

肝臓星細胞研究の新展開

妹尾 春樹・今井 克幸・俣野 吉計・佐藤 充

秋田大学医学部解剖学第二講座

New Development in the Research of Hepatic Stellate Cells

Haruki Senoo, Katsuyuki Imai, Yoshikazu Matano, and Mitsuru Sato

Second Department of Anatomy, Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

Abstract: Hepatic stellate cells (interstitial cells, vitamin A-storing cells, lipocytes, fat-storing cells) exist in the perisinusoidal space (space of Disse) of the hepatic lobule, and store 80 % of vitamin A in the whole body as retinyl palmitate in lipid droplets in the cytoplasm. In physiological conditions, these cells play pivotal roles in the regulation of vitamin A homeostasis; they express specific receptors for retinol-binding protein (RBP), a carrier protein specific for retinol, on their cell surface, and take up the complex of retinol and RBP by receptor-mediated endocytosis. Whereas, in pathological conditions such as liver fibrosis, these cells lose retinoids, and synthesize a large amount of extracellular matrix (ECM) components including collagen, proteoglycan and adhesive glycoproteins. Morphology of these cells also changes from the star-shaped stellate cells to that of fibroblasts or myofibroblasts. Three-dimensional structure of ECM components reversibly regulates the morphology, proliferation, and functions of the hepatic stellate cells. These regulations are mediated by direct cellular adhesion to ECM, matrix adhesion signals, and modulation of cytoskeletons. "Extrahepatic stellate cells" that distribute in various organs except the liver also play pivotal roles in vitamin A homeostasis. L-Ascorbic acid 2-phosphate (a long-acting vitamin C derivative) can stimulate proliferation of the stellate cells and promote three-dimensional liver-like structure in the co-culture system of hepatic parenchymal cells and mesenchymal cells.

Key words: hepatic stellate cells, vitamin A, retinol-binding protein, extracellular matrix, L-ascorbic acid 2-phosphate.

1. 緒 言

肝臓は多数の小葉構造を単位として構築されている¹⁾(Fig. 1)。各小葉は、上皮細胞でありアルブミンや胆汁を合成・分泌する実質細胞のみでなく、類洞壁と深い関係を持つ非実質細胞とからなっている。これらの非実質細胞は内皮細胞と、クッパー細胞 (Kupffer cells)、ピット細胞および星細胞^{2,3)}(介在細胞、ビタミンA貯蔵細胞、リポサイト、脂肪摂取細胞ともよばれる)である⁴⁻⁶⁾(Fig. 2)。類洞は毛細血管の一種であるが、通常の毛細血管よりもサイズが大きく、形が不整である。この類洞の薄い内張りをしているのが内皮細胞である。クッパー細胞は貪食能を持ち、全身の単球-マクロファージ系に属する。この細胞は多数の細胞

突起を伸ばして、内皮細胞の上に位置している。ピット細胞はナチュラルキラー活性を持つ。星細胞は肝細胞索と類洞の間の空所、すなわち類洞周囲腔(Disse腔ともよばれる)に存在する間葉系の細胞で、生体の総ビタミンA量の約80%をレチニルエステルとして貯蔵している⁴⁻¹⁰⁾。

本総説では、この星細胞の研究の新しい展開を著者らの研究を中心に紹介したい。

2. 肝臓星細胞は周皮細胞系に属する

星細胞は類洞周囲腔にある。この場所は毛細血管の周囲腔に相当する。

ところで、全身の毛細血管およびその前後の血管

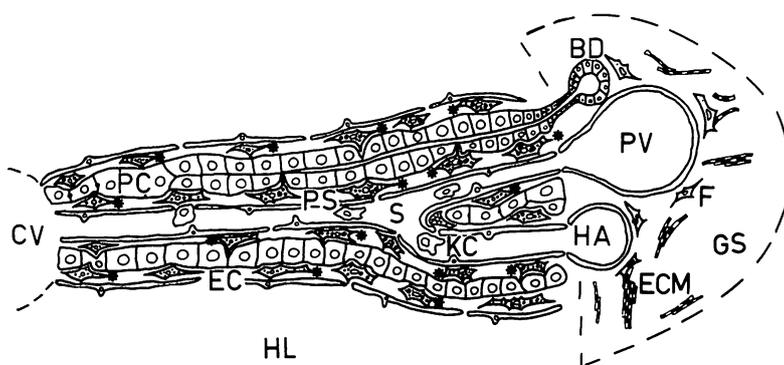


Fig. 1. Structure of Glisson's sheath and hepatic lobule. Hepatic lobule (HL) is a hexagonal column, and Glisson's sheaths (GS) exist at the 6 corners of the column. The interlobular vein (PV, a branch of the portal vein), interlobular artery (HA, a branch of the hepatic artery), and interlobular bile duct (BD, a branch of the bile duct) are located in the Glisson's sheath. Between these structures, connective tissue containing fibroblasts (F) and extracellular matrix components (ECM) distributed. The blood derived from the portal vein and the hepatic artery mixes within the sinusoid (S), a special capillary of the hepatic lobule, and flows into the central vein (CV). Main structure of the hepatic lobule is made by parenchymal cells (PC), hepatic stellate cells (*), and endothelial cells (EC). KC: Kupffer cells; PS: perisinusoidal space.

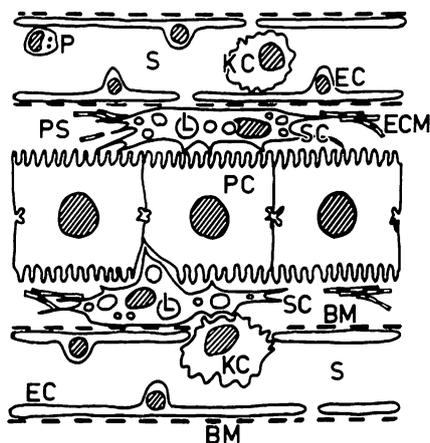


Fig. 2. Structure of hepatic lobule. Hepatic cords of the lobule consist of parenchymal cells (PC). Endothelial cells (EC) form the thin lining of the sinusoids (S). Kupffer cells (KC) are tissue macrophages and belong to the monocyte-macrophage cell lineage. Pit cells (p) have natural killer activity. Stellate cells (SC) lie in the perisinusoidal space (PS) of Disse and store 80% of retinoids of the whole body as retinyl palmitate in the lipid droplets (L) in the cytoplasm. BM, basement membrane components; ECM, extracellular matrix.

(precapillary および postcapillary venule) の外表面は周皮細胞 (pericytes)¹¹⁻¹³⁾ とよばれる細胞で被われている (Fig. 3-a, PC)。この細胞は血管の走行と平行に伸びる一次突起, それから直角に伸びる多数の二次突起, 二次突起からさらに多数の三次突起を伸ばして,

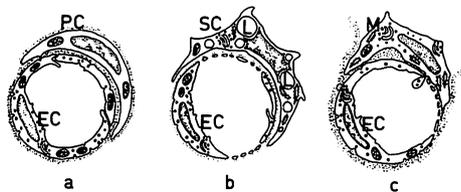


Fig. 3. Pericyte system. Pericytes (PC) cover the outer surface of endothelial cells (EC) of the capillary, precapillary, and postcapillary venules (a). Pericytes have various names according to the organs where they exist. They are called hepatic stellate cells (SC) in the liver (b) and are called mesangial cells (M) in the glomerulus of the kidney (c). These cells have common functions as pericytes and different functions according to their locations. L: lipid droplets containing retinyl palmitate.

内皮細胞の外壁を被っている。

この細胞は位置する臓器によって様々な名称でよばれることがある。すなわち、腎臓ではメサンギウム細胞 (Fig. 3-c, M) であり、中枢神経系では星状膠細胞、肺では肺胞中隔細胞、そして肝臓では星細胞 (Fig. 3-b, SC) である。すなわち、星細胞は周皮細胞系に属しているといえる。

周皮細胞系に属する細胞は、周皮細胞としての共通な機能と、各器官に特徴的な機能を持っている⁴⁾。

共通の機能には、内皮細胞の透過性および小血管血圧の制御、内皮細胞の増殖と分化の制御¹⁴⁾、収縮能を持ち小血管の径の調節、血液中の炎症細胞の内皮細胞を経由する組織への遊走の制御などがある。また、プロスタグランジン、トロンボキサン、エンドセリンなど種々の血管作動性物質や基底膜成分をはじめとする細胞外マトリックス (extracellular matrix, 以下 ECM) 成分の合成および分泌を行なう。

星細胞にも上述の周皮細胞に共通な機能と、肝臓の類洞周囲腔に存在するための特異的な機能がある。特異的な機能の第一に挙げられるのが生体におけるビタミン A の恒常性維持である。この細胞は血漿中からビタミン A (血漿中ではほとんどがレチノールとして、特異的キャリアタンパク質であるレチノール結合タンパク質と複合体を形成して存在している) を細胞内に取り込み、生体のビタミン A 総量の約 80% をレチニルパルミテートとして貯蔵し、必要に応じて血漿中に分泌することである^{4-10,15-18)}。

著者らはビタミン A の全身における代謝を調べる目的で、ラット門脈から ³H]レチノールを注射して、一定時間後に各器官を採取して放射活性を測定した¹⁹⁾。すると、大部分の活性は肝臓にあったが、全身の種々の器官にも低いながら活性があった (Table 1)。肝臓では星細胞がビタミン A を取り込み、貯蔵するが、他の器官でも周皮細胞系の細胞が取り込むのであろうか。星細胞のみがなぜビタミン A 取り込み・貯蔵能が大きいのであろうか。周皮細胞のビタミン A 取り込み・貯蔵機構はどうなっているのであろうか。全身のビタミン A の利用と関連した興味深い課題といえる。

周皮細胞の起源を考える上で興味ある報告が最近なされた²⁰⁾。血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor, 以下 PDGF) は A 鎖 (PDGF-A) と B 鎖 (PDGF-B) とからなるダイマーで、チロシンキナーゼ活性を持つ PDGF 受容体 α (PDGFR α) および PDGF 受容体 β (PDGFR β) と結合して機能を発揮す

表 1 *Distribution of [³H] Retinol in Various Rat Organs, Serum, and Feces after Intraportal Injection*

Organ	Radioactivity (dpm $\times 10^{-5}$ /g wet weight)	
	90 min	6 days
Liver	206.6 \pm 3.7	190.8 \pm 0.7
Spleen	13.8 \pm 0.4	28.9 \pm 0.1
Lung	28.4 \pm 0.6	4.5 \pm 0.1
Intestine	ND	1.9 \pm 0.1
Skin	0.6 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
Brain	ND	1.3 \pm 0.1
Kidney	6.0 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1
Heart	ND	0.9 \pm 0.1
Serum ¹⁾	5.8 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1
Feces	ND	0.4 \pm 0.1

Animals were sacrificed 90 min or 6 days after injection of 200 μ Ci of [³H] retinol through the portal vein.

