

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 福島 慎一

肝線維化は、肝における I 型コラーゲンを主とした細胞外基質の過剰蓄積によって特徴付けられる病態である。線維化の成因は、慢性的な炎症によって傷害を受けた肝細胞から IL-6、TGF- β をはじめとするサイトカインが放出され、この炎症性サイトカインが肝類洞血管を取り巻く肝星細胞に作用にしてコラーゲンを過剰に分泌することによる。静止期の肝星細胞は、通常ビタミン A 貯蔵細胞として機能しているが、サイトカイン刺激によって筋繊維芽様細胞へと分化し、コラーゲンを分泌する。分化した星細胞の小胞体は肥大化し、多量に I 型コラーゲンを分泌することから、coat protein complex II (COPII) 被覆小胞体による小胞体からの分泌機構は大きく変化すると考えられるが、この点に着目した研究は少ない。「肝線維化におけるコラーゲン分泌機構の解明」と題した本論文では、肝星細胞の活性化に伴う COPII 関連因子の発現動態を解析し、COPII 被覆タンパク質である Sec23a および Sec24d が肝星細胞の活性化過程に関わることを見出している。

1. 肝星細胞の活性化に伴う分泌関連因子の発現変動解析

肝星細胞の活性化に伴う分泌関連因子の転写量の変動を解析するために、成体ラット肝からコラゲナーゼ灌流による消化と密度勾配遠心法を用いて、肝星細胞を単離した。単離直後の初代培養肝星細胞は、ほとんどがビタミン A 貯蔵細胞であるが、培養に伴って自発的な活性化が起り、10 日程で筋繊維芽様細胞へと分化する。この系を用いて、活性化前後の COPII 関連因子の転写量をリアルタイム PCR で解析した結果、Sec23a および Sec24d の発現量が特異的に増加すると共に、VII 型コラーゲンの積み荷受容体である cTAGE5/TAGN01 や他の COPII 因子群の発現は逆に減少することを見いだした。

2. 肝星細胞の活性化に対する Sec23a 発現抑制の影響

Sec23a の発現上昇が肝線維化に必要であるかを検討するために、ラット初代培養肝星細胞に対して Sec23a のノックダウンを試みた。Sec23a がノックダウンされた細胞では、肝星細胞活性化マーカーである α -SMA が有意に低下した。また、培養上清中に分泌された I 型コラーゲンの量も減少していた。以上から、

Sec23a の発現抑制は肝星細胞の活性化を減弱させることが明らかとなった。

3. ヒト肝星細胞株 LX-2 を用いた活性化過程における Sec23、Sec24 の解析

肝星細胞の活性化に対する Sec23 および Sec24 の影響を詳細に解析するため、ヒト由来の肝星細胞培養株 LX-2 を用いて TGF- β 刺激時の活性化過程を検討した。その結果、TGF- β で刺激した LX-2 では、初代培養肝星細胞と同様に Sec23a と Sec24d が特異的に増加した。つづいて TGF 刺激による肝星細胞の活性化に対する Sec23 アイソフォームの寄与を検討した。Sec23a の発現抑制においては、初代培養系と同様に活性化は抑制されたが、Sec23b 発現抑制では顕著な変化は認められなかった。さらに、Sec24d の発現抑制においても活性化が抑制された。

4. 肝星細胞の活性化に対する Sec23a の転写因子 BBF2H7 発現抑制の影響

ヒトの遺伝病をはじめとした知見から、発生過程における Sec23a の機能不全により骨形成の障害が既に明らかとなっている。この際、コラーゲンの分泌不全もあわせて認められることから、骨形成と肝線維化の過程が類似している可能性を考えた。骨形成においては、小胞体膜貫通タンパク質 BBF2H7 が小胞体ストレスを感知して切断されて転写因子として作用し、Sec23a 転写量を増加させることが知られている。そこで、この機構が肝星細胞でも機能しているかを、LX-2 細胞で検討した。その結果、BBF2H7 のノックダウンで Sec23a が低下し、肝星細胞の活性化が抑制されることを見いだした。

本論文から、I 型コラーゲン分泌が亢進している活性化肝星細胞では、VII 型コラーゲン積み荷受容体の関連タンパク質の発現は逆に減少することが見いだされ、I 型コラーゲンと VII 型コラーゲンは、互いに異なる機構で分泌調節される可能性が提示された。また、低分子量 G タンパク質 Sar1 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である Sec12 の発現量は低下する一方で、COPII 被覆タンパク質の中で Sec23a および Sec24d サブタイプの発現が有意に増加していたことは興味深い。さらに、Sec23a および Sec24d のノックダウンによって肝線維化マーカーの発現量が顕著に低下したことから、Sec23a、Sec24d の発現が肝線維化に関与する可能性が考えられる。現在までに肝星細胞の活性化過程において、その分泌動態に着目した研究は少なく、分泌因子の抑制によって肝線維化を抑えたという点で、本研究の新規性は高いものである。以上を要するに、本論文は博士（薬科学）の学位として十分な価値があるものと認められる。