

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 肝星細胞コラーゲンゲル退縮におけるリゾフォスファチジン酸の作用
—低分子量 G 蛋白質 Rho の標的蛋白質 Rho-キナーゼとの関連—

氏名 柳瀬 幹雄

背景

肝臓の非実質細胞のひとつ肝星細胞は肝類洞脇の Disse 腔に存在し、静止時にはビタミン A (レチノイド) の体内での貯蔵に、肝障害に際しては静止時の形質から「活性化」して筋線維芽細胞様に変化し、増殖および細胞外マトリックス産生を増す。また各種の細胞骨格蛋白やモーター蛋白を有し、肝類洞内の血流調節や門脈圧への関与、肝障害治癒過程での創傷収縮に関与する。

グリセロリン脂質のひとつリゾフォスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid: 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate, 以下 LPA) は細胞増殖因子様のはたらきをもつリン脂質メディエーターとして近年注目されている。*In vitro* では細胞増殖・収縮・遊走・細胞形態形成・アポトーシスに関連した多彩な作用が、また臨床的には卵巣癌、多発性骨髄腫などの疾患での血清濃度上昇、動脈硬化患者の粥状硬化巣での高濃度の検出が報告され、その重要性が注目されている。

LPA の生理活性機序に関しては種々の G 蛋白質を介することが知られている。なかでも、細胞接着・収縮等、細胞運動において重要な役割を果たすとともに、細胞外マトリックスの情報を細胞内シグナル伝達系に中継する接着斑構成分子の制御にも関与する低分子量 G 蛋白質 Rho を介したシグナル伝達系が注目されている。当論文においては、Rho の標的蛋白質の中でアクトミオシン相互作用や細胞接着斑の制御に直接関与する標的蛋白質として知られる Rho-キナーゼに着目、肝星細胞の創傷収縮モデルにおける LPA の作用および Rho

シグナル伝達系との関連をみる目的で、肝星細胞のコラーゲンゲル退縮モデルにおける LPA の作用を Rho-キナーゼの役割と関連させて検討した。

方法

肝星細胞は、SD 系雄性ラットより、既報に準じてコラゲナーゼ灌流法およびメトリザマイド添加遠心分離法により単離、10% ウシ胎児血清 (FCS) 添加ダルベッコ変法イーグル培養液 (DMEM) 下培養後、トリプシン・コラゲナーゼ法にて継代した「活性化」星細胞を用いて下記検討した。

LPA 結合実験：培養プレート上に上記星細胞を播種、 $[^3\text{H}]$ LPA の星細胞との結合を調べ LPA 結合部位の親和性(K_d)および結合容積(B_{max})を算出した。

コラーゲンゲル退縮実験：液体タイプ I コラーゲンコラーゲンマトリックス液を 37°C ・60 分静置でゲル化し collagen lattice を作製、collagen lattice 上に星細胞を播種、10% FCS 添加 DMEM 下培養、無血清 DMEM に交換後 6 時間目に LPA を添加、その直後に collagen lattice の辺縁を剥離し経時的に collagen lattice の面積を計測した。なお Rho-キナーゼ阻害剤 Y-27632 添加群では無血清 DMEM に交換後 5 時間目に Y-27632 を添加した。

肝星細胞の形態、ストレス線維形成：培養用 chamber slide 上に星細胞を播種、10% FCS 添加 DMEM 下培養し、無血清 DMEM に交換後 6 時間目に実験に供した。Y-27632 添加群では無血清 DMEM に交換後 5 時間目に添加した。LPA 添加後、 37°C ・30 分静置後固定処理、TRITC-conjugated phalloidin にて F-actin 染色を行い蛍光顕微鏡にて rhodamine 蛍光下で観察した。

ミオシン軽鎖リン酸化：培養用 non-coated dish 上に星細胞を播種、10% FCS 添加 DMEM 下培養し、無血清 DMEM に交換後 6 時間目に実験に供した。Y-27632 添加群では無血清 DMEM に交換後 5 時間目に添加した。LPA 添加後 5 分後に細胞を回収、リン酸化ミオシン軽鎖抗体を用いたウェスタンブロットにて検討した。