Radioactivity was counted as described.¹⁹⁾ The values are the means of two assays \pm deviation.

ND: not determined. ¹⁾expressed as dpm/ml.

る。PDGF-B か PDGFR β を欠損するマウスでは、胎生後期まで発育はするが、心臓血管系および血液系、腎臓に異常が生じ、とくに腎臓糸球体のメサンギウム細胞が全く形成されない^{21,22)}。また PDGF-A を全く欠損するマウスは出生後 6 週間以内に皆死亡するが、解剖すると肺が異常に膨れ、肺気腫の状態であった²³⁾。肺胞も、肺胞間の中隔も無形成であった。正常では肺胞中隔内には筋線維芽細胞様の細胞 (上述の肺胞中隔細胞と同一かよく似た性質の細胞といえる) が存在する²⁴⁾。この細胞は形態は線維芽細胞に似ていて、しかも収縮能を備えている。PDGF-A を全く欠損するマウスではこの筋線維芽細胞様の細胞はまったく見られず、肺胞中隔にはエラスチン線維も全く見られなかった。この肺胞中隔内の細胞とメサンギウム細胞には上皮細胞との密接な関連など共通性が多く、ともに周皮細胞のファミリーといえる。そして PDGF-B を全く欠損するマウスでは一般の周皮細胞をも欠き、毛細血管には微小動脈瘤がみられた²⁵⁾。ところが、これら PDGF-A や PDGF-B を全く欠くマウスでは肝臓の星細胞には異常がみられなかった (Christer Betsholtz, 私信)。この事実は肝臓星細胞は同じく周皮細胞ファミリーに属しているながら、メサンギウム細胞や肺胞中隔細胞、あるいは一般の周皮細胞とは起源が異なる可能性を示しており、今後、星細胞の起源が一層探究されることと

思われる。

3. 生体におけるビタミン A の恒常性維持

ビタミン A (Fig. 4) は網膜で視物質として機能するのみでなく、細胞の増殖、分化、組織形成、あるいは癌細胞の増殖抑制、分化誘導など広範な生命現象において極めて強い活性を持つことが次第に明らかになってきた⁷⁾。これらの機能のほとんどは核内にある特異的受容体 (レチノイン酸受容体, およびレチノイド X 受容体) を介する種々の遺伝子の発現制御によって発揮される。ところが、多くの動物は自身ではビタミン

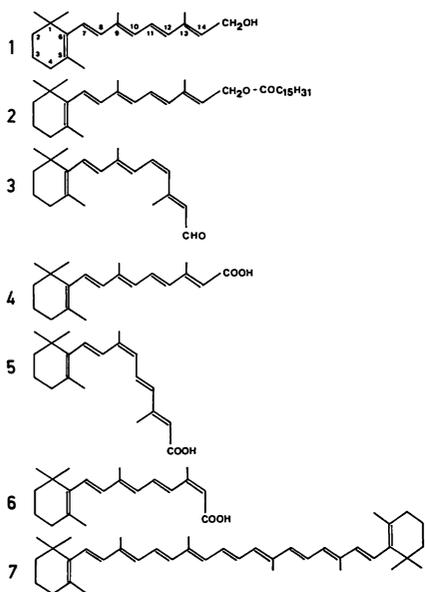


Fig. 4. Structural formulas of some naturally occurring vitamin A and β -carotene. Vitamin A circulates in the plasma as retinol (1) that binds to a specific carrier protein, retinol-binding protein. Vitamin A is stored as retinyl palmitate (2) in the hepatic stellate cells. 11-Cis-Retinal (3) exists in the retina with rhodopsin. All-*trans*-retinoic acid (4) binds to nuclear retinoic acid receptors ($RAR\alpha$, $RAR\beta$, $RAR\gamma$), and 9-*cis*-retinoic acid (5) binds to nuclear retinoid X receptors ($RXR\alpha$, $RXR\beta$, $RXR\gamma$). These nuclear receptors regulate transcription of various genes. 13-*Cis*-retinoic acid (6) can bind to RARs. β -Carotene (7) forms two retinals and finally two retinols.

A を生合成できない。このため食物として動物からはレチニルエステルとして、また植物からは β -カロテンとしてビタミン A を摂取している (Fig. 5)⁸⁾。 β -カロテンは小腸上皮細胞によって吸収され、この細胞のなかでレチノールとなる。他方、レチニルエステルは小腸腔内で加水分解され、やはりレチノールとなり、小腸上皮細胞によって吸収される。

レチノールは小腸上皮細胞内で長鎖脂肪酸とエステルをつくり、キロミクロン中に組み込まれる。キロミクロンはレチニルエステルを組み込んだままリンパ管を通過して大循環に入り、毛細血管内でトリアシルグリセロールを失って小型化し、キロミクロンレムナントになる。キロミクロンレムナント-レチニルエステル複合体は血流に乗って肝臓に達する。

肝臓に達したキロミクロンレムナント-レチニルエステルは肝実質細胞に取り込まれる。とりこまれたレチニルエステルは細胞膜か、エンドソームにあるレチニルエステルヒドロラーゼによって加水分解され、レチノールになる。このレチノールはリソソームには運ばれず、粗面小胞体に運ばれ、ここでレチノール結合タンパク質 (retinol-binding protein, 分子量 21,000, 生理的血漿中濃度 30-60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以下 RBP) と結合してレチノール-RBP 複合体となり、ゴルジ体を経由して細胞外に分泌される⁸⁻¹⁰⁾。

実質細胞から分泌されたレチノール-RBP 複合体はパラクリン輸送機構によって星細胞に移り、この細胞に貯蔵される。一部のレチノール-RBP 複合体は大循環に入る。

このようにして日によって摂取するビタミン A の総量には変動があるにもかかわらず、血漿中のビタミン A 量 (レチノールとして 2 μM) が常に一定に保たれるのは、消化管でのビタミン A の吸収、肝臓での取り込み・貯蔵・分泌が巧妙に制御されているからである。

肝実質細胞から分泌されたレチノール-RBP 複合体および血漿中にあるレチノール-RBP 複合体を、どのような分子機構で星細胞は細胞内に取り込むのであろうか。このメカニズムを明らかにするために、細胞の微細形態とタンパク質分子の抗原性をともによく保存する凍結免疫電子顕微鏡法によって解析した²⁶⁻²⁹⁾。この実験では、内因性ラット RBP には反応せずに、ヒト RBP に特異的に反応するヒツジ抗体を一次抗体として使用した。低温 (-100°C) で凍結超薄切片を作製し、室温に戻して一次抗体と反応させ、次いでヒツジ

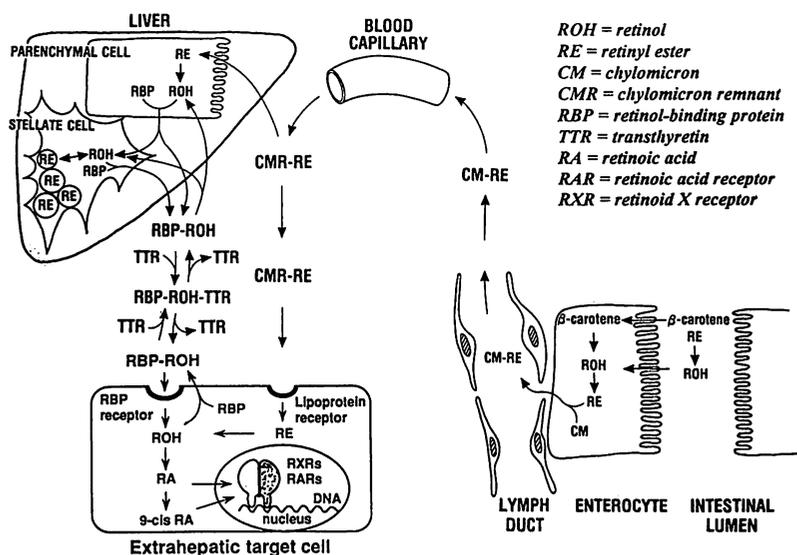


Fig. 5. Major pathway for vitamin A transport in the body. Dietary retinyl esters (RE) are hydrolyzed to retinol (ROH) in the intestinal lumen before absorption by enterocytes, and carotenoids are absorbed and then partially converted to retinol in the enterocytes. In the enterocytes, retinol reacts with fatty acid to form esters before incorporation into chylomicrons (CM). Chylomicrons then reach the general circulation by way of the intestinal lymph, and chylomicron remnants (CMR) are formed in blood capillaries. Chylomicron remnants, which contain almost all the absorbed retinol, are mainly cleared by the liver parenchymal cells and to some extent also by cells in other organs. In liver parenchymal cells, retinyl esters are rapidly hydrolyzed to retinol, which then binds to retinol-binding protein (RBP). A complex of retinol-RBP is secreted and transported to hepatic stellate cells. Stellate cells store vitamin A mainly as retinyl palmitate and secrete retinol-RBP directly into the blood. Most retinol-RBP in the bloodstream is reversibly complexed with transthyretin (TTR). The uncomplexed retinol-RBP is presumably taken up in a variety of cells by cell surface receptors specific for RBP.

IgG と特異的に反応するウサギ抗体と反応させた。さらに超薄切片はプロテインA-コロイド金と反応させた。こうして抗原の存在が透過型電子顕微鏡下でコロイド金の粒子として検出できる。

細胞単離法³⁰⁾によってラットから星細胞を単離し、この細胞とヒト肝癌から分離樹立された HepG2 細胞を直径 3 μm の小孔を持つポリカーボネート膜で隔てて、細胞同士の直接接触の無い状態で 18 時間共培養した^{26,27)}。HepG2 細胞は RBP を合成し、細胞外に分泌する (506-889ngRBP/6h/mg cell protein)。この培養液中に分泌されたレチノール-ヒト RBP 複合体をラット星細胞がどのようなメカニズムで細胞内に取り込むか上記の免疫電顕法によって解析した。なお、 $[^{125}\text{I}]$ -チラミンセロピオースで標識されたヒト RBP とラット

RBP は同様にラット肝実質細胞と星細胞に取り込まれることは生化学的には証明されている⁸⁻¹⁰⁾。

ヒト RBP の局在を示す金粒子は星細胞の表面 (Fig. 6-A)、細胞表面のピット (Fig. 6-B, C)、細胞質内の小胞 (Fig. 6-D~F) に観察された。ピットの直径は 100-200 nm であり、小胞のそれは 450-500 nm であった。金粒子は小胞の膜上、および小胞内に認められた。さらにこの RBP の取り込みは、共培養の培養液中に抗ヒト RBP 抗体を添加すると抑制された。また星細胞の代わりに皮膚真皮の線維芽細胞を用いると、線維芽細胞は RBP を取り込まなかった。すなわち、RBP の取り込みには細胞による特異性があることが明らかになった。

