

亜鉛欠乏による肝線維化のメカニズム - 肝細胞と肝星細胞の相互作用 -

阪田 麻友美, 湯浅(小島) 明子, 本庄 亜希子, 湯浅 勲

大阪市立大学大学院生活科学研究科

Mechanism of liver fibrosis induced by zinc deficiency
— Interaction between hepatocytes and hepatic stellate cells —

Mayumi SAKATA, Akiko KOJIMA-YUASA, Akiko HONJO and Isao MATSUI-YUASA

Graduate School of Human Life Sciences, Osaka City University

Summary

The effect of hepatocytes on the activation of hepatic stellate cells (HSC) was studied to reveal the mechanism of zinc deficiency-induced liver fibrosis. HSC were cultured with conditioned medium of hepatocytes (PCcM). Collagen synthesis in HSC cultured for 24 hrs with zinc deficient-PCcM decreased significantly compared with that in HSC cultured with control-PCcM. However, when HSC were cultured with heat-denatured PCcM with or without zinc chelator, those in HSC were not significantly different. These results suggest that hepatocytes damaged by zinc deficiency produce some factor(s), which is high molecular weight proteins, and inhibit a progression of collagen synthesis in HSC. When HSC were incubated with zinc deficient-PCcM for 24 hrs, the activity of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) increased compared with that of control group. The analysis of proteins in PCcM was performed by SDS-PAGE. It was observed that the amount of 34.5 and 82.0 kDa proteins were increased in zinc deficient-PCcM. These results also suggest that 34.5 and 82.0 kDa proteins produced by hepatocytes cultured in zinc deficient-medium regulate collagen synthesis and degradation in HSC.

Keywords : 肝線維化 *liver fibrosis*、亜鉛欠乏 *zinc deficiency*、肝星細胞 *hepatic stellate cells*、肝細胞 *hepatocytes*、
タイプIコラーゲン *type I collagen*、マトリックスメタロプロテイナーゼ *matrix metalloproteinase*

1. 緒言

肝臓は、栄養素の代謝や解毒など重要な機能を担う生体内で最大の臓器である。肝臓を構成する細胞には肝細胞のほかに4種類の肝類洞壁細胞（肝星細胞、クッパー細胞、肝類洞内皮細胞、pit細胞）があり¹⁾、これらの細胞は、様々な機能を有するとともに生理活性物質やサイトカインを産生し、細胞間相互作用によって肝機能を正常に制御している²⁾。

肝類洞壁細胞の一つである肝星細胞は、通常ビタミン

Aを豊富に含む脂肪滴を有する細胞であるが、ウイルス、薬物、過剰のアルコールなどの種々の刺激によって活性化し、タイプI、タイプIIコラーゲンなどの細胞外マトリックスを多量に産生する筋線維芽細胞様に形質変換する。このことから、肝星細胞の活性化は肝線維化さらには肝硬変の原因となることが示唆されている³⁻⁶⁾。肝硬変は肝疾患の終末像であり、肝細胞傷害による壊死とそれに引き続いて生じる不規則再生と線維化によって生じる。また、肝硬変からの肝細胞ガンの発生数は本邦にお

いても著しく増加しており⁷⁾、肝硬変の病態改善とその予防が重要視されている。

近年、肝硬変患者では血清亜鉛濃度が低いことが報告され、亜鉛と肝硬変の病態形成との関連性が示唆されている^{8,9)}。これまで当研究室では、すでに培養肝細胞を用いて、亜鉛が肝細胞増殖に必須の要素であること¹⁰⁾、さらに亜鉛欠乏によって肝細胞のアポトーシスが誘導されること¹¹⁾を明らかにしている。これは、亜鉛欠乏が肝再生を妨げる要因となっていることを示唆している。一方、我々は培養肝星細胞を用いて亜鉛欠乏による肝星細胞の活性化メカニズムを検討したところ、亜鉛欠乏によって肝星細胞のコラーゲン合成能はコントロールに比べて有意に亢進すること、またその活性化メカニズムとして細胞内グルタチオンの減少が引き金となること、さらに亜鉛を添加することによって肝星細胞の活性化は正常レベルにまで抑制されたことを明らかにしている¹²⁾。

