressed by antisense RNA transgene. *Mol Reprod Dev* 36; 53-58.
- Matsumoto K, Kakidani H, Anzai M, Kakagata N, Takahashi A, Takahashi Y and Miyata K. (1995). Evaluation of an antisense RNA transgene for inhibiting growth hormone gene expression in transgenic rats. *Dev Genet* 16; 273-277.
- Mirani S, Herbst H, Schuppan D, Hahn EG and Stein H. (1989). *In situ* hybridization for procollagen types I, III and IV mRNA in normal and fibrotic rat liver: evidence for predominant expression in nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 10; 84-92.
- Nakamura T, Tomita Y, Hirai R, Yamaoka K, Kaji K and Ichihara A. (1985). Inhibitory effect of transforming growth factor- β on DNA synthesis of adult rat hepatocytes in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 133; 1042-1050.
- Ogawa K, Suzuki J, Mukai H and Mori M. (1986). Sequential changes of extracellular matrix and proliferation of its cells with enhanced expression of desmin and actin in focal hepatic injury. *Am J Pathol* 125; 611-619.
- Rabes HM and Brandle H. (1969). Synthesis of RNA, protein, and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *Cancer Res* 29; 817-823.
- Rauterberg J, Voss B, Pott G and Gerlach U. (1981). Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. I. Structure, local distribution and metabolism of connective tissue components in the normal liver and changes in chronic liver diseases. *Klinische Wochenschrift* 59; 767-779.
- Reif S, Terranova VP, El-Bendary M, Lebenthal E and Petell JK. (1990). Modulation of extracellular matrix protein in rat liver during development. *Hepatology* 12; 519-525.
- Renato L, Margaret HL, Fabio T, Phyllis AS, Gianfranco A, Wei-Rong Z, Fiorenzo P, Romana L and Nicola T. (1992). Histogenesis of bile duct-like cells proliferating

- during ethionine hepatocarcinogenesis -evidence for a biliary epithelial nature of oval cells- Lab Invest 66; 390-402.
- Rojkind M. (1991). From regeneration to scar formation: the collagen way [editorial]. Lab Invest 64; 131-134.
- Ruoslahti E and Pierschbacher MD. (1986). Arg-Gly-Asp: A versatile cell recognition signal. Cells 44; 517-518.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD and Border WA. (1994). Cell-extracellular matrix interactions. In: The liver: Biology and Pathobiology (third edition). Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA and Shafritz DA (eds). Raven Press, Ltd. New York. pp899-906.
- Ruoslahti E and Yamaguchi Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cells 64; 867-869.
- Sell S. (1990). Is there a liver stem cell? Cancer Res 50; 3811-3815.
- Sigal SH, Brill S and Reid LM. (1992). The liver as a stem cell and lineage system. Am J Physiol 263; G139-G148.
- Sirica AE. (1995). Ductular hepatocytes. Histol Histopathol 10; 433-456.
- Schuppan D. (1990). Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. Semin Liver Dis 10; 1-10.
- Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF and Hynes RO. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. Cells 46; 271-282.
- Thorgeirsson SS. (1993). Hepatic stem cells. Am J Pathol 142; 1331-1333.
- Uetsuka K, Suzuki M, Nakayama H and Doi K. (1997). Liver regeneration after partial hepatectomy in Mini rat. J Toxicol Pathol 10; 175-178.
- Untermann TG and Phillips LS. (1986). Circulating somatomedin activity during hepatic

- regeneration. *Endocrinol* 119; 185-192.
- Urushihara H and Yamada KM. (1986). Evidence for involvement of more than one class of glycoprotein in cell interactions with fibronectin. *J Cell Physiol* 126; 323-332.
- Uthne K and Uthne T. (1972). Influence of liver resection and regeneration on somatomedin (sulphation factor). Activity in sera from normal and hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 71; 255-264.
- von der Mark K and Kuhl U. (1985). Laminin and its receptor. *Biochim Biophys Acta* 823; 147-160.
- Wilson JW and Leduc EH. (1958). Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 76; 441-449.
- Wysocki AB and Grinnell F. (1990). Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 63; 825-831.
- Yamaguchi Y, Mann DM and Ruoslahti E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. *Nature* 346; 281-284.
- Yasuda H, Imai E, Shiota A, Fujise N, Morinaga T and Higashio K. (1996). Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats. *Hepatology* 24; 636-642.





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

C **Y** **M**

© Kodak, 2007 TM Kodak