つぎに星細胞がどのような段階を経て RBP を取り

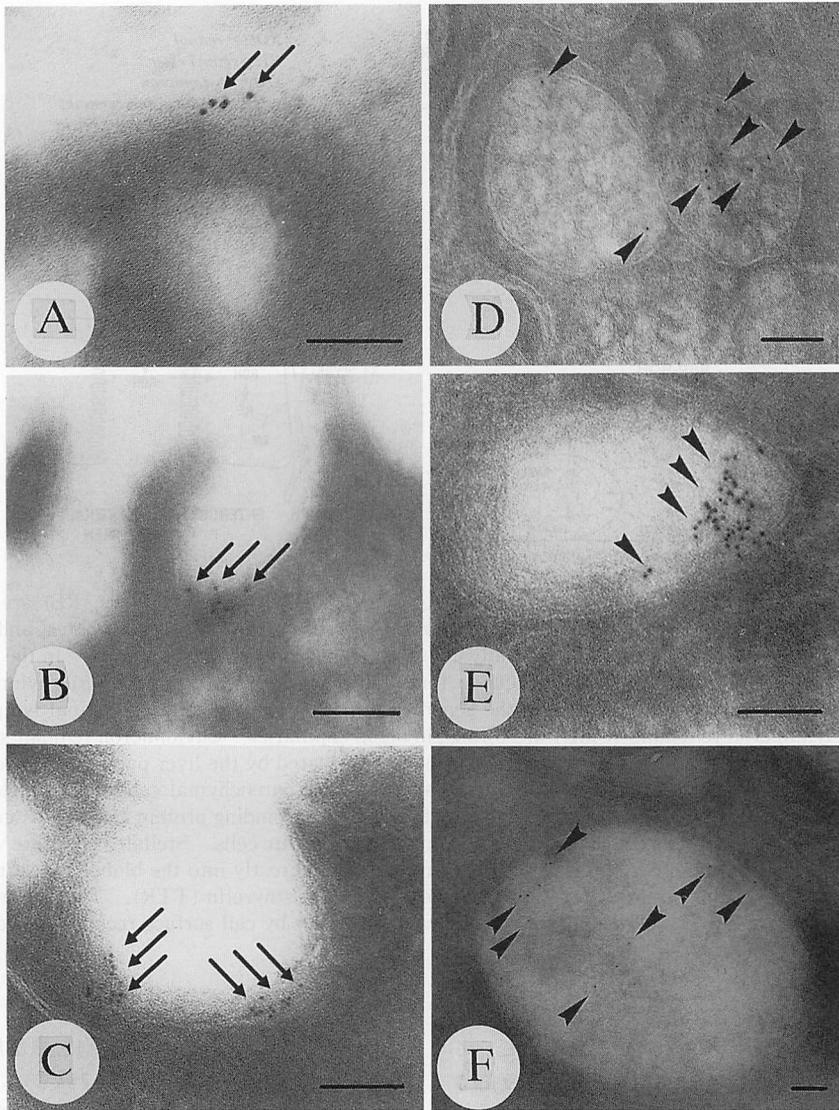


Fig. 6. Immunoelectron micrographs of stellate cells co-cultured with HepG2 cells. Stellate cells were co-cultured with human hepatoma HepG2 cells, which synthesize and secrete RBP, for 18 h. Indirect immunolabeling was performed as described²⁶⁻²⁹. Arrows and arrowheads indicate, respectively, gold particles which show localization of human RBP, distributed on the cell surface and in the cytoplasm in rat stellate cells. Various stages (A-F) of internalization of RBP were demonstrated. (Bars=100 nm).

込むのか解析するため、以下の実験を行なった^{26,27} (Fig. 7)。培養ラット星細胞をレチノールヒト RBP 複合体 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と 4°C で 2 時間インキュベートし、細胞をリン酸緩衝溶液 (phosphate-buffered saline, PBS) で洗って、37°C に 1, 2, 6, 10, 120 分間静置し、

上述の免疫電顕法によって経時的に追跡した。直後および 1 分後には金粒子は細胞表面 (Fig. 7-A, B) に、2 分後には細胞表面に極めて近くにある小胞 (Fig. 7-C) にもみられた。6 分後 (Fig. 7-D) および 10 分後 (Fig. 7-E) には細胞膜近くにある直径 200-400 nm の小胞に

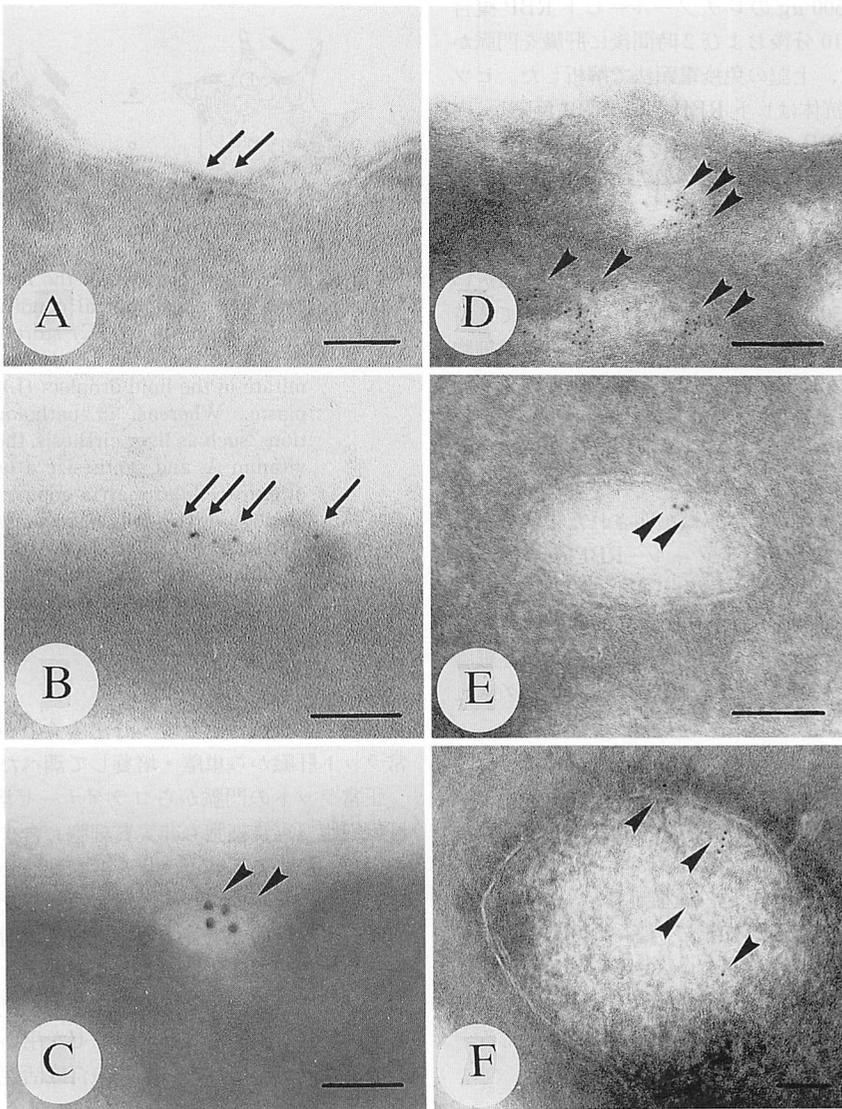


Fig. 7. Immunoelectron micrographs of cultured stellate cells showing subsequent stages in the endocytosis of human RBP. Stellate cells were incubated with human RBP (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 h at 4°C, washed (A) and then incubated at 37°C for 1 min (B), 2 min (C), 6 min (D), 10 min (E), and 120 min (F). Arrows and arrowheads indicate, respectively, gold particles distributed on the cell surface and in the cytoplasmic vesicles. (Bars=100 nm).

みられた。120分後には直径500-600nmで、細胞質のより深い場所にある小胞に金粒子が局在していた (Fig. 7-F)。

以上の結果は、星細胞表面にはRBPに対する特異的受容体が発現していて、肝実質細胞から分泌されたレチノール-RBP複合体をその受容体を介したエン

ドサイトーシスによって取り込んでいることを示している。

つぎに血漿中にあるレチノール-RBP複合体を星細胞が取り込む機構を、やはり免疫電顕法で調べた^{28,29)}。

体重270-350gのラットに、血中濃度が生理的範囲

になるように 500 μg のレチノール-ヒト RBP 複合体を静注して、10 分後および 2 時間後に肝臓を門脈から灌流固定して、上記の免疫電顕法で解析した。ヒツジ抗ヒト RBP 抗体はヒト RBP と特異的に反応し、内因性のラット RBP とは反応しない。この抗体を用いることによって、外から注射されたヒト RBP のみを金粒子の局在として追跡できる。

ヒト RBP をラットに静注して 10 分後には、金粒子は星細胞および実質細胞の細胞表面と細胞表面に近い小胞(直径 60-150 nm)に局在していた。静注して 2 時間後にも星細胞と実質細胞には金粒子がみられ、細胞表面と細胞表面に近い小胞に加えて、細胞質のより深くに位置するエンドソームにも局在していた。しかし 2 時間後でも内皮細胞とクッパー細胞には金粒子は存在しなかった。また生化学的にもレチノール-RBP 複合体の肝臓細胞への取り込みは証明された³¹⁾。

逆に星細胞から直接レチノール-RBP 複合体が分泌されることも報告されている³²⁾。

以上のように、星細胞は RBP に特異的な受容体を介したエンドサイトーシスによって、レチノールを細胞内に取り込む。最近この受容体はクローニングされた³³⁻³⁶⁾。

しかし、ビタミン A を細胞に取り込む機構は一種類ではなく、たとえばポトサイトーシス (potocytosis)³⁷⁾ などをはじめとして複数の機構があり³¹⁾、細胞によって用いる機構が異なるのであろう。また一つの細胞にも複数のビタミン A 取り込み機構が備わっていて、血中のビタミン A 濃度を感知して、種々のメカニズムを使い分けているのかもしれない。さらに RBP に特異的な受容体にも複数の分子種が存在する可能性もある。これらは今後に残された興味ある課題といえる。

4. 細胞外マトリックスの合成と分泌

星細胞は生理的条件下では、生体のビタミン A 総量の 80% を細胞質内の脂質滴の中にレチニルパルミテートとして貯蔵している。しかし、肝硬変等の病理的条件下では、貯蔵しているビタミン A を失い、盛んに分裂し、細胞の形態が星型から線維芽細胞様あるいは筋線維芽細胞 (myofibroblast)³⁸⁾ 様にかわる (Fig. 8)^{4-6,39)}。この時には細胞の周囲には多量のコラーゲン線維が観察される。

それでは、実際に星細胞はコラーゲンを合成・分泌するのか、するとすればどのような分子種のコラーゲン

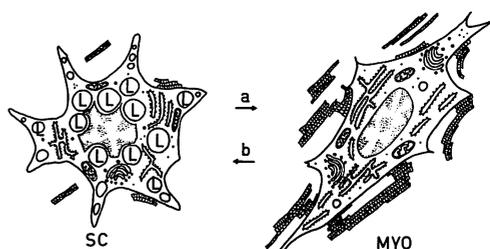


Fig. 8. Phenotypic changes of the hepatic stellate cells. In physiological conditions, the hepatic stellate cells (SC) store 80% of vitamin A in the whole body as retinyl palmitate in the lipid droplets (L) in the cytoplasm. Whereas, in pathological conditions, such as liver cirrhosis, these cells lose vitamin A, and synthesize a large amount of extracellular matrix components. Morphology of the cells also changes from the star-shaped stellate cells to that of the fibroblasts or myofibroblasts (MYO) (passage of a). Inductive conditions to passage b imply the reversibility of hepatic fibrosis.

