

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	柳 田 敦 子
論文題目	Downregulation of the Wnt antagonist Dkk2 links the loss of Sept4 and myofibroblastic transformation of hepatic stellate cells (Sept4 欠失肝星細胞における筋線維芽細胞への分化転換の亢進には Wnt シグナル抑制因子 Dkk2 の発現誘導障害が関与する)		
(論文内容の要旨)			
【背景】細胞骨格系蛋白質セプチンの 1 サブユニットである Sept4 は肝臓では静止期星細胞に特異的に発現している。星細胞は肝障害の際に「活性化」と称する筋線維芽細胞への分化転換を生じ肝線維化を促進させる。先行研究にて <i>Sept4</i> ノックアウトマウスでは星細胞が活性化しやすく、肝線維化が増悪することが明らかになった。しかし、<i>Sept4</i> 欠失が星細胞の活性化を促進し、肝臓の線維化増悪を引き起こすメカニズムについては不明である。Wnt シグナルが肝線維化、及び星細胞の活性化に関わっていることが報告されている。 【目的】<i>Sept4</i> 欠失が肝星細胞の活性化、肝線維化に及ぼすメカニズムを明らかにすることである。 【方法】野生型と <i>Sept4</i> ノックアウトマウスから星細胞を分離し in vitro で活性化させ、遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイによって解析した。野生型に比較し <i>Sept4</i> 欠失星細胞で最も発現が低下していた Wnt シグナル抑制因子 <i>Dkk2</i> に注目し、<i>Dkk2</i> の肝臓での発現を in vivo 及び in vitro で検証した。野生型及び <i>Sept4</i> ノックアウトマウスの正常肝及び四塩化炭素腹腔内投与による線維肝で、qRT-PCR 法及びウエスタンブロット法で比較した。肝において <i>Dkk2</i> を特異的に産生している細胞を同定するため、野生型正常マウスより肝細胞、内皮細胞及びクッパー細胞、星細胞を分離し、<i>Dkk2</i> の発現を qRT-PCR 法及びウエスタンブロット法で調べた。肝星細胞における <i>Dkk2</i> の Wnt シグナル抑制効果を検討するためにヒト星細胞株 LX-2 を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。次に、<i>Sept4</i> ノックアウトマウスの星細胞に <i>Dkk2</i> を投与し、肝線維化関連遺伝子の発現を qRT-PCR 法で調べた。さらに臨床検体において DKK2 の発現を免疫組織染色法で調べた。 【結果】DNA マイクロアレイで、<i>Sept4</i> ノックアウトマウスの星細胞では野生型に比較し、<i>Dkk2</i> が 0.064 倍に低下しており、<i>Sept4</i> 欠失星細胞の易活性化の責任遺伝子である可能性示唆された。<i>Dkk2</i> は肝線維化刺激により肝臓において発現が亢進し、<i>Sept4</i> ノックアウトマウスの肝臓ではその発現が抑制されていた。肝臓では星細胞が <i>Dkk2</i> を特異的に発現していることがわかった。星細胞では in vitro での活性化に伴って <i>Dkk2</i> の発現が亢進したが、<i>Sept4</i> 欠失星細胞では発現亢進が抑制されており、<i>Dkk2</i> が星細胞の過剰な活性化を制御するネガティブフィードバック機構を担う因子である可能性が考えられた。ヒト星細胞株 LX-2 に <i>Dkk2</i> を投与すると、Wnt シグナルの標的遺伝子である Tcf の発現が抑えられたことから、星細胞における <i>Dkk2</i> の Wnt シグナル抑制効果が確認された。次に、<i>Sept4</i> ノックアウトマウスの星細胞に <i>Dkk2</i> を投与すると、星細胞の活性化マーカーである平滑筋型アクチン (α-Sma)、線維化関連遺伝子のコラーゲン (<i>Col1a1</i> 及び <i>Col3a1</i>) の発現が抑制され、<i>Smad7</i> の発現は亢進した。臨床検体の免疫組織染色で、DKK2 は類洞周囲の星細胞に一致して認められ、正常肝、慢性肝炎、肝線維症、肝硬変と線維化が進むに従って発			

現が増加していた。ヒト肝組織においても、DKK2 は肝星細胞に特異的に発現し、活性化に伴い発現が増加することが示された。

【結語】*Sept4* ノックアウトマウスの星細胞は *Dkk2* の発現亢進が障害され、Wnt シグナルが抑制されないため活性化しやすく、肝線維化を促進する。

(論文審査の結果の要旨)

肝線維化の中心事象として、肝星細胞の筋線維芽細胞への分化転換が挙げられる。一方、細胞骨格蛋白質 Sept4 は、肝星細胞にのみ発現し、*Sept4* 欠失肝星細胞は分化転換が亢進し、*Sept4* 欠失マウスは易線維化であることが報告されている。申請者は *Sept4* 欠失肝星細胞の分化転換亢進、易線維化の機序解明を目的として以下の研究を行った。DNA マイクロアレイで肝星細胞における *Sept4* 欠失型と野生型の遺伝子発現を比較し、*Sept4* 欠失肝星細胞で Wnt シグナル抑制因子 *Dkk2* の発現低下を見出した。さらに *Sept4* 欠失肝星細胞の分化転換における Dkk2 の意義を解明するために、*Sept4* 欠失マウス及び臨床検体を用い、*Dkk2* は肝星細胞に特異的に発現し、肝星細胞の分化転換に伴い *Dkk2* の発現が亢進するが、*Sept4* 欠失型では *Dkk2* の発現の亢進が抑制され、ヒト肝でも DKK2 の肝星細胞特異的発現を認め、線維化の進行に伴い発現が増加することを示した。さらに *Sept4* 欠失肝星細胞への Dkk2 添加により平滑筋型アクチン、コラーゲンの発現が抑制され、*Smad7* の発現が増加することを示した。以上の研究は、*Sept4* 欠失肝星細胞の分化転換亢進、*Sept4* 欠失マウスの易線維化に *Dkk2* の発現低下に関わっていることを示し、肝線維化・肝星細胞の分化転換の機序解明に寄与するところが多いと考えられる。

したがって、本論文は博士（医学）の論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 8 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降

