

論文の内容の要旨

論文題目 収縮機能に着目した肝星細胞の病態生理学的研究

氏 名 飯塚 真央

【緒言】

我が国では、肝硬変を主体とした慢性肝疾患は 30～64 才の中高齢層において死亡順位の第 4 位を占め、肝硬変死亡者数は年間 1 万 6000 人を超えている。日本人の食生活が欧米化するに従い、アルコール性肝炎や脂肪肝の罹患率、それに続発する肝硬変患者数も年々増加している。今後も肝疾患死亡者数の増加が予想されるにもかかわらず、現在、根治的な肝硬変治療法は無いため、その詳細な病態機序の早期解明と治療薬の開発は急務である。

現在のところ、肝硬変は以下の 3 つの過程を経て発症すると考えられている。

- 1) 多量のアルコール摂取などに伴う肝細胞の機能的及び器質的障害
- 2) その後の炎症反応に伴う炎症性サイトカイン等による肝星細胞の活性化
- 3) 活性化型肝星細胞によるコラーゲンの分泌亢進及び肝臓内圧や門脈圧の上昇

肝臓の星細胞（Hepatic Stellate Cell: 以下 HSC と略す）は、類洞周囲の Disse 腔に存在し体内の 80% のビタミン A を貯蔵しており、平常時は静止型を示す。肝臓に炎症が起こると、HSC はビタミン A を放出し活性化型である筋線維芽細胞様細胞へと形質変換し、コラーゲン合成促進と収縮力増強の 2 つの大きな形質を獲得する。活性化型 HSC によるコラーゲンの合成促進は肝臓の線維化の直接的な要因となる。一方、活性化型 HSC は強力な収縮能を獲得し類洞を締め付けることで、肝臓内の循環障害を引き起こすと考えられている。

ところで、これまで平滑筋細胞の収縮機構に関する研究が精力的に行われてきた。平滑筋細胞は α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現に富み、アクチン線維とミオシン線維の相互反応を介して収縮・弛緩反応を引き起こす。この相互反応の調節機構として、以下の2つの経路が存在する。

1) Ca^{2+} 依存的収縮機構：受容体刺激は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、ミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) を活性化型へと変換させる。活性化型 MLCK はミオシン軽鎖 (MLC) をリン酸化し、収縮を引き起こす。

2) Ca^{2+} 感受性増加機構： Ca^{2+} 感受性の増加とは、細胞内の Ca^{2+} 総量を増加させずに、 Ca^{2+} に対する感受性が増加することで収縮力が増強することであり、RhoA と PKC を介する2つの経路が知られている。受容体刺激で活性化した RhoA は Rho kinase (ROCK) を活性化させる。活性化型 ROCK は、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP) の調節サブユニット MYPT1 をリン酸化し MLCP の活性を抑制する。一方、PKC は CPI-17 をリン酸化し、リン酸化 CPI-17 は MLCP の触媒サブユニット PP1c δ を直接阻害することで MLCP の活性を阻害する。

活性化型 HSC では α -SMA の発現量が上昇し、平滑筋細胞と同様に MLC のリン酸化に応じて収縮が誘起されると考えられている。HSC の収縮機構は平滑筋細胞のそれと類似することが想定されるが、HSC の収縮機構の研究はほとんど行われていない。

【目的】

本研究では、肝硬変時の HSC の収縮機構を明らかにするために、HSC の活性化に伴う収縮に関わる遺伝子の発現変動を解析し、特に Ca^{2+} 感受性増加機構に着目した HSC の収縮機構の全貌を解明することを目的とした。

【方法】

肝臓から単離した初代培養 HSC を通常条件下で培養すると、培養日数依存的に静止型から活性化型への形質変換が起こる。そこで、収縮に関わる遺伝子の培養日数依存的な発現変動を real-time PCR 法及び Western blotting 法を用いて調べた。次に、*in vitro* で活性化した HSC の収縮機構を CPI-17、MYPT1、MLC に対するリン酸化抗体を用いて検討した。最後に、2種類の肝硬変モデルラット（胆管結紮 (BDL) ラット及びジメチルニトロソアミン (DMN) 投与ラット）を作出し、*in vivo* で活性化した HSC の遺伝子発現変動や収縮機構について調べた。