をどのような割合で合成・分泌するのか、星細胞を正常ラット肝臓から単離・培養して調べた^{19,40)}。

正常ラットの門脈からコラーゲナーゼ溶液を灌流し、肝臓細胞(実質細胞も非実質細胞も含まれる)懸濁液を得て、低速遠心、Percoll 密度勾配遠心法で星細胞画分を得た。10% ウシ胎仔血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地で培養すると、細胞は増殖し、トリプシンで処理して継代培養することができた。初代培養および継代培養の段階で細胞を [³H] プロリンで標識し、精製した細菌性コラーゲナーゼを用いたコラーゲン合成活性測定法でコラーゲンの合成活性を調べた。コラーゲンの型は SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法およびフルオログラフィーによって解析した。この結果、初代培養 2 日目ではコラーゲン合成活性は低く、わずかな IV 型コラーゲン(基底膜に存在するコラーゲン)を合成していることが明らかになった。ところが初代培養 8 日目および継代培養すると、細胞が合成する全タンパク質の 10% がコラーゲンであり (Table 2, cell fraction S2)。因に S3 はクッパー細胞と内皮細胞を含む)、しかも I 型 (88.2%)、III 型 (10.4%) およびわずかな IV 型 (1.4%) を合成していた (Fig. 9)。各括弧内の数字はフルオログラムをデンストメーターにかけて定量した値である。すなわち、星

表2 *Biosynthesis of Collagen by Rat Liver Non-parenchymal Cells in Culture*

Cell fraction	Days in	Collagen (dpm × 10 ⁻⁴ /dish)	Non-collagenous proteins (dpm × 10 ⁻⁴ /dish)	Rate of collagen synthesis* (%)
Primary culture				
S2	2	—**	27.2 ± 0.7	0
S3	2	—**	25.3 ± 0.1	0
S2	8	3.97 ± 0.1	13.8 ± 0.3	5.1 ± 0.2
S3	8	—**	1.2 ± 0.1	0
Secondary culture				
S2	10	7.75 ± 0.4	14.5 ± 0.4	9.0 ± 0.7
S2	12	8.03 ± 0.1	12.4 ± 0.2	10.7 ± 0.3

The cells were cultured in medium containing [³H] proline for 18 h and synthesis of proteins was determined with protease-free bacterial collagenase.

The values are the means of duplicate determinations ± deviations.

* Calculated assuming that collagen contains imino acid 5.4 times higher than in other proteins.

** Not detected

細胞は実際の肝硬変の時に肝臓に増加しているのと同じ型のコラーゲンを合成・分泌していた。

コラーゲン等の ECM の合成・分泌の制御メカニズムが解明され、それらを調節できるようになれば、肝線維化の予防・治療に道が開かれるものと思われる。また LEC ラットは肝炎、肝癌を自然発症するが、肝炎の時期を生き延びた群では胆管線維症は発症してもびまん性の肝硬変はみられない。肝癌を発症する時期まで長期に亘って星細胞を観察したが、どの時期でも星細胞は細胞質に多量のビタミン A 脂質滴を貯蔵しており、細胞周囲にはコラーゲン等の ECM の蓄積もみられなかった⁴¹⁾。この LEC ラットは肝線維化誘導における星細胞の役割を考えるうえでもユニークなモデルといえる。

5. 細胞外マトリックスの三次元構造による星細胞の形態、増殖、機能の可逆的制御

組織は細胞のみで構成されているのではない。そのかなりの部分を占める細胞間空間は、コラーゲンやプロテオグリカン、粘着性糖タンパク質（フィブロネクチンやラミニン等）などの ECM 分子の複雑なネットワークによって充たされている⁴²⁾。従来 ECM は静的な分子で、組織を物理的に支える足場と信じられて来た。しかし、近年、細胞の形態、増殖、機能、移動、組織形成さらに発癌や癌の転移などを制御する極めて動

的な分子であることが次第に明らかになってきた⁴³⁻⁴⁷⁾。

そこで、ECM による星細胞機能の制御を明らかにする目的で、星細胞を単離して、無血清培地 (ASF104, Ajinomoto)⁴⁸⁾、あるいは 10% のウシ胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地で培養した⁴⁹⁾。この際に、ポリスチレン培養皿上に直接か、あるいは I 型コラーゲンで被覆した培養皿上に細胞を播種した。するといずれの条件でも細胞はよく伸展した。ところが星細胞はポリスチレン上でよりも I 型コラーゲンで被覆した培養皿上で、はるかによく増殖し、コラーゲン合成活性も高かった。さらに詳細に調べるために、星細胞を基底膜成分ゲル (Matrigel)⁵⁰⁾ の上に播種すると、細胞は互いに集まって網細工様形態をなし、ほとんど増殖せず、コラーゲン合成活性も極めて低かった。

実際に星細胞が存在する類洞周囲腔（いわゆる Disse 腔）には、I および III, IV, V, VI 型コラーゲンやラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカンが 3 次元的に分布している^{4-6,51,52)}。また、これらの ECM を分解する酵素⁵³⁾ と、その活性を制御する分子⁵⁴⁾ もここに分泌される。すなわち、星細胞は動的な、変化しうる ECM の 3 次元構造に囲まれて、自身も 3 次元的に存在しているといえる。そこで、ECM の 3 次元構造が星細胞の形態・増殖・機能を制御するか否か調べた^{52,55)}。

星細胞を単離して、ポリスチレン培養皿上に直接か、

(40)

肝臓星細胞研究の新展開

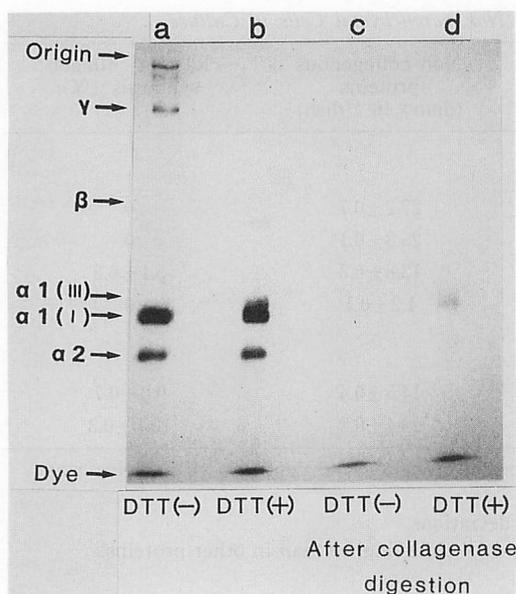


Fig. 9. Fluorescence autoradiograms of [^3H] proline-labeled proteins. Stellate cells in the fraction S2 at confluency in the secondary passage were cultured in a medium containing [^3H]proline for 18 h. Collagenous proteins were partially purified from the cell layer and medium with pepsin digestion after precipitation with ammonium sulfate. SDS-Polyacrylamide slab gel electrophoresis was performed before (a, b) or after (c, d) the treatment with purified bacterial collagenase, and processed for fluorescence autoradiography. b and d: electrophoresed after reduction with dithiothreitol. Arrows indicate the migration positions of carrier rat collagen chains.

I型コラーゲンで被覆した培養皿上にか、I型コラーゲンのゲル上か、あるいはゲル内に播種した。すると、細胞はポリスチレン培養皿上あるいはI型コラーゲンで被覆した培養皿上ではよく伸展した。ところが、I型コラーゲンのゲル上では互いに凝集して、網細工様形態をとり、ゲル中では細長い突起を多数伸ばして星型になり、*in vivo*における形態によく似ていた (experimental series I, Fig. 10)。

すなわち ECM の3次元構造によって細胞の形態が制御された。そこで更に、その制御に可逆性があるか否か調べた。いったんポリスチレン培養皿上、あるいはI型コラーゲンで被覆した培養皿上、I型コラーゲン

のゲル上、ゲル内で3日間培養した星細胞を、酵素で処理して各々の基質から遊離させて細胞懸濁液を得て、再びこの4条件に播種した。すると、細胞は各々新しい基質に応じて形態を変化させた (experimental series II, Fig. 11)。こうして、ECMの3次元構造によって細胞の形態は可逆的に制御されることが明らかになった。

星細胞の増殖 (Fig. 12) とコラーゲン合成活性 (Fig. 13) についても同様のことが判明した。 [^3H]チミジンの取り込みで解析した DNA の合成活性は、初めの基質の影響は残っているものの、新しい基質に応じて変化した。すなわち、ポリスチレン培養皿上、あるいはI型コラーゲンで被覆した培養皿上では、I型コラーゲンのゲル上、あるいはゲル中でよりも高値を示した。コラーゲンの合成活性も、初めの基質の影響は残ってはいても、新しい基質に応じて変化した。すなわち、ポリスチレン培養皿上、あるいはI型コラーゲンで被覆した培養皿上では、I型コラーゲンのゲル上、あるいはゲル中でよりも高値を示した。

星細胞によって合成されたコラーゲンの型も、新しい基質の3次元構造によって可逆的に制御された (Fig. 14)。コラーゲンの型は SDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動法とフルオログラフィーによって、非還元条件下 (Fig. 14A, C)、および還元条件下 (Fig. 14B, D) で解析された。ポリスチレン培養皿上 (Fig. 14A)、あるいはI型コラーゲンで被覆した培養皿上 (Fig. 14B) では、I型コラーゲンが主として合成された。少量合成されたコラーゲンには III型 (非還元条件下では γ 領域の下にあり、還元条件下では $\alpha 1$ 領域の位置に移る)、IV型 (非還元条件下ではゲルトップすなわち泳動開始位置のすぐ下に位置し、還元条件下では β 領域よりやや下に移動する) が含まれていた。これらのバンドはすべて精製した細菌性コラーゲナーゼで消化された。デンストメトリーで定量すると、I型コラーゲンは 58.8~71.9%、III型コラーゲンは 21.2~23.3%、IV型コラーゲンは 0~5.8%、V型コラーゲンは 5.7~14.3% であった。一方、I型コラーゲンのゲル上 (Fig. 14C)、あるいはゲル内 (Fig. 14D) でも、合成される主なコラーゲンはI型で、少量成分はIII型とV型コラーゲンであった。これらのバンドを定量すると、I型は 64.7~82.8%、III型は 17.6~24.7%、V型は 14.2~27.8% であった。このように各基質の上あるいは中で、星細胞が合成する主要なコラーゲンはI型であり、IV型コラーゲンはI型コラーゲンのゲル上、あ

