

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 飯塚 真央

我が国では、肝硬変患者は 40 万人程度おり、年間死亡者数は 1 万 6000 人もいる。今後とも肝硬変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、肝星細胞 (HSC) の活性化に伴うコラーゲンの分泌亢進及び肝臓内圧の上昇を経て肝硬変や門脈圧亢進症が発症すると考えられている。HSC は類洞周囲腔に存在し平常時は静止型を示す。肝臓に炎症が起こると静止型 HSC は活性化型へと形質変換し、 α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現を増加させ収縮能を増強させる。活性化型 HSC の過度な収縮が惹起する類洞の狭窄は、肝臓内の循環障害を引き起こし肝硬変や門脈圧亢進症へ至ると考えられている。収縮機構の研究が盛んな平滑筋細胞では、 Ca^{2+} 依存的収縮機構 (細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伴ったミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) によるミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化) 及び Ca^{2+} 感受性増加機構 (PKC/CPI-17 と ROCK/MYPT1 を介した MLC のリン酸化) を介した収縮調節機構が知られている。活性化型 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 の収縮機構についての報告はあまり多くない。

本研究は、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関連蛋白質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。

実験成績

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

活性化の指標となる α -SMA の発現上昇が観察された HSC において、MLC、ミオシン重鎖 (MHC)、MLCK、CPI-17、ROCK2 の発現量の増加も観察された。*in vitro* における HSC の活性化に伴い、 Ca^{2+} 依存的収縮機構を促進する MLCK と Ca^{2+} 感受性増加機構を促進する CPI-17 や ROCK2 の発現量が上昇したことから、活性化型 HSC ではこれら 2 つの経路を介した収縮機構が想定された。

2. *in vitro* での活性化した HSC における収縮機構

Ca^{2+} 依存的収縮機構：エンドセリンの濃度依存的な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が確認された。*In vitro* による HSC の活性化に伴い、エンドセリン刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度反応性の増加が観察された。エンドセリン刺激により MLC (Thr18/Ser19) のリン酸化が引き起こされ、そのリン酸化は MLCK 阻害剤 ML-7 の前処置によって阻害された。

Ca^{2+} 感受性増加機構：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、そのリン酸化は 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。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、そのリン酸化は Y-27632 の前処置によって阻害された。エンドセリン濃度及び時間依存的に MLC のリン酸化が惹起され、そのリン酸化は Ro-31-8425 や Y-27632 の前処置により減少した。MLC のリン酸化は両者の同時前処置によってさらに抑制されたが、完全には消失しなかった。しかし、ML-7、Ro-31-8425、Y-27632 の 3 つの阻害剤の同時前処置によって MLC のリン酸化は完全に消失した。*in vitro* で活性化した HSC では、エンドセリンが Ca²⁺依存的な MLC のリン酸化を惹起すること、さらに CPI-17 や MYPT1 のリン酸化を介して MLC のリン酸化を持続させた。以上の結果、Ca²⁺依存的収縮機構に加え、HSC における Ca²⁺感受性増加機構の詳細が明らかとなった。

3. 肝硬変モデルラットを用いた HSC の収縮能活性化

肝硬変動物モデル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。肝硬変動物モデル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 や MYPT1 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。また、エンドセリン刺激により MLC 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。*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、Ca²⁺感受性を増加させる収縮力増加機構の存在が明らかになった。

以上を要約すると、本研究では、*in vitro* 及び *in vivo* で活性化した HSC において、収縮蛋白質 α -SMA、MLC、MHC や収縮を制御する MLCK、CPI-17、ROCK2 の発現増加のみならず、エンドセリン刺激による CPI-17 や MYPT1 を介した Ca²⁺感受性増加機構が明らかとなった。肝硬変時には Ca²⁺感受性の増加した活性化型 HSC が肝内抵抗や門脈圧を上昇させるものと考えられる。この様に本研究は、HSC の収縮機構およびその病態変化を解明したものであり、学術上寄与するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位に値するものと判断した。