

論文審査の結果の要旨

氏名 谷貝 知樹

本論文は5つの章からなる。第一章での序論に続き、第二章では材料と方法、第三章では研究結果、第四章では考察、第五章では結論が記述されている。

肝炎の慢性化に伴って引き起こされる肝線維化は、壊死した肝臓組織の欠損部分を補う一方で、進行すると肝機能の低下を引き起こし、肝硬変や肝癌といった重篤な肝疾患に進行する病態の一つである。しかしながら、肝線維化の進行や肝再生の分子メカニズムには不明な点が多く残されている。申請者の所属研究室では、慢性肝炎が増悪化し肝線維化へと向かうのか、あるいは肝再生へと向かうのかを分ける分子メカニズムを解析するため、慢性肝炎下で高発現する遺伝子を cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、分泌タンパク質である Semaphorin 3E (Sema3e) が慢性肝炎下で高発現する可能性が示された。Sema3e はこれまで個体発生において血管新生を抑制的に制御することが報告されていたため、申請者は肝臓に特有の毛細血管である「類洞」の再生に Sema3e が関わっている可能性を考えた。そこで、CCl₄ の単回投与により肝傷害を誘導し、Sema3e の発現量と肝傷害の程度を比較すると Sema3e は肝傷害のピークで発現量が最大となり、肝再生過程では急激に減少することが明らかとなった。このことから、Sema3e は肝再生の最初期において類洞の再生を抑制的に制御している可能性が考えられた。次に Sema3e の発現細胞を免疫組織化学染色法により解析すると、CCl₄ により傷害を受けた部位の肝細胞が Sema3e を発現している様子が観察された。さらに、肝細胞の初代培養系に CCl₄ を添加すると Sema3e の発現量が劇的に上昇することが明らかとなった。分泌された Sema3e の標的細胞を同定するため、Sema3e の受容体である Plexin D1 (Plxnd1) の発現細胞を RT-PCR 法により解析すると、他の細胞種と比較して類洞内皮細胞において高発現していることが明らかとなった。そこで、類洞内皮細胞の初代培養系に Sema3e を添加すると、類洞内皮細胞の仮足の退縮が有意に誘導されたことから、Sema3e は細胞移動に影響を与える可能性が示された。実際に *in vivo* で類洞内皮細胞の退縮および類洞の再生抑制が Sema3e によって引き起こされるのかを確認するため、Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 法を用いて生体の肝細胞で Sema3e を強制発現させた後、CCl₄ を単回投与することで、類洞の破壊と再生を誘導した。その結果、HTVi 法により Sema3e を強制発現させた個体群では類洞の再生が有意に乱れることが明らかとなった。このことから、肝細胞で発現する Sema3e は類洞内皮細胞の退縮を促し、類洞の再生を抑制的に制御することが明らかとなった。類洞内皮細胞を裏打ちする肝星細胞は、肝傷害時に活性化してコラーゲンを分泌することで、組織の欠損を補填することが知られている。肝傷害が一過的であればコラーゲンは再生の足場として機能するが、肝傷害が慢

活性化すると活性化肝星細胞の分泌するコラーゲンは蓄積し続け強固な線維を構築し、肝線維化を増悪化させる。つまり、肝星細胞の活性化および不活性化のタイミングは正常な肝再生のために不可欠である。肝星細胞の活性化は類洞内皮細胞によって制御されていることが報告されていたことから、申請者は慢性肝傷害によって引き起こされる持続的な **Sema3e** の発現が類洞の再生を阻害し続け、間接的に肝星細胞を活性化するのではないかと考えた。実際に HTVi 法により **Sema3e** を肝細胞で強制発現させた後、**CCl₄** の単回投与により傷害と再生を誘導すると、**Sema3e** を強制発現させた個体群では類洞の再生の乱れから肝星細胞が活性化している様子が観察された。さらに、**Sema3e** ノックアウトマウスに対して **CCl₄** を連続的に投与し、持続的な肝傷害を誘導すると、肝線維化が減弱することが明らかとなった。以上の結果から、**Sema3e** は肝傷害時に肝細胞から分泌され、類洞の再生のタイミングを直接的に制御し、肝星細胞の活性化を間接的に制御することが明らかとなった。本研究により **Sema3e** の持続的な発現が肝線維化の増悪化因子であることが明らかとなり、**Sema3e** または **Plxnd1** は肝線維化の治療標的としても有望であることが示された。

なお、本論文は田中稔、宮島篤との共同研究であるが、申請者が主体となって実験および考察を行ったものであり、申請者の寄与が十分であると判断する。したがって、博士（理学）の学位を授与出来ると認める。