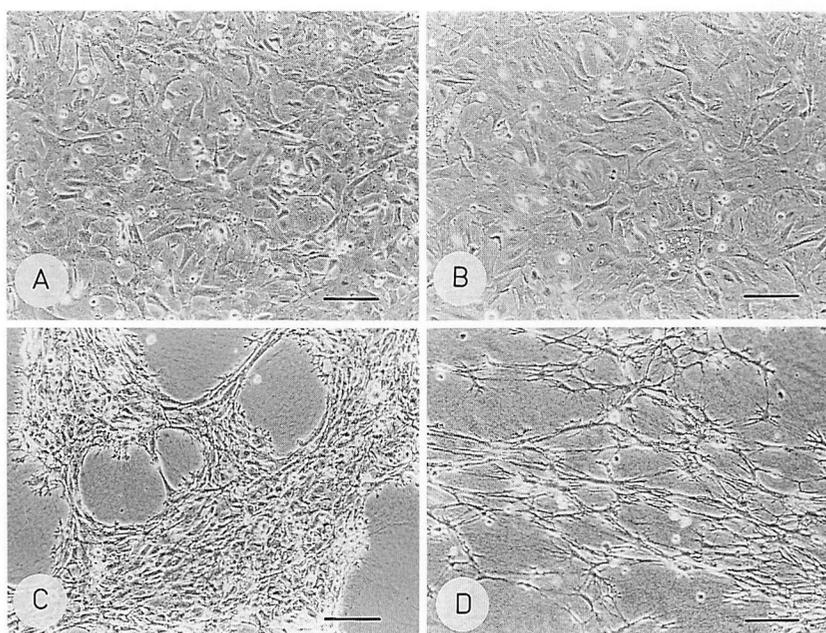


Fig. 10. Phase-contrast micrographs of cultured stellate cells in experimental series I. Photographs of the stellate cells were taken as described⁵²⁾. The stellate cells were inoculated onto or into each substratum as described⁵²⁾. After 3 days, the cells spread and extended cellular processes in polystyrene culture dishes (A) and type I collagen-coated dishes (B). On type I collagen gels, these cells gathered and formed a mesh-like structure (C). On the other hand, in type I collagen gels, these cells extended their fine cellular processes and resembled well the morphology of the star-shaped stellate cells *in vivo* (D). (Bars=40 μ m).

るいはゲル内の星細胞によっては合成されなかった。これらのデータは、星細胞によって合成されるコラーゲンの型も ECM の 3 次元構造によって可逆的に制御されることを示している。

以上のように、ECM の 3 次元構造は星細胞の形態および増殖、機能を可逆的に制御している。こうして生体内においても ECM の 3 次元構造によって、星細胞が制御されることが示されたといえる^{56,57)}。

6. 新しい展開

a. 細胞突起のダイナミックな動きの解明— 静的細胞から動的細胞へ —

星細胞は多数の長い突起を伸ばして、類洞内皮細胞を外側から被っている。従来はこの突起は静的であり、類洞の構造を物理的に支持すると信じられてきた。

種々の ECM を 2 次元的あるいは 3 次元的に基質として用いて星細胞を培養すると、I 型あるいは III 型コ

ラーゲンゲルの上では細胞は *in vivo* と同様に長い細胞突起を伸展させることが明らかになった^{52,55)}。しかもその伸展は間質型コラーゲンの線維に沿っていることが、ビデオ記録による経時的観察によって明らかになった⁵⁸⁾(Fig. 15)。突起の中心部には細胞骨格であるチューブリンが存在し、細胞膜の近くには F-アクチンが分布して、突起を伸展させることも明らかになった^{59,60)}。さらにこれらの細胞骨格を脱重合させると、いったん伸びたこれら突起は退縮してしまう。すなわち、星細胞の形態の特徴である多数の長い細胞突起は決して静的な構造ではなくて、極めて動的でありうることが示された。間質型コラーゲンゲルの上に星細胞を播種する際に、培養液に抗インテグリン $\alpha 2$ あるいは $\beta 1$ 抗体を添加しても、あるいはコラーゲン分子中のインテグリンに認識されるペプチド配列であるオリゴペプチド DGEA を添加しても突起は伸び出さなかった。さらにチロシンリン酸化、あるいはフォスファチジルイノシトールキナーゼを阻害しても突起伸展は抑制され

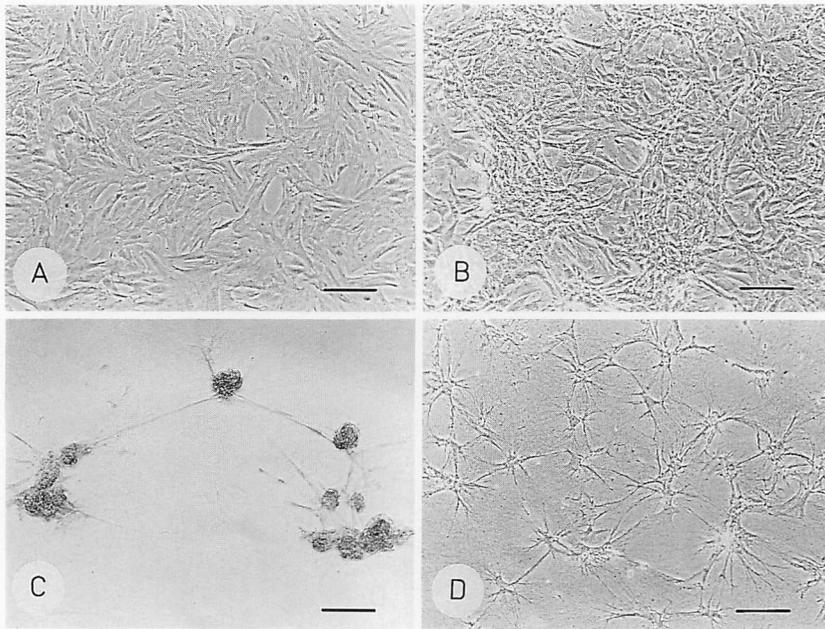


Fig. 11. Phase-contrast micrographs of cultured stellate cells in experimental series II. Photographs of the stellate cells were taken as described⁵²⁾. The stellate cells were inoculated onto or into each substratum as described⁵²⁾. After 3 days, the morphology of the stellate cells in poly-styrene culture dishes (A), in type I collagen-coated dishes (B), or on (C) or in (D) type I collagen gels was essentially the same as that in Fig. 10. (Bars=40 μ m).

る⁶¹⁾。このことから、星細胞の突起伸展は細胞がインテグリンによってコラーゲンを認識し、チロシンリン酸化、イノシトールリン脂質を介するシグナル伝達が生じ、そのシグナルがアクチンやチューブリンの細胞骨格系に伝達されて生じることが示されたといえる。

それでは、3次元的に間質型コラーゲン線維と星細胞はどのような形態で接着するのであろうか。I型コラーゲンゲルの上あるいは内に星細胞を播種して、その接着形態を走査型および透過型電子顕微鏡で解析すると、細胞とコラーゲン線維は3次元的に複雑に絡み合い、実際に点ではなく面を形成して直接接着していた^{62,63)}。生体内ではこのような像を得ることは極めて困難であるが、細胞培養に移して系を単純化したために、細胞とECMの直接接着の形態を示すことができた。生体内でも同様の接着形態は存在するものと考えられる。さらに免疫電子顕微鏡で解析すると、細胞とコラーゲン線維の接着部位にはインテグリン $\alpha 2$ および $\beta 1$ が発現していた。生体の中では細胞もECMも3次元的に存在しており、*in vivo*における細胞の機能を探究する為には、どうしても3次元細胞培養法における解

析が今後ますます必要となることと思われる。

b. 肝臓外星細胞

生体のビタミンAの80%は肝臓にある星細胞が貯蔵している。それでは、生体におけるビタミンAのホメオスタシスを維持しているのは肝臓星細胞だけなのであろうか。肝臓に貯蔵されている以外のビタミンAはどこに存在するのであろうか。最近、肝臓外星細胞とよべる細胞系の存在が明らかになってきた⁶⁴⁾。

蛍光顕微鏡、透過型電子顕微鏡、電顕オートラジオグラフィーを用いた研究によって、肝臓以外の器官にあってビタミンAを取り込み、貯蔵する細胞があることが以前から知られていた⁶⁴⁾。これらの研究は動物にビタミンAを投与することによって細胞がビタミンA自家蛍光を持つようになったり、蛍光が増強すること、あるいは逆にビタミンA欠乏にすると蛍光が消失したり減弱すること、 $[^3\text{H}]$ レチニルアセテートを投与して、オートラジオグラフィーで陽性となることを判断基準としてなされてきた。それらの結果は、肝臓以外にも肺、腸管、脾臓、副腎、精巣および子宮、リン

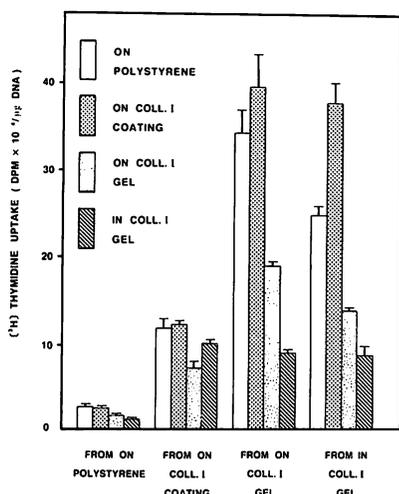


Fig. 12. Reversible regulation of the growth of the stellate cells by ECM. $[^3\text{H}]$ Thymidine uptake of the stellate cells inoculated onto or into each substratum in experimental series I and II were determined as described⁵²⁾. The stellate cells were plated into polystyrene culture dishes (□), type I collagen-coated dishes (▨), or onto (▧) or into (▩) type I collagen gels after detachment from each previous substratum.

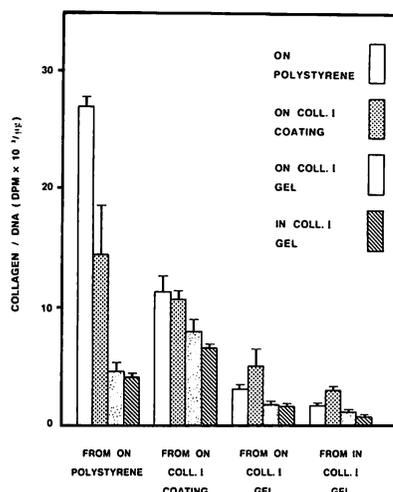


Fig. 13. Collagen synthesis per μg DNA of the stellate cells in experimental series I and II. Synthesis of collagen and non-collagenous proteins of the stellate cells inoculated onto or into each substratum was determined as described⁵²⁾. The stellate cells were plated into polystyrene culture dishes (□), type I collagen-coated dishes (▨), or onto (▧) or into (▩) type I collagen gels after detachment from each previous substratum.