そこで本研究では、亜鉛と肝硬変の關係に着目して、肝細胞と肝星細胞の細胞間相互作用を明らかにするために、亜鉛欠乏状態で培養した肝細胞のconditioned medium (PCcM)を用いて肝星細胞の活性化におよぼす影響について検討した。

実験方法

動物の飼育および実験は、大阪市立大学動物実験指針¹³⁾に基づいて施行した。

1 細胞の分離・培養

a. 肝細胞の分離・培養

分離肝細胞は13-14週齢のWistar系雄性ラットの肝臓をコラゲナーゼ液で灌流した後、低速遠心法によって得た¹⁴⁾。肝細胞は細胞数を 2.0×10^5 cells/mlになるように10% FBSを含むWilliam's E培地2 mlに浮遊させ、直径35 mmのプラスチックシャーレ上で24時間培養した後、亜鉛-free、FBS-freeのWilliam's E培地に交換し、24時間培養することによって細胞周期を合わせた。次に、本培養として1) コントロール群、2) 亜鉛欠乏群、3) 亜鉛添加群の3群に分けて6時間培養した。コントロール群には、亜鉛-freeのWilliam's E培地に細胞が最低限必要とする亜鉛 ($ZnSO_4$) 16 μ Mを添加し、亜鉛欠乏群には、亜鉛のキレート剤として細胞膜非透過性のdiethylenetriamine penta-acetic acid (DTPA)を600 μ M添加した。また、亜鉛添加群にはDTPAを添加して1時間後に $ZnSO_4$ 600 μ Mを添加した。本培養終了後、これらの培養上清を肝細胞のconditioned medium (PCcM)と

した。

b. 肝星細胞の分離・培養

分離肝星細胞は13-14週齢のWistar系雄性ラットの肝臓をプロナーゼ、コラゲナーゼ液で灌流した後、Nycodenz溶液を用いた密度勾配遠心法によって得た¹²⁾。肝星細胞は細胞数を 5.0×10^5 cells/mlになるように10% FBSを含むDMEM培地1.5 mlに浮遊させ、直径35 mmのプラスチックシャーレ上で2日間培養した後、亜鉛-free、FBS-freeのDMEM培地に交換し、24時間培養することによって細胞周期を合わせた。さらに、本培養として、肝細胞のPCcMを用いて24時間培養した。

c. PCcMの調製

PCcMには、肝細胞の培地に添加したDTPAが肝星細胞に対して直接に影響するのを防ぐために、セントリザルトを用いて低分子を遠心除去 (4500 rpm、10分間) した溶液またはPCcMに含まれるタンパクを変性させるために95℃、10分間の加熱処理後さらに低分子を遠心除去した溶液の2種類を作製した。

なお、肝星細胞の本培養には、それぞれのPCcM 750 μ lと $ZnSO_4$ 16 μ Mを添加した亜鉛-freeのDMEM培地750 μ lを合わせて1.5 mlとしたものを培養液として用いた。

2 肝星細胞のコラーゲン合成能

肝星細胞のコラーゲン合成能を[2,3,4,5-³H]-L-prolineの取り込みによって測定した^{15,16)}。-アミノプロピオニトリル、L-アスコルビン酸、[2,3,4,5-³H]-L-prolineを肝星細胞の本培養開始時に添加して24時間培養した。その後、培養液を透析することによって遊離の[2,3,4,5-³H]-L-prolineを除去した。さらに、得られたタンパク質画分をコラゲナーゼ処理後、遊離した放射活性を測定することによって、肝星細胞のコラーゲン合成能とした。

3 肝星細胞のコラーゲン分解能

肝星細胞のコラーゲン分解能としてmatrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 活性をELISA法によって測定した。

4 肝細胞のconditioned medium (PCcM) に含まれるタンパク因子の解析

SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) を用いてPCcMに含まれるタンパク因子を解析した。肝細胞は上記のように培養し、得られたPCcMを透析した

