

氏 名	中 村 敏 夫
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2054 号
学位授与の日付	平 成 10 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Expression of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger emerges in hepatic stellate cells after activation in association with liver fibrosis (肝線維化に関わる肝星細胞活性化時にみられるナトリウム・カルシウム交換トランスポータの強発現に関する研究)
	(主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 野 間 昭 典 教 授 下 遠 野 邦 忠 教 授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

肝硬変などの肝線維化を主とする病態において活性化した伊東細胞はコラーゲンなどの細胞外基質の産生等その発生機序に深く関与しているが、伊東細胞活性化のメカニズムは未だ明らかでない。

我々は、伊東細胞が活性化に伴い筋線維芽様細胞へと形質転換し筋細胞的な性格を帯びようになることから、活性化段階で重要なシグナルとして働いているであろう細胞内 Ca^{2+} を調節する膜輸送蛋白のなかでも $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerに着目しその発現と意義を検討した。

分離培養された伊東細胞は培養時間経過に伴いspontaneousに活性化しそれはin vivoでの活性化をよく反映することが知られている。そこでまず分離培養伊東細胞を用いて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger発現を解析した。

ラット肝をコラゲナーゼで灌流消化後、Nycodenzを用いた密度勾配遠心で伊東細胞を分離。Collagen-coated dishにplatingしMEM+10%FBS, 5%CO₂ incubatorで培養。培養時間経過に伴う活性化状態を、その指標である α -smooth muscle actin (α -SMA) でモニターした。

培養1日目(活性化前)と培養7日目(活性化状態)の伊東細胞よりそれぞれ膜分画を得、anti-canine cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger antibodyを用いてwestern blot analysisを行ったところ1日目の伊東細胞では $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger蛋白の発現はみられなかったが、培養7日目のそれでは著明な発現が見られた。

既知のrat heart $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerの塩基配列をもとにprimerを合成しPCRを用いて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger cDNA probeを作成。これを用いてnorthern blot analysisを行ったところ、培養3日目より $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mRNA発現が明らかとなり、その後経時的に著明な発現増強がみられた。これは、伊東細胞活性化指標である α -SMAの経時的発現増強とよく相関していた。

以上より伊東細胞において $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger は活性化に伴い発現し増強することが明らかとなった。

さらにそのfunctionalな発現を調べるためにfura-2を用いて培養伊東細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) をモニターし、細胞外液の Na^+ をNMDGに置換した時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を検討した。培養7日目の活性化伊東細胞においては上記 Na^+ -removal にて著明な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を認めそれは Ni^{2+} -sensitive, verapamil-insensitiveな反応であった。この反応は培養5日目より確認可能となり、それ以前では検出できなかった。また、この実験系より算出されたHill coefficientは2.5であった。以上より活性化伊東細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerの機能的発現が明らかとなった。

次いで、 CCl_4 で誘導されたラット硬変肝モデルを用いて、実際に肝臓での $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerの遺伝子発現がみられるかどうかをwhole liverでnorthern blotにより解析したところ、硬変肝において著明な $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mRNAの発現を認めた。

さらにこの肝硬変モデルにおいて肝構成細胞のいずれが $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mRNAを発現しているのかを同定すべく硬変肝を肝細胞分画、伊東細胞を除く非実質細胞分画、伊東細胞分画の3つにわけて同様にnorthern blot analysisを行ったところ、伊東細胞分画において著明にmRNA発現がみられた。このことからin vivoでも活性化伊東細胞において $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mRNAが強発現していることが明らかとなった。

以上より伊東細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger発現は伊東細胞活性化の指標と成りうるだけでなく、肝線維化の病態に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝線維化の発生および進展には活性化された肝星細胞が重要な役割を果たしているが、星細胞の活性化機序やその責任分子は明らかでない。

本研究はまずラット分離培養星細胞を用い、細胞内 Ca^{2+} を調節する $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerがその活性化に伴い発現する(mRNA発現をNorthern blot analysis, 蛋白発現をWestern blot analysis, 機能的発現をfura-2蛍光法による細胞 Ca^{2+} 濃度のモニタリングで証明)ことを既報の星細胞活性化のマーカーである α -平滑筋アクチンでモニターすることで示した。

次にラット肝硬変モデルを用いて肝組織でも肝線維化(硬変化)に伴い $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerのmRNA発現および増強がみられることをNorthern blot analysisで示し、さらにその発現は肝構成細胞のうち星細胞にのみ特異的にみられる事を明らかにした。また $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerのmRNA発現は肝線維化の早期に肝組織で検出可能(northern blot)であった。これまでのところ肝星細胞における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerに関する報告はなく、本研究により初めて $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangerが活性化星細胞に発現し、活性化の新しい指標であることを示された。

さらに、本研究は肝線維化の早期診断、星細胞活性化や肝線維化の機序解明にも貢献することが期待される。

したがって、本論文は博士(医学)の学位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10年9月14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。