パ節、胸腺、骨髄、大動脈の外膜、気管の粘膜固有層、口腔粘膜、扁桃に線維芽細胞に似た間葉系細胞が存在し、それらはビタミンA自家蛍光を発生し、細胞質に脂質滴を持つことを示している^{3,64)}。しかし、それらの細胞が生理的条件下で果たす機能の詳細は不明であった。

そこで、ラットに普通食あるいはそれに加えてビタミンAを与えて、塩化金法、蛍光顕微鏡および電顕的モルフォメトリー（形態計測）を駆使して各器官を解析し、肝臓および肺胞中隔と小腸粘膜固有層にあるビタミンA貯蔵細胞の脂質滴を詳細に調べた⁶⁵⁾。普通食では脂質滴が各細胞で占める容積は肝臓では0.2%、肺で0.3%、小腸で0.04%であり、ビタミンA投与（18日間の実験期間でレチノールとして総量135mg）によってその容積が各々10倍、2倍、40倍に増した。高速液体クロマトグラフィーで定量した各器官の総レチノール量は肝臓で15倍、肺で50倍、小腸で340倍にも増加した。これらのデータはビタミンAの過剰摂取時のみならず、正常のビタミンA摂取時にも肝臓以外

のビタミンA貯蔵細胞も重要な生理的役割を果たしていることを示している。

さらに、小腸粘膜固有層のビタミンA貯蔵細胞はビタミンAの吸収においても重要な役割を果たすことが推測されている⁶⁶⁾。

このように全身に星細胞系（ビタミンA貯蔵細胞系）とよべるシステムが存在することが明らかになりつつある。これらの細胞系は周皮細胞系とどのような関係にあるのか、またこれらの細胞系はビタミンAのホメオスタシスの維持に肝臓星細胞とどのように役割分担しているのか、今後に残された興味深い課題といえる。

c. 新しい肝臓生化学

肝臓は生体の化学工場といわれ、極めて多彩なしかも生命にとって欠かせない生化学的反応の場である。それらは肝臓生化学ともよばれる大きな成果をうみだしてきた。しかし、それらの成果の多くは肝臓を均一な臓器として捉え、まるごとホモジナイズすることに

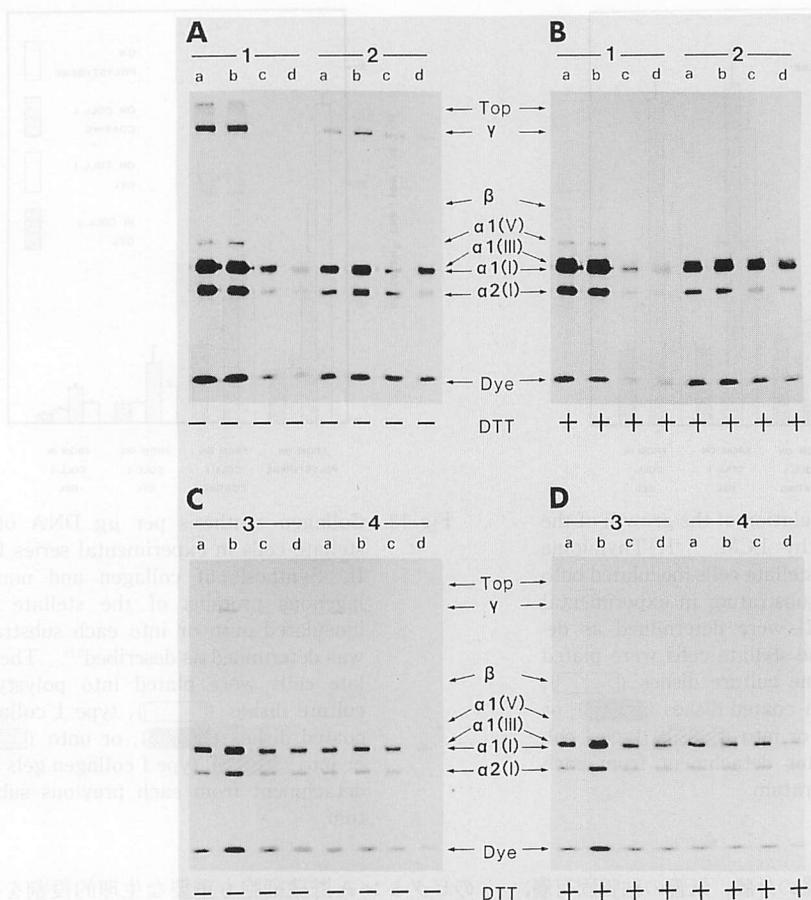
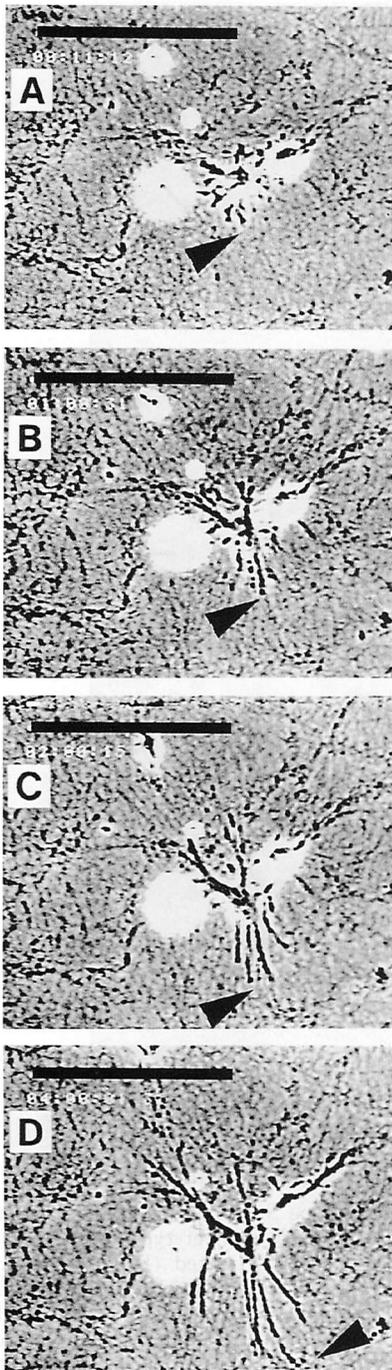


Fig. 14. Fluorescence autoradiograms of [^3H] proline-labeled proteins. The stellate cells in experimental series I and II were cultured in a medium containing [^3H]proline for 18 h. Collagenous proteins were partially purified from the combined cell layer and medium by pepsin digestion after precipitation with ammonium sulfate. SDS-Polyacrylamide slab gel electrophoresis was performed with (B, D) or without (A, C) reduction by dithiothreitol (DTT), and processed for fluorescence autoradiography. Arrows indicate the migration positions of carrier rat collagen chains. In experimental series I (1), the cells cultured in polystyrene culture dishes were seeded into polystyrene culture dishes (a), into type I collagen-coated dishes (b), or onto (c) or into (d) type I collagen gels. In experimental series II (2-4), the cells were cultured for 3 days in type I collagen-coated dishes (2), or on (3) or in (4) type I collagen gels, and then re-seeded into polystyrene culture dishes (a), into type I collagen-coated dishes (b), or onto (c) or into (d) type I collagen gels.

よって得られてきている。しかし、以上で見てきたように、肝臓は実質細胞のみでなく、非実質細胞も重要な成員として構成され、それらの各細胞が相互に有機的に関連しあって、器官としての恒常性を保っていることが明かになってきた。しかも各細胞はそれぞれが独自の機能を分担している。そのため、いままでは漠然と肝臓全体で担っていると信じられてきた機能のな

かには、実は各細胞の分担によるものであることが明らかになりつつあるものがある。そのひとつの例として S-アデノシルメチオニンシンターゼ (S-adenosylmethionine synthetase, 以下 AdoMet synthetase) を挙げることができる。この酵素はメチオニンと ATP からの S-アデノシルメチオニン生成を触媒する。S-アデノシルメチオニンはほとんどのメチル転移反応の



メチル基ドナーであり、核酸、タンパク質、糖などの広範囲な化合物のメチル化に関与する。ところで、哺乳類の AdoMet synthetase には肝臓型と非肝臓型の2つのアイソザイムが知られている。肝臓型は成体の肝臓のみに、非肝臓型は肝臓以外の種々の器官に広く分布していると信じられてきた。しかし最近、少量の非肝臓型アイソザイムが肝臓にも存在することが判明し、しかも肝臓内の細胞レベルでの局在が明らかになった⁶⁷⁾(Fig. 16)。細胞単離法、ノーザンプロット法、ウエスタンプロット法、免疫組織化学を駆使して解析すると、実質細胞は主として肝臓型とわずかな非肝臓型を発現していた。一方、星細胞は非肝臓型を発現していた。また、クッパー細胞と内皮細胞は両者をもとに発現していた。CCl₄で傷害した肝臓では、星細胞と実質細胞の酵素活性は40-50%の減少があったが、クッパー細胞と内皮細胞では活性低下はみられなかった。このようにして、一つの酵素のアイソザイムの局在が肝臓内の細胞によって異なることがわかった。いままで単に肝臓に存在するタンパク質あるいは酵素と考えられてきた分子も、細胞レベルでは局在が異なるものが今後さらに見出される可能性があり、病態との関連でも興味深い。

d. 活性持続型ビタミンCによる3次元人工肝臓の開発

近年、生命科学の多くの分野で研究の手段として、細胞培養法が広範に用いられている。ところで、正常細胞は一般に培養皿に接着して増殖するが、細胞は播種されるとよく増殖して、やがて細胞が隙間なくぎっしりと並んだ単一の層を形成すると、それ以上は増殖しなくなる。これを密度依存性の細胞増殖という。生体内では細胞も組織も3次元的存在しているのに、何故このような現象が起きるのであろうか。何故、培養系では細胞は2次元の状態にとどまり、組織も形成されないのであろうか。実は細胞はビタミンC欠乏状

Fig. 15. Extension of cellular processes in cultured rat stellate cells on type I collagen gel. The cells were cultured on type I collagen gel, and monitored by phase-contrast time-lapse video microscopy for up to 4 h⁵⁸⁾. Photographs were taken 71 min (A), 2h (B), 3h (C), and 4h (D) after inoculation. Arrowheads indicate the front of elongating cellular processes. (Bar = 200 μ m).