後、透析内液を凍結乾燥した。濃縮したPCcMはタンパク量を10 µgにあわせた後、12%アクリルアミドゲルに泳動した¹⁷⁾。

5 有意差検定

有意差検定には分散分析およびポストホックテストとしてFisherのPLSD法を使用し、有意水準は5%とした。

実験結果

1 肝星細胞のコラーゲン合成能

肝細胞のPCcMを用いて肝星細胞を24時間培養したときのコラーゲン合成能をFig. 1に示した。PCcMに含まれるDTPAが肝星細胞に対して直接に作用する可能性が考えられるため、セントリザルトを用いて低分子を遠心除去したPCcMで培養すると、亜鉛欠乏群のコラーゲン合成能はコントロール群に比べて顕著に抑制された。しかし、亜鉛を添加することによってコラーゲン合成能の抑制は回復した (Fig. 1A)。次に、PCcMに含まれるコラーゲン合成能の抑制因子がタンパク性因子であるかどうかを検討するために加熱変性させたPCcMで培養した。その結果、亜鉛の有無に関わらずコラーゲン合成能はコントロール群と変わらなかった (Fig. 1B)。

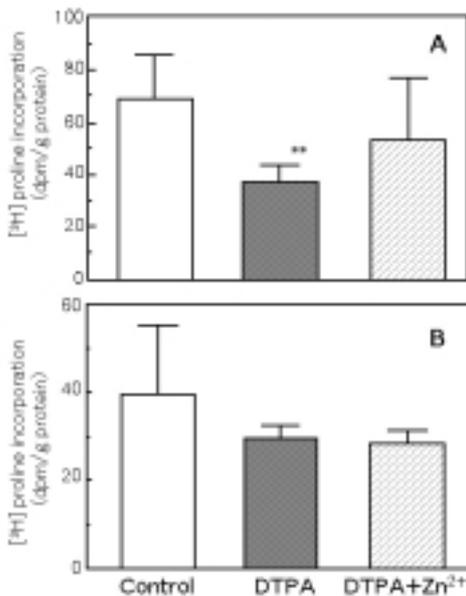


Figure 1. Effect of zinc deficiency on collagen synthesis in hepatic stellate cells

Hepatic stellate cells were incubated with (A) conditioned medium of hepatocytes (PCcM) filtered by centralsalt for removal of low molecular substances, or (B) filtered PCcM after protein denaturation. Hepatocytes were incubated for 6 hours with or without DTPA (600 µM) and DTPA plus ZnSO₄. ZnSO₄ was added 1 hour after the addition of DTPA. The hepatic stellate cells were cultured with PCcM with collected from different cell cultures and diluted with DMEM to 1:1. Then the cells were labeled with [2,3,4,5-³H]-L-proline for 24 hrs.

Collagen synthesis was expressed as the radioactivity of collagenase-digestible proteins per g protein. Each bar is the mean (±S.D.) of three experiments (** P < 0.05 with control cells).

2 肝星細胞のコラーゲン分解能

肝星細胞のコラーゲン分解能として、コラーゲン分解酵素であるmatrix metalloproteinase-1 (MMP-1)活性を測定した。セントリザルトを用いて低分子を遠心除去したPCcMで肝星細胞を24時間培養したときの培地中に放出されたMMP-1活性を測定したところ、亜鉛欠乏のPCcMで培養した肝星細胞のMMP-1活性はコントロール群に比べて亢進した。しかし、亜鉛添加群におけるMMP-1活性はコントロールレベルにまで抑制された (Fig. 2A)。また、細胞内に存在するMMP-1活性の値も同様な挙動を示した (Fig. 2B)。

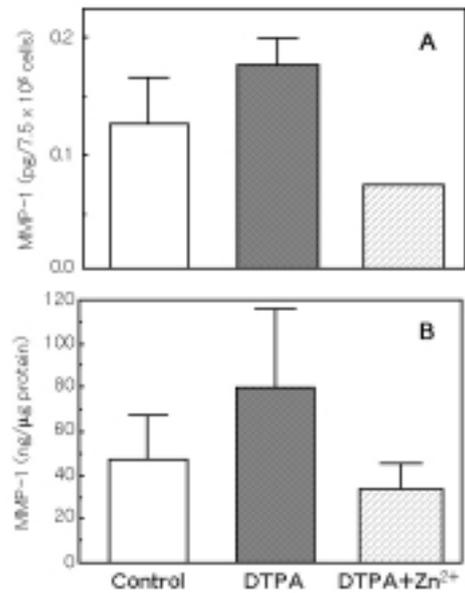


Figure 2. Effect of zinc deficiency on matrix metalloproteinase-1 activity in (A) medium, and (B) cellular fraction of hepatic stellate cells