フィブロネクチンコート・ラテックスビーズに対する細胞側接着斑関与物質の検出：既報に従いフィブロネクチンによるラテックスビーズのコーティング後、同ビーズを LPA および Y-27632 と共に chamber slide 下培養星細胞上に添加混和、30 分間静置した後細胞を固定した。続いて細胞染色を anti-focal adhesion kinase (anti-FAK), anti-RhoA 各抗体を 1 次抗体に、2 次抗体は各蛍光抗体を用い、蛍光顕微鏡にて観察した。接着斑形成に関わる FAK および RhoA について細胞に接着したビーズを取り巻く様に蛍光免疫染色上検出される星細胞の

割合を調べた。

細胞・細胞外基質接着動態の検出：細胞の細胞外基質との接着面積を電気抵抗で表示する Electric cell-substrate impedance sensing system (ECIS)装置を用いた。上記星細胞を装置内 culture dish に播種、10% FCS 添加 DMEM 下培養し、さらに無血清 DMEM にて培養した。Y-27632 添加群では Y-27632 を添加、この時点から ECIS 電気抵抗測定を開始した。40 分経過時点で LPA 添加群で LPA を添加し引き続き ECIS 測定を続けた。ECIS 電気抵抗の時間経過は Y-27632 添加時点を基準として、その時点での電気抵抗との比(normalized resistance)として検出した。

結果

LPA 結合実験：肝星細胞において $[^3\text{H}]$ LPA の飽和結合をみとめた。Scatchard 解析を行った結果、同星細胞上には少なくとも 1 つの結合部位があり、その親和性(K_d) は 7.8×10^{-7} M、結合容積(B_{max})は 5.2×10^7 sites/cell、50%飽和濃度は 200nM であった。

肝星細胞コラーゲンゲル退縮実験：LPA 添加群は、無添加対照群に比して lattice 剥離後 6 時間まで濃度依存的に lattice 面積が減少した。Y-27632 前添加群では濃度依存的に lattice 面積の減少が抑制された。Y-27632 前添加後 LPA 10^{-5} M 添加群では LPA 10^{-5} M 単独添加群に比し、Y-27632 濃度依存性に lattice 面積の減少は抑制された。

肝星細胞の形態、ストレス線維形成：LPA 10^{-5} M 添加群では無添加対照群に比して細胞体が方形で、細胞体中心部のストレス線維形成のめだつ細胞が多かった。Y-27632 10^{-5} M 前添加群では細胞体が球形化し、細胞体中心部のストレス線維形成が失われた細胞が多かった。Y-27632 10^{-5} M 前添加後 LPA 10^{-5} M 添加群では LPA 10^{-5} M 単独添加群に比し、細胞体中心部のストレス線維形成がみとめられる細胞の割合が減少していた。

リン酸化ミオシン軽鎖蛋白発現：LPA 10^{-5} M 添加群では無添加対照群に比してミオシン軽鎖蛋白リン酸化が亢進した。また Y-27632 10^{-5} M 前添加後 LPA 10^{-5} M 添加群では LPA 10^{-5} M 単独添加群に比し同リン酸化が減弱していた。

フィブロネクチンコート・ラテックスビーズに対する細胞側接着斑関与物質の検出：LPA 10^{-5} M 添加群では無添加対照群に比して、FAK あるいは RhoA がビーズを取り巻く細胞の割合が多かった。また Y-27632 10^{-5} M 前添加後 LPA 10^{-5} M 添加群では LPA 10^{-5} M 単独添加群に比し FAK あるいは RhoA がビーズを取り巻く細胞の割合は減少していた。

細胞・細胞外基質接着動態の検出：Y-27632 10^{-5} M 添加後、電気抵抗比は漸次低下した。

一方 LPA 10^{-5} M 添加群ではコントロールに比し電気抵抗比は漸次増加した。また Y-27632 10^{-5} M 添加後電気抵抗比が低下した星細胞において 40 分後 LPA 10^{-5} M 添加したところ、電気抵抗比は一転増加に向った。

結論

LPA の肝星細胞における作用に関し下記検討した。LPA 結合実験の結果、肝星細胞は少なくとも 1 つの LPA の結合部位を有した。創傷収縮モデルとされるコラーゲンゲル退縮モデルにおいて、LPA 添加により肝星細胞による同退縮の作用が亢進した。また LPA 10^{-5} M 添加により細胞体のアクチンストレス線維の増加、アクトミオシン相互作用の要となるミオシン軽鎖リン酸化の亢進、ECIS による肝星細胞の細胞外基質への接着の増加をみとめた。上記作用はいずれも Rho-キナーゼ阻害剤 Y-27632 10^{-5} M 共添加により抑制され、LPA の上記作用に Rho-キナーゼ系シグナルが関連していることが推定された。