

氏 名	むら た とおる 村 田 徹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1789 号
学位授与の日付	平 成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells に関する研究 (ROCK 阻害剤 Y-27632 によるラット肝星細胞活性化および肝線維化に対する抑制効果に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 日 合 弘 教 授 山 岡 義 生 教 授 今 村 正 之

論 文 内 容 の 要 旨

肝線維化は、慢性肝疾患の終末像を特徴づける病態である。したがって、肝線維化の予防と治療は慢性肝疾患の治療体系の中で、重要な意義を有する。現在、肝線維化の原因として肝構成細胞の1つ肝星細胞の活性化が重要な役割を果たしていると考えられている。肝星細胞は、肝類洞の Disse 腔に存在し正常肝においては静止期にあり、肝類洞の立体的構築を担っている。一方、線維化肝においては持続する肝の炎症に伴い肝星細胞は活性化し、平滑筋収縮力を有する筋線維芽様細胞へと形質転換し、同時に増殖能や蛋白合成能、特にコラーゲン合成能を亢進させる。最近、活性化肝星細胞および線維化肝に、細胞内外の Na^+ の濃度勾配という化学ポテンシャルを利用して細胞内の Ca^{2+} を細胞外へ放出する $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger (以下、NCX) が発現し、活性化や線維化の指標となることが報告された。さらに近年、低分子量 GTP 結合蛋白質の1つ Rho が、肝星細胞活性化に関与することが報告された。申請者は、Rho の下流のエフェクターである p160ROCK の阻害剤 Y-27632 を用いて、肝星細胞活性化と線維化肝に対する効果と NCX の発現動態について検討した。

肝星細胞に対する検討として、Wistar 系ラット (400~500 g) からコラゲナーゼ灌流消化法、ナイコデンツ密度勾配遠心法にて肝星細胞を分離し、短期培養した。10% FCS 含有 MEM で24時間培養後、ラット肝星細胞に Y-27632 を 0, 1, 10, 100 μM の濃度で添加し位相差顕微鏡にて細胞形態の変化を観察した。さらにノーザンブロットにて NCXmRNA の発現を調べ活性化の指標とした。線維化肝に対する検討として、Wistar 系ラット (200 g) に0.6 ml/kg の四塩化炭素を1週間に1回計6週間胃内投与し、同時に浸透圧ポンプを用いて 30 mg/kg の Y-27632 をラット腹腔内に6週間持続注入した。対照群では、生食をラット腹腔内に6週間注入した。それぞれ投与終了後犠牲せしめ、Azan 染色、肝組織中ヒドロキシプロリン量、肝線維化指標である血清ヒアルロン酸値、肝星細胞活性化の指標として α -平滑筋アクチン (以下、 α -SMA) 免疫染色、肝線維化関連サイトカインの TGF- β 1 免疫染色、NCXmRNA 発現を検討し、同時に体重の変化を調べた。

ラット肝星細胞に Y-27632 を添加すると、細胞形態は星型となり肝星細胞活性化の抑制が示唆され、同時に NCXmRNA 発現の抑制を認めた。ラットに四塩化炭素と Y-27632 を同時投与すると、対照群に比し線維蓄積の抑制を認めた。肝組織中ヒドロキシプロリン量は対照群 $529.5 \pm 35.1 \mu\text{g/g wet weight}$, Y-27632 投与群 $255.9 \pm 25.4 \mu\text{g/g wet weight}$ ($P < 0.01$)、血清ヒアルロン酸値は対照群 $88.8 \pm 2.8 \text{ ng/ml}$, Y-27632 投与群 $40.1 \pm 4.5 \text{ ng/ml}$ ($P < 0.01$) と有意差を認めた。 α -SMA 陽性細胞および TGF- β 1 陽性細胞は減少し、NCXmRNA 発現は低下した。体重は変化しなかった。

以上より、Y-27632 による肝星細胞活性化抑制および肝線維化軽減、NCXmRNA 発現低下が示された。本研究は、肝星細胞活性化および肝線維化における Rho-160ROCK シグナル経路の関与と NCX の重要性を示すとともに、Y-27632 による肝線維化に対する新たな治療戦略を示唆するものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

肝線維化に、肝星細胞の活性化が重要な役割をはたしていることが知られている。低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho が肝

星細胞の活性化に深く関与し、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ changer（以下、NCX）が肝星細胞の活性化の指標となることが示されている。今回、申請者は Rho の下流のエフェクター p160ROCK の阻害剤 Y-27632 の肝星細胞活性化および線維化肝と NCX の発現動態に与える影響を検討した。

- 1) ラット肝星細胞に Y-27632 を添加すると、細胞形態の観察上肝星細胞活性化の抑制が示され、同時にノーザンブロットにて NCXmRNA 発現の抑制を認めた。
- 2) ラット四塩化炭素投与肝線維化作成モデルにおいて Y-27632 を同時投与すると、生食投与の対照群に比し肝線維化の抑制、肝組織中ハイドロキシプロリン量・血清ヒアルロン酸値の有意な減少 ($P<0.01$)、 α -平滑筋アクチン陽性細胞および TGF- β 1 陽性細胞の減少、そして NCXmRNA 発現低下を認めた。

以上の研究は、肝星細胞活性化と肝線維化における Rho-p160ROCK シグナル経路の関与、NCX の重要性を示し、さらに Y-27632 の肝線維化抑制効果を明らかにし、肝硬変治療に寄与するところが多い。

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14年3月29日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。