Hepatic stellate cells were incubated with PCcM filtered by centralsalt for removal of low molecular substances. Hepatocytes were incubated for 6 hrs with or without DTPA (600 µM) and DTPA plus ZnSO₄. ZnSO₄ was added 1 hour after the addition of DTPA. The hepatic stellate cells were cultured with PCcM with collected from different cell cultures and diluted with DMEM to 1:1. Each bar is the mean (± S.D.) of three experiments.

3 肝細胞のconditioned medium (PCcM)に含まれるタンパク因子の解析

SDS-PAGEを用いてPCcMに含まれるタンパク質の解析を行った。亜鉛欠乏群において、34.5 kDaおよび82.0 kDa付近に強いバンドが認められた (Fig. 3A)。また、デンストメータ - によって定量化すると、亜鉛欠乏のPCcMに含まれる34.5 kDaおよび82.0kDaのタンパク量

はコントロール群に比べて非常に高値を示したが、亜鉛を添加することによってこれらの値はコントロールレベルにまで低下した (Fig. 3B)。

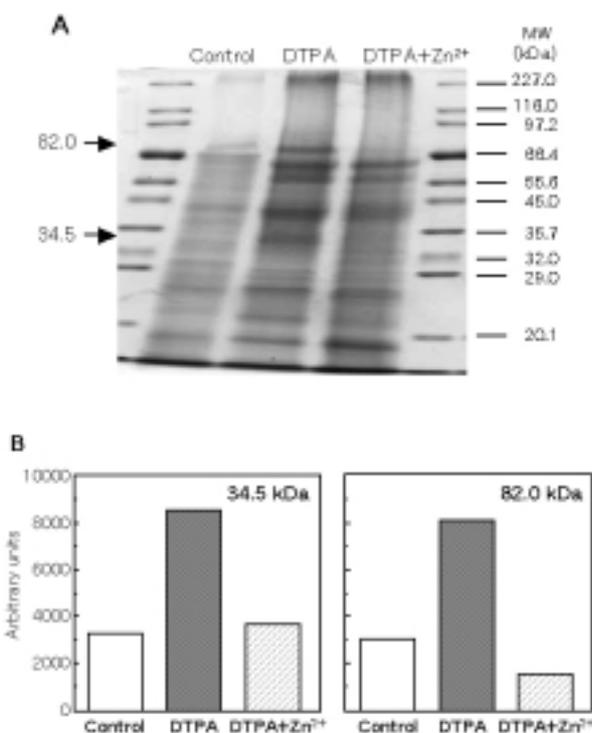


Figure 3. (A) Electrophoretic pattern of protein in conditioned medium of hepatocytes (PCcM) and (B) Quantification of 34.5 and 82.0 kDa protein levels by densitometer. Equal volumes of PCcM were electrophoresed in a 12% polyacrylamide gel. Hepatocytes were incubated for 6 hours with or without DTPA (600 μ M) and DTPA plus ZnSO₄. ZnSO₄ was added 1 hour after the addition of DTPA.

考察

肝線維化は通常、肝細胞壊死に続発する。損傷部の修復以上に過剰なコラーゲンなどの細胞外マトリックスの増生が持続すると、肝小葉構造の改築と再生結節を伴う不可逆的な肝硬変へと進展する。この肝線維化に関与する中心的な役割を担うのが肝星細胞である。すなわち、肝傷害によって肝星細胞は活性化し、細胞外マトリックスを産生する筋線維芽細胞様に形質転換する。

近年、動物実験において、四塩化炭素誘発肝傷害モデルラットに亜鉛を投与すると、肝細胞傷害や脂質過酸化が軽減されたこと、肝臓中のコラーゲン量が減少したことが報告されており¹⁸⁻²¹⁾、亜鉛が肝細胞傷害や肝線維化進展を抑制する効果を有することが示唆されるが、これらの詳細なメカニズムについては明らかにされていない。我々は、肝線維化の直接的な原因となる肝星細胞を分離・培養することによって、すでに、亜鉛欠乏によ