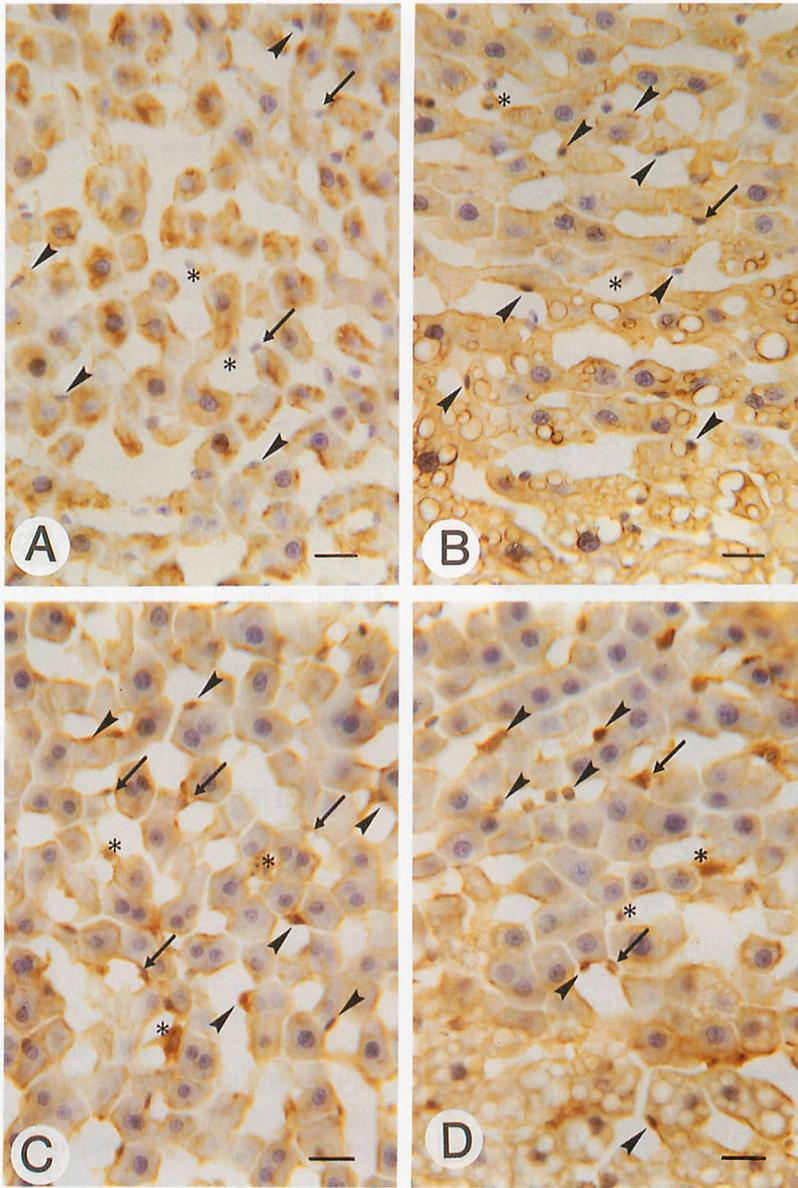


Fig. 16. Immunohistochemical analysis of liver-type and non-hepatic-type S-adenosylmethionine synthetase (AdoMet synthetase) isozymes in rat liver. Immunohistochemistry of liver-type (A, B) and non-hepatic-type (C, D) AdoMet synthetase in control (A, C) and CCl_4 -treated (B, D) rat liver was performed as described⁶⁷⁾. Liver-type AdoMet synthetase was demonstrated in hepatic parenchymal cells, and non-parenchymal cells consistent with phagocytic Kupffer cells (asterisks), and endothelial cells (arrowheads) in both control (A) and CCl_4 -treated (B) rat livers. The liver-type isozyme was not present in the non-parenchymal cells containing lipid droplets within the cytoplasm (characteristics of the hepatic stellate cells; arrows). Non-hepatic-type AdoMet synthetase (C, D) was demonstrated in non-parenchymal cells, consistent with hepatic stellate cells (arrows), Kupffer cells (asterisks), and endothelial cells (arrowheads) in both control (C) and CCl_4 -treated (D) rat livers. Non-hepatic-type isozyme was demonstrated in the fatty degenerated parenchymal cells in CCl_4 -treated rat livers (D). (Bars=20 μm).

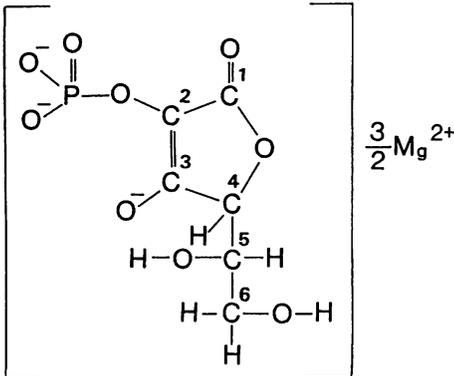


Fig. 17. Molecular structure of L-ascorbic acid 2-phosphate, magnesium salt.

態すなわち壊血病状態で培養されていたことが判明した。そこで、培養皮膚線維芽細胞にビタミンC (L-アスコルビン酸, L-ascorbic acid) を添加してみた。すると、細胞の増殖は促進され、同時にコラーゲンの生合成、および細胞周囲への沈着も促進された^{68,69)}。しかし、L-アスコルビン酸は不安定な分子であるため、より安定なビタミンC誘導体が探索され、L-アスコルビン酸2-リン酸(図17, L-ascorbic acid 2-phosphate, 以下 Asc 2-P) が有効であることが分かった⁷⁰⁻⁷²⁾。これを活性持続型ビタミンCと名付けた。

そこで、ラットの肝実質細胞と線維芽細胞を0.2 mM Asc 2-Pを含む培地の中で共培養してみた⁷³⁾。すると、毛細胆管様構造を持つ実質細胞層を上下から線維芽細胞の層が挟む肝細胞索様の構造が形成された(図18)。肝実質細胞の初代培養系に Asc 2-P を添加し、実質細胞の機能をアルブミン合成活性で測定すると、30日後でも2日目の50%の機能が維持できた。ところが上述の肝実質細胞と線維芽細胞の共培養系では、アルブミン合成活性は30日後でも2日目の70%が維持できた。このように形態だけでなく機能も長期間にわたって維持でき、これをミニ肝臓と名付けた。このことは、将来絶対的ドナー不足などから、必要とされる人工肝臓創生への可能性を示すものである。

e. 星細胞学の提唱

以上で紹介したように、星細胞は肝臓研究の中に確固たる位置を占めつつある。特にここ数年の研究の進展には目覚ましいものがある。また、星細胞は肝臓のみでなく全身に分布する細胞系であることも次第に明

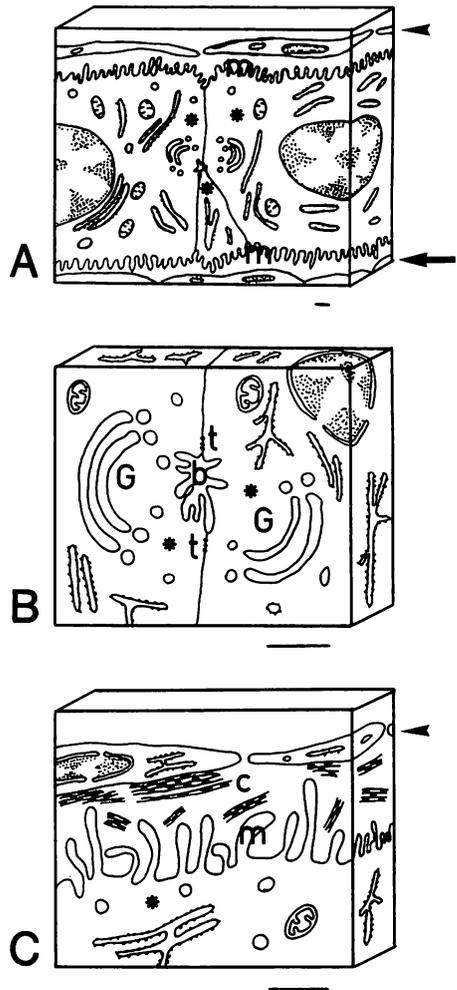


Fig. 18. Electron micrographs of co-culture of hepatic parenchymal cells and fibroblasts. The cells were cultured for 30 days in supplemented William's medium E and observed by electron microscopy at low (A) and high magnifications (B and C). Areas of contact between the two cell types (A and C) and aggregated parenchymal cells (B) are shown. b, bile canaliculus-like structure; G, Golgi apparatus; c, collagen fibers; m, microvilli. Asterisks indicate parenchymal cells, and arrowheads and an arrow indicate the respective top and basal layer of the fibroblasts. (Bars=1 μ m).

かになってきた。そこで、星細胞学(stellate cellology)としてこの研究分野をよぶことを提唱し、研究がさらに発展することを期待したい。

7. 結 語

肝臓星細胞の研究の新しい展開について、著者らの研究を中心にして紹介した。基礎医学のみならず、臨床医学の視点からも極めて興味ある細胞であり、今後一層の研究の進展があるものと思われる。

文 献

- 1) Bloom W, Fawcett DW (1994) A Textbook of Histology, 12th ed, Chapman & Hall, New York, pp 652-668
- 2) Wake K (1971) "Sternzellen" in the liver: Perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* **132**: 429-462
- 3) Wake K (1980) Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* **66**: 303-353
- 4) Senoo H, Sato M, Imai K (1997) Hepatic stellate cells-from the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix-. *Acta Anat Nippon* **72**: 79-94
- 5) 妹尾春樹 (1994) 肝臓星細胞の細胞生物学. *秋田医学* **21**: 47-53
- 6) 妹尾春樹, 畑隆一郎 (1994) 星細胞(ビタミンA貯蔵細胞)の細胞生物学—レチノイド代謝と細胞外マトリックスの機能の視点から—. *ビタミン* **68**: 501-513
- 7) Blomhoff R. (1994) *Vitamin A in Health and Disease*. Marcel Dekker Inc. New York
- 8) Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science* **250**: 399-404
- 9) Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR (1992) Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* **71**: 951-990
- 10) Blomhoff R, Green MH, Norum KR (1992) Vitamin A: Physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr* **12**: 37-57
- 11) Bloom W, Fawcett DW (1994) A Textbook of Histology, 12th ed, Chapman & Hall, New York, pp 368-409
- 12) Bargmann VW (1977) *Histologie und Mikroskopische Anatomie des Menschen*, 7., überarbeitete Aufl, George Thieme Verlag, Stuttgart, pp 228-318
- 13) Sims DE (1986) The pericyte—A review. *Tiss Cell* **18**: 153-174
- 14) Folkman J, D'Amore P A (1996) Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* **87**: 1153-1155
- 15) 妹尾春樹 (1991) レチノイドの細胞取り込み機構の新展開. *実験医学* **9**: 1372-1376
- 16) 妹尾春樹 (1994) レチノイドと細胞外マトリックスの細胞生物学. *病態生理* **13**: 168-175
- 17) 妹尾春樹 (1989) レチノール結合蛋白の受容体. *細胞* **21**: 468-472
- 18) Blomhoff R, Senoo H, Smeland S, Bjerknes T, Norum KR (1992) Cellular uptake of vitamin A. *J Nutr Sci Vitam* **38**: 327-330
- 19) Senoo H, Hata R, Nagai Y, Wake K (1984) Stellate cells (vitamin A-storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non-parenchymal cells in the liver. *Biomed Res* **5**: 451-458
- 20) 妹尾春樹 (1996) 肺胞中隔形成とPDGF-A. *蛋白質核酸酵素* **41**: 2127-2128
- 21) Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C (1994) Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* **8**: 1875-1887
- 22) Soriano P (1994) Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF β -receptor mutant mice. *Genes Dev* **8**: 1888-1896
- 23) Boström H, Willetts K, Penkny M, Levéen P, Lindahl P, Hedstrand H, Pekna M, Hellström M, Gebre-Medhin S, Schalling M, Nilsson M, Kurland S, Törnell J, Heath JK, Betsholtz C (1996) PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Cell* **85**: 863-873

