

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 柳瀬 幹雄

本研究はリン脂質メディエーターとして近年注目されているグリセロリン脂質リゾフォスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid: 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate, 以下 LPA) について、その肝星細胞の創傷収縮モデルにおける役割を、コラーゲンゲル退縮モデルを用いて検討した。また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低分子量 G 蛋白質 Rho の標的蛋白質 Rho-キナーゼに着目し、LPA の作用を Rho-キナーゼの役割と関連させて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. LPA の肝星細胞への結合実験を $[^3\text{H}]$ LPA を用いて行い、肝星細胞においてそ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 であることが示された。
2. 肝星細胞によるコラーゲンゲル退縮実験を行った結果、LPA 添加群では、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。Rho-キナーゼ阻害剤 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。
3. 肝星細胞の形態ならびにストレス線維形成を F-actin 染色後、蛍光顕微鏡下で観察したところ、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。
4. リン酸化ミオシン軽鎖蛋白発現をウエスタンブロットにて検討したところ、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。

5. フィブロネクチンコート・ラテックスビーズを用い細胞側接着斑関与物質である focal adhesion kinase (FAK), RhoA の同ビーズ周囲への染色を蛍光顕微鏡下に観察したところ、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肝星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。
6. 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、細胞・細胞外基質接着動態を検出した。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。

以上、本論文は LPA の肝星細胞における収縮亢進作用を、創傷収縮モデルを用いて初めて明らかにした。またその作用につき、ストレス線維の増加や細胞外との接着動態の亢進、また接着斑構成物質の集簇、さらにはミオシン軽鎖リン酸化亢進など包括的に検討し、それらの機序に Rho-キナーゼが関連していることを示した。本論文は肝臓の線維化に付随する創傷収縮や門脈圧亢進の機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。