って肝星細胞のコラーゲン合成能は亢進するが、亜鉛を添加することによってその亢進は抑制されることを明らかにしている¹²⁾。そこで本研究では、亜鉛と肝硬変の関係に着目して、肝細胞と肝星細胞の細胞間相互作用を明らかにするために、亜鉛欠乏状態で培養した肝細胞の conditioned medium (PCcM)を用いて肝星細胞の活性化におよぼす影響について検討した。

しかし、本研究では、肝星細胞の単独培養系とは異なった結果が得られた。すなわち、亜鉛欠乏状態で培養した肝細胞の培養上清をPCcMとして培養したときの肝星細胞におけるコラーゲン合成能は、コントロール群に比べて顕著に抑制されたが、亜鉛添加群の肝細胞の培養上清をPCcMとしたときの肝星細胞では、抑制されたコラーゲン合成能は回復した。ところが、PCcMに含まれるコラーゲン合成能の抑制因子がタンパク性因子であるかどうかを検討するために、加熱変性させたPCcMで肝星細胞を培養した場合は、亜鉛の有無に関わらずコラーゲン合成能はコントロール群と変わらなかった。PCcMには肝細胞の培地に添加したDTPAが肝星細胞に対して直接に影響するのを防ぐためにセントリザルトを用いて低分子をあらかじめ遠心除去しているため、これらの結果から、亜鉛欠乏によって傷害を受けた肝細胞が、肝星細胞のコラーゲン合成能の亢進を抑制する何らかの因子を放出しており、その因子は高分子タンパク因子であることが示唆された。

次に、亜鉛欠乏のPCcMで培養した肝星細胞のコラーゲン合成能の低下は、分解系が亢進したことによる可能性が考えられるため、コラーゲン分解酵素であるMMP-1活性を測定した。その結果、低分子を遠心除去したPCcMで肝星細胞を培養したときの培地中に放出されたMMP-1活性および肝星細胞内に存在するMMP-1活性は、亜鉛欠乏群ではコントロール群に比べて亢進したが、亜鉛添加群のMMP-1活性は抑制された。肝細胞はMMPを発現しないことが報告されていることから²²⁾、PCcMに含まれる高分子タンパク因子がMMPであるとは考えられない。一方、肝細胞のplasma membrane fractionsは、肝星細胞における前駆体MMPを活性型MMPに変換させることが明らかにされており^{22, 23)}、肝細胞とMMPには深い関連があることが推察される。これらのことから、PCcMに含まれる因子が肝星細胞に作用し、その結果、肝星細胞におけるMMP-1活性が上昇したため、コラーゲン分解系が亢進したことが示唆された。

以上の結果から、亜鉛欠乏状態の肝細胞から得られたPCcMには、肝星細胞のコラーゲン合成系と分解系に影響をおよぼす高分子のタンパク因子が存在することが明

らかになった。

さらに、肝細胞のPCcMに含まれるタンパク因子の解析についてSDS-PAGEを用いて検討したところ、亜鉛欠乏群において34.5 kDaおよび82.0 kDa付近の分子量をもつ高分子タンパクの存在が認められた。

肝細胞から遊離されるサイトカインや増殖因子として、fibroblast growth factor (FGF)、transforming growth factor- (TGF-), IL-1、IL-6、IL-8、macrophage colony stimulating factor (M-CSF)などが知られている²⁴⁾。これらのうち、34.5 kDa付近の分子量をもつサイトカインとして、IL-1、IL-6などがある。また、82.0 kDa付近の分子量のサイトカインとしてM-CSFがある²⁴⁾。しかし、これらのサイトカインが肝星細胞の活性化を抑制する機能を有することは明らかにされていない。また、今までに明らかにされているサイトカインや増殖因子のほとんどが肝星細胞の活性化に対して促進的に作用する。しかしながら、本研究において、亜鉛欠乏状態の肝細胞から得られたPCcMに含まれる34.5 kDaおよび82.0 kDa付近の分子量をもつ高分子タンパク因子は、肝星細胞のコラーゲン合成能を抑制させる機能を有するため、これらの高分子タンパク因子は未知の肝細胞因子もしくは肝星細胞の活性化を抑制する作用を有する既知のサイトカインや増殖因子であることが推察された。今後、これらの高分子タンパク因子の解明が期待される。