- 24) 妹尾春樹 (1997) 人体の構造と機能—呼吸器系: 岡田正, 小越章平, 細谷憲政, 武藤泰敏, 監修, ビジュアル臨床栄養百科1, 小学館, 東京: pp 98-101
- 25) Lindahl P, Bengt R, Johansson B R, Levéen P, Betsholtz C (1997) Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**: 242-245
- 26) Senoo H, Smeland S, Malaba L, Bjerknes T, Stang E, Roos N, Berg T, Norum KR, Blomhoff R (1993) Transfer of retinol-binding protein from HepG2 human hepatoma cells to cocultured rat stellate cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 3616-3620
- 27) Senoo H, Smeland S, Stang E, Roos N, Berg T, Norum KR, Blomhoff R (1993) Stellate cells take up retinol-binding protein. In: Knook DL, Wisse E (eds) *Cells of the Hepatic Sinusoid Vol 4*, Kupffer Cell Foundation Leiden pp 423-425
- 28) Senoo H, Stang E, Kindberg GM, Berg T, Roos N, Norum KR, Blomhoff R (1989) Uptake of retinol-binding protein in liver cells. In: Wisse E, Knook DL, Decker K (eds) *Cells of the Hepatic Sinusoid Vol 2*, Kupffer Cell Foundation, Rijswijk, pp 29-32
- 29) Senoo H, Stang E, Nilsson A, Kindberg GM, Berg T, Roos N, Norum KR, Blomhoff R (1990) Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of rat liver. *J Lipid Res* **31**: 1229-1239
- 30) 妹尾春樹, 畑隆一郎 (1993) 肝臓星細胞の単離法. *Connect Tiss* **25**: 129-137
- 31) Malaba L, Smeland S, Senoo H, Norum K R, Berg T, Blomhoff R, Kindberg GM (1996) Retinol-binding protein and asialo-orosomucoid are taken up by different pathways in liver cells. *J Biol Chem* **270**: 15686-15692
- 32) Andersen KB, Nilsson A, Blomhoff HK, Øyen TB, Gabrielsen OS, Norum KR, Blomhoff R (1992) Direct mobilization of retinol from hepatic perisinusoidal stellate cells to plasma. *J Biol Chem* **267**: 1340-1344
- 33) Båvik CO, Eriksson U, Allen RA, Peterson PA (1991) Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. *J Biol Chem* **266**: 14978-14985
- 34) Båvik C-O, Busch C, Eriksson U (1992) Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* **267**: 23035-23042
- 35) Båvik C-O, Lévy F, Hellman U, Wernstedt C, Eriksson U (1993) The retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein. *J Biol Chem* **268**: 20540-20546
- 36) Smeland S, Bjerknes T, Malaba L, Eskild W, Norum KR, Blomhoff R (1995) Tissue distribution of the receptor for plasma retinol-binding protein. *Biochem J* **305**: 419-424
- 37) Anderson RGW, Kamen BA, Rothburg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* **255**: 410-411
- 38) Majno G (1979) The story of the myofibroblasts. *Am J Surg Pathol* **6**: 535-542
- 39) Senoo H, Wake K (1985) Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. *Lab Invest* **52**: 182-194
- 40) 妹尾春樹 (1996) 産生細胞. 渡辺明治, 岡崎勲編: 細胞外マトリックス—臨床医学への応用—, メディカルレビュー社, 東京, pp 63-70
- 41) Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Matano Y, Enomoto K, Morita M, Senoo H., Role of hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) in the suppression of hepatic fibrosis in the Long-Evans cinnamon-like colored (LEC) rat. submitted
- 42) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland, New York pp 949-1010
- 43) 妹尾春樹 (1997) 人体の構造と機能—細胞外マトリックス系: 岡田正, 小越章平, 細谷憲政, 武藤泰敏, 監修, ビジュアル臨床栄養百科1, 小学館, 東京: pp 49-53
- 44) Senoo H, Hata R (1994) Extracellular matrix regulates cell morphology, proliferation, and tissue formation. *Acta Anat Nippon* **69**: 719-733

- 45) Hata R, Senoo H (1992) Extracellular matrix system regulates cell growth, tissue formation, and cellular functions. *Tiss Cult Res Commun* **11**: 337-343
- 46) 畑隆一郎, 妹尾春樹 (1993) 形態形成プログラム発現における接着シグナルの役割. *組織培養* **19**: 529-535
- 47) Senoo H, Hata R (1993) Tissue formation and extracellular matrix system —Cellular devices for adhesion to extracellular matrix—. *Tiss Cult Res Commun* **12**: 237-245
- 48) Senoo H, Hata R, Wake K, Nagai Y (1991) Isolation and serum free culture of stellate cells. In: Wisse E, Knook DL, McCuskey RS (eds) *Cells of the Hepatic Sinusoid Vol 3*, Kupffer Cell Foundation, Leiden, pp 259-262
- 49) Senoo H, Hata R (1994) Extracellular matrix regulates and L-ascorbic acid 2-phosphate further modulates morphology, proliferation, and collagen synthesis of the perisinusoidal stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 999-1006
- 50) Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986) Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25**: 312-318
- 51) Reid LM, Fiorino AS, Sigal SH, Brill S, Holst PA (1992) Extracellular matrix gradient in the space of Disse: relevance to liver biology. *Hepatology* **15**: 1198-1203
- 52) Senoo H, Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Hata R (1996) Three-dimensional structure of extracellular matrix reversibly regulates morphology, proliferation and collagen metabolism of perisinusoidal stellate cells (vitamin A-storing cells). *Cell Biol Int* **20**: 501-512
- 53) Montfort I, Perez-Tamayo R, Alvizouli AM, Tello E (1990) Collagenase of hepatocytes and sinusoidal liver cells in the reversibility of experimental cirrhosis of the liver. *Virchows Archiv B Cell Pathol* **59**: 281-289
- 54) Lindsay CK, Thorgeirsson UP (1995) Localization of messenger RNA for tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and type IV collagenases/gelatinases in monkey hepatocellular carcinomas. *Clin Exp Metastasis* **13**: 381-388
- 55) Kojima N, Miura M, Matano Y, Imai K, Sato M, Senoo H, Hata R-I (1997) Reversible regulation of hepatic stellate cell functions by three-dimensional structure of extracellular matrix. In: Wisse E, Knook DL, Balabaud C (eds) *Cells of the Hepatic Sinusoid Vol 6*, Kupffer Cell Foundation, Leiden, 107-109
- 56) 妹尾春樹, 今井克幸, 佐藤 充 (1997) 細胞接着シグナルによる細胞の形態・増殖・機能の可逆的制御. *組織細胞工学* **23**: 201-205
- 57) 妹尾春樹, 佐藤 充, 今井克幸 (1997) 肝臓星細胞と肺胞中隔細胞. *呼吸* **16**: 604-615
- 58) Miura M, Sato M, Toyoshima I, Senoo H (1997) Extension of long cellular processes of hepatic stellate cells cultured on extracellular type I collagen gel by microtubule assembly: observation utilizing time-lapse video-microscopy. *Cell Struct Func* **22**: 487-492
- 59) Sato M, Imai K, Kojima N, Miura M, Senoo H (1997) Induction of long cellular processes in hepatic stellate cell culture by integrin-binding of fibrillar type I collagen. In: Wisse E, Knook DL, Balabaud C (eds) *Cells of the Hepatic Sinusoid Vol 6*, Kupffer Cell Foundation, Leiden, 85-89
- 60) Sato M, Imai K, Kojima N, Miura M, Senoo H (1998) Induction of cellular processes containing collagenase and retinoid by integrin-binding to type I collagen in hepatic stellate cell culture. *Cell Biol Int*, in press
- 61) Kojima N, Sato M, Imai K, Miura M, Matano Y, Senoo H (1998) Hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) change their cytoskeleton structure through signal transduction system by extracellular matrix. *Histochem Cell Biol*, in press
- 62) Imai K, Sato M, Kojima N, Miura M, Matano Y, Senoo H (1997) Three-dimensional morphological changes in cultured hepatic stellate cells by type I collagen fibers. In: Wisse E, Knook DL, Balabaud C (eds) *Cells of the Hepatic Sinusoid Vol 6*, Kupffer Cell Foundation, Leiden, 105-106
- 63) Imai K, Senoo H (1998) Morphology of sites of adhesion between hepatic stellate cells

- (vitamin A-storing cells) and a three-dimensional extracellular matrix. *Anat Rec* 250, in press
- 64) 妹尾春樹 (1997) 肝臓外ビタミンA貯蔵星細胞. *ビタミン* **71**: 395-396
- 65) Nagy NE, Holven KB, Roos N, Senoo H, Kojima N, Norum KR, Blomhoff R (1997) Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res* **38**: 645-658
- 66) 俣野吉計, 三浦光隆, 小嶋直介, 佐藤 充, 今井克幸, 妹尾春樹 (1997) 小腸のビタミンA吸収・貯蔵細胞系. *ビタミン* **71**: 174
- 67) Shimizu-Saito, Horikawa S, Kojima N, Shiga J, Senoo H, Tsukada K (1997) Differential expression of S-adenosylmethionine synthetase isozymes in different cell types of rat liver. *Hepatology* **26**: 424-431
- 68) 畑隆一郎, 妹尾春樹 (1997) L-アスコルビン酸 2-リン酸 (活性持続型ビタミンC) による細胞分化・器官形成誘導の分子機構. *ビタミン* **69**: 675-688
- 69) 妹尾春樹 (1994) アスコルビン酸による細胞増殖と組織形成の促進. *ビタミン* **68**: 729-732
- 70) Hata R, Senoo H (1989) L-Ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblast. *J Cell Physiol* **138**: 8-16
- 71) Kurata S, Senoo H, Hata R (1993) Transcriptional activation of type I collagen genes by ascorbic acid 2-phosphate in human skin fibroblasts and its failure in cells from a patient with $\alpha 2(I)$ -chain-defective Ehlers-Danlos syndrome. *Exp Cell Res* **206**: 63-71
- 72) 畑隆一郎, 妹尾春樹 (1992) 組織形成を誘導するビタミンC. *日経サイエンス* 2月号: 88-97
- 73) Senoo H, Tsukada Y, Sato T, Hata R (1989) Co-culture of fibroblasts and hepatic parenchymal cells induces metabolic changes and formation of a three-dimensional structure. *Cell Biol Int Rep* **13**: 197-206