【結果】

I. *in vitro* での活性化に伴う HSC の収縮蛋白質の発現変動

はじめに、HSC が活性化して筋線維芽細胞様細胞へと変化する際に、収縮に関連する蛋白質群がどのように変動するかを、転写ならびに蛋白質発現レベルで検索した。さらにこの知見をもとに、 Ca^{2+} 依存的収縮機構と Ca^{2+} 感受性増加機構に分けて、HSC が持つ収縮機構を詳しく検討した。

- 1) まず、正常ラットから単離した HSC を7日間培養することにより活性化の指標となるビタミン A 顆粒の消失、 α -SMA の発現上昇ならびに特異的な細胞形状の変化を確認した。
- 2) 他の収縮蛋白質およびその制御因子の発現変化を調べたところ、MLC、ミオシン重鎖 (MHC)、MLCK、CPI-17、ROCK2 の発現量の増加が観察された。

3) RhoA、ROCK1、PP1c δ 、MYPT1 の発現量には差がなかった。

以上の結果から、培養に伴って活性化した HSC が、直接収縮を担うアクチン分子とミオシン分子の発現量を上昇させることが明らかとなった。また HSC の活性化に伴い、収縮制御に関与する遺伝子のうち MLCK、CPI-17、ROCK2 の発現量が上昇した。これらの遺伝子発現変動の成績から、HSC には Ca²⁺依存的収縮機構と Ca²⁺感受性増加機構が存在し、活性化型 HSC はこれら 2 種類の調節機構の増強を介して収縮力を増強させていることが想定された。

1. Ca²⁺依存的収縮機構の変動

肝硬変病態時には、血液中の血管収縮因子エンドセリン濃度が上昇し、活性化型 HSC ではエンドセリン受容体の発現が亢進する。しかしながら、エンドセリンが活性化型 HSC に対してどのような情報伝達経路を介して収縮反応を惹起するかという詳細な報告はない。そこで、7 日間培養し活性化させた HSC における収縮機構、特に MLCP の調節による MLC のリン酸化制御について検討した。

- 1) 活性化型 HSC において、エンドセリンの濃度依存的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇が確認され、エンドセリン受容体 A (ET_A) アンタゴニスト BQ123 の前処置により、エンドセリン刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇が抑制された。
- 2) 培養日数の増加による HSC の活性化に伴い、ET_A の発現量の上昇及びエンドセリン刺激による細胞内 Ca²⁺濃度の増加が観察された。
- 3) 活性化型 HSC において、エンドセリン刺激により MLC (Thr18/Ser19) のリン酸化は増加し、この増加は MLCK 阻害剤 ML-7 の前処置によって阻害された。

2. Ca²⁺感受性増加機構の変動

近年、平滑筋収縮の病態分野においては Ca²⁺感受性機構の変動が注目され、特に CPI-17 発現の変化は消化管炎症や気道過敏などの病態モデルで明らかになり注目されている。本研究では、HSC における Ca²⁺感受性増加機構の関与の可能性についてさらに検討した。

- 1) 活性化型 HSC において、エンドセリン濃度及び時間依存的に CPI-17 (Thr38) のリン酸化が引き起こされた。また、エンドセリンで惹起される Thr38 のリン酸化は PKC 阻害剤 Ro-31-8425 や ROCK 阻害剤 Y-27632 の前処置によって阻害された。
- 2) 活性化型 HSC において、エンドセリン濃度及び時間依存的に MYPT1 (Thr853) のリン酸化は引き起こされたが、エンドセリンによる MYPT1 (Thr696) のリン酸化は起こらなかった。また、エンドセリンで惹起される Thr853 のリン酸化は Y-27632 の前処置によって阻害された。
- 3) ゲル収縮法により、エンドセリンは活性化型 HSC に対して濃度依存的な収縮を引き起こした。
- 4) 活性化型 HSC において、エンドセリンは濃度及び時間依存的に MLC (Thr18/Ser19) のリン酸化を惹起し、このリン酸化は Ro-31-8425 や Y-27632 の前処置により減少した。また、両者を同時に前処置した結果、相加的なリン酸化抑制効果が得られものの、完全にはリン酸化を抑制することはできなかった。しかしながら、ML-7、Ro-31-8425、Y-27632 の 3 つの阻害剤を同時に前処置したところ、MLC のリン酸化は完全に消失した。