要約

亜鉛欠乏による肝線維化のメカニズムにおける肝細胞と肝星細胞の細胞間相互作用を明らかにするために、亜鉛欠乏状態で培養した肝細胞のconditioned medium (PCcM)を用いて肝星細胞の活性化におよぼす影響について検討したところ、以下のことが明らかとなった。

1. 亜鉛欠乏のPCcMで肝星細胞を培養すると、コラーゲン合成能はコントロール群に比べて低下したが、亜鉛添加群のPCcMで培養するとコラーゲン合成能の抑制は回復した。一方、PCcMに含まれるコラーゲン合成能の抑制因子がタンパク性因子であるかどうかを検討するために加熱変性させたPCcMで培養したところ、亜鉛の有無に関わらずコラーゲン合成能はコントロール群と変わらなかった。これらことから、亜鉛欠乏によって傷害を受けた肝細胞が、肝星細胞のコラーゲン合成能の亢進を抑制する何らかの因子を放出しており、その因子は高分子タンパク因子であることが示唆された。
2. 亜鉛欠乏のPCcMで肝星細胞を培養すると、コラーゲ

ン分解酵素であるMMP-1活性がコントロール群に比べて上昇した。

3. PCcMに含まれるタンパク因子の解析を行った結果、亜鉛欠乏のPCcMにおいて34.5 kDaおよび82.0 kDa付近のタンパクが検出された。

以上の結果から、肝細胞由来の34.5 kDaおよび82.0 kDa付近の分子量をもつ高分子タンパク因子が、肝星細胞のコラーゲン合成能と分解能の制御に関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) Wisse, E.: Ultrastructure and function of Kupper cells and other sinusoidal cells in the liver. In: Kupper Cells and other sinusoidal cells, (Eds Wisse, E. and Knook, D.L.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 33-60 (1977)
- 2) 白鳥康史：肝類洞壁細胞 - 研究の進歩と将来をみずえて - , 肝臓, 40, 271-287 (1999)
- 3) Friedman, S.L.: Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies, N. Engl. J. Med., 328, 1828-1835 (1993)
- 4) Pinzani, M.: Novel insights into the biology and physiology of the Ito cell, Pharmacol. Ther. 66 387-412 (1995)
- 5) Gressner, A.M.: Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-storing cells, J. Hepatol., 22, 28-36 (1995)
- 6) Friedman, S.L.: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury, J. Biol. Chem., 275, 2247-2250 (2000)
- 7) 社団法人 日本肝臓学会編: 肝ガン白書 - 平成11年度 - (1999)
- 8) Bode, J.C., Hanisch, P., Henning, H., Koenig, W., Richter, F.W., Bode, C.: Hepatic zinc content in patients with various stages of alcoholic liver disease and in patients with chronic active and chronic persistent hepatitis, Hepatology, 8, 1605-1609 (1988)
- 9) Rodriguez-Moreno, F., Gonzalez-Reimers, E., Santolaria-Fernandez, F., Galindo-Martin, L., Hernandez-Torres, O., Batista-Lopez, N., Molina-Perez M.: Zinc, copper, manganese, and iron in chronic alcoholic liver disease, Alcohol, 14, 39-44

- (1997)
- 10) Nakatani, T., Ohtani, K., Yano, Y., Otani, S., Matsui-Yuasa, I.: The requirement of Zn²⁺ for the increase in ornithine decarboxylase induced by insulin and epidermal growth factor in primary cultured rat hepatocytes, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 386-391 (1996)
- 11) Nakatani T., Tawaramoto M., Kennedy DO., Kojima, A., and Matsui-Yuasa, I.: Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes, *Chemico-Biol. Interact.*, 125, 151-163 (2000)
- 12) Kojima-Yuasa, A., Ohkita, T., Yukami, K., Ichikawa, H., Takami, N., Nakatani, T., Kennedy, DO., Nishiguchi, S., Matsui-Yuasa, I.: Involvement of intracellular glutathione in zinc deficiency-induced activation of hepatic stellate cells, *Chemico-Biol. Interact.*, 146, 89-99 (2003)
- 13) 大阪市立大学動物実験指針: 学長達第10号 (1988)
- 14) Moldeus, P., Hogberg, J., Orrenius, S.: Isolation and use of liver cells, *Method Enzymol.*, 51, 60-70 (1978)
- 15) Poniachik, J., Baraona, E., Zhao, J., Lieber, CS.: Dilinoleoylphosphatidylcholine decreases hepatic stellate cell activation, *Lab. Clin. Med.*, 133, 342-348 (1999)
- 16) Peterkofsky, B., Diegelmann, R.: Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins, *Biochemistry*, 10, 988-994 (1971)
- 17) 西方敬人: バイオ実験イラストレイテッド (5) タンパクなんてこわくない, 秀潤社 (1997)
- 18) Anttinen, H., Ryhanen, L., Puistola, U., Arranto, A., Oikarinen, A.: Decrease in liver collagen accumulation in carbon tetrachloride-injured and normal growing rats upon administration of zinc, *Gastroentelology*, 86, 532-539 (1984)
- 19) Chvapil, M., Ryan, JN., Elias, SL., Peng, YM.: Protective effect of zinc on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats, *Exp. Mol. Pathol.*, 19, 186-196 (1973)
- 20) Camps, J., Bargallo, T., Gimenez, A., Alie, S., Caballeria, J., Pares, A., Joven, J., Masana, L., Rodes, J.: Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc administration, *Clin. Sci.*, 83, 695-700 (1992)
- 21) Gimenez, A., Pares, A., Alie, S., Camps, J., Deulofeu, R., Caballeria, J., Rodes J.: Fibrogenic and collagenolytic activity in carbon-tetrachloride-injured rats: beneficial effects of zinc administration, *J. Hepatol.*, 21, 292-298 (1994)
- 22) Loreal, O., Levavasseur, F., Fromaget, C., Gros, D., Guillouzo, A., Clement, B.: Cooperation of Ito cells and hepatocytes in the deposition of an extracellular-matrix in vitro, *Am. J. Pathol.*, 143, 538-544 (1993)
- 23) Theret, N., Musso, O., Lhelgoulch, A., Clement, B.: Activation of matrix metalloproteinase-2 from hepatic stellate cells requires interactions with hepatocytes, *Am. J. Pathol.*, 150, 51-58 (1997)
- 24) 宮園浩平, 菅村和夫編: Bio Science用語ライブラリー サイトカイン・増殖因子, 羊土社 (1995)

亜鉛欠乏による肝線維化のメカニズム

— 肝細胞と肝星細胞の相互作用 —

阪田 麻友美, 湯浅(小島) 明子, 本庄 亜希子, 湯浅 勲

要旨: 亜鉛欠乏による肝線維化のメカニズムにおける肝細胞と肝星細胞の細胞間相互作用を明らかにするために、亜鉛欠乏状態で培養した肝細胞のconditioned medium (PCcM)を用いて肝星細胞の活性化におよぼす影響について検討した。亜鉛欠乏のPCcMで肝星細胞を培養すると、コラーゲン合成能が抑制された。しかし、加熱変性させたPCcMで培養したところ、亜鉛の有無に関わらずコラーゲン合成能はコントロール群と変わらなかった。これらことから、亜鉛欠乏によって傷害を受けた肝細胞が、肝星細胞のコラーゲン合成能の亢進を抑制する何らかの因子を放出しており、その

解酵素であるMMP-1活性がコントロール群に比べて上昇した。さらに、PCcMに含まれるタンパク因子の解析を行った結果、亜鉛欠乏のPCcMにおいて34.5 kDaおよび82.0 kDa付近のタンパクが検出された。

以上の結果より、肝細胞由来の34.5 kDaおよび82.0 kDa付近の分子量をもつ高分子タンパク因子が、肝星細胞のコラーゲン合成能と分解能の制御に関与していることが示唆された。