以上の結果から、*in vitro* で活性化した HSC において、エンドセリンが Ca^{2+} 依存的な MLC のリン酸化を惹起すること、また CPI-17 (Thr38) や MYPT1 (Thr853) のリン酸化を介して MLC (Thr18/Ser19) のリン酸化を持続させることが明らかとなった。本研究により、 Ca^{2+} 依存的収縮機構に加え、HSC における Ca^{2+} 感受性増加機構の詳細が初めて明らかとなった。

II. 肝硬変モデルラットを用いた HSC の収縮機能活性化の解析

上記の Ca^{2+} 感受性増加機構が肝硬変病態時にも成立していることを確認するために、肝硬変モデルラットから HSC を単離し 2 日間培養した後、エンドセリンに対する収縮反応及び Ca^{2+} 感受性増加機構について検討した。

①BDL ラット

- 1) BDL ラットから単離した HSC では、陰性対照のラットから単離したそれに比べて、 α -SMA のみならず、MLC、MHC、MLCK、CPI-17、ROCK2 の発現量が増加した。
- 2) BDL ラットから単離した HSC では、陰性対照のラットから単離したそれに比べて、 ET_A の発現量が増加し、エンドセリンに対する細胞内 Ca^{2+} 濃度の反応性が増加した。
- 3) BDL ラットから単離した HSC では、エンドセリン刺激により CPI-17 (Thr38) や MYPT1 (Thr853) のリン酸化が惹起され、これらのリン酸化はそれぞれ PKC 阻害剤 Ro-31-8425 や ROCK 阻害剤 Y-27632 の前処置で阻害された。エンドセリン刺激により MLC (Thr18/Ser19) のリン酸化が惹起され、このリン酸化は Ro-31-8425 や Y-27632 の前処置で阻害された。

②DMN ラット

- 1) DMN ラットの肝臓では、陰性対照のラットのそれに比べて MLCK 陽性細胞数が増加していた。
- 2) DMN ラットから単離した HSC では、陰性対照のラットから単離したそれに比べて、 α -SMA のみならず、MLC、MHC、MLCK、CPI-17、ROCK2 の発現量が上昇した。
- 3) DMN ラットから単離した HSC では、エンドセリン刺激により CPI-17 (Thr38) や MYPT1 (Thr853) のリン酸化が惹起され、これらのリン酸化はそれぞれ Ro-31-8425 や Y-27632 の前処置で阻害された。エンドセリン刺激により MLC (Thr18/Ser19) のリン酸化が惹起され、このリン酸化は Ro-31-8425 や Y-27632 の前処置で阻害された。

以上の結果から、*in vitro* で活性化した HSC 同様に、*in vivo* で活性化した HSC においても、 Ca^{2+} 感受性を増加させる収縮力増加機構が存在することが明らかとなった。

【考察】

本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* で活性化した HSC では収縮蛋白質 α -SMA、MLC や MHC のみならず、収縮を制御する MLCK、CPI-17 や ROCK2 の発現が増加する知見を得た。さらに、*in vitro* で活性化した HSC だけでなく、*in vivo* で活性化した HSC においても、エンドセリン刺激による Ca^{2+} 依存的収縮機構に加え、CPI-17 や MYPT1 による Ca^{2+} 感受性増加機構が亢進することが明らかとなった。これらの結果から、肝硬変時に Ca^{2+} 感受性の増加した活性化型 HSC が肝内抵抗とそれに続く門脈圧を上昇させる可能性が示唆された。本研究は HSC における収縮機構を俯瞰的に解析した初めての研究であり、活性化型 HSC の収縮制御機構を標的とした新規肝硬変治療薬開発の基盤になるものだと考えられる。