

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	柏手 由里乃
学位論文題目			
肝繊維化におけるウリナスタチンの意義 ーウリナスタチンノックアウトマウスを用いた検討ー			
共著者名			
河野 透、葛西眞一			
未公表			
研究目的			
<p>ウリナスタチンは肝臓で産生され、尿中に排泄される。生体が強い侵襲を（感染、手術、外傷、炎症など）受けた際に増加することから、生体の侵襲に対する内因性防御因子としての機能を備えている可能性も考えられている。現在、臨床においては、ウリナスタチンのライソゾーム膜の安定化作用によるプロテアーゼ阻害作用や抗サイトカイン作用を期待して、膵炎やショックの治療薬として使用されている。しかしながら、これまでの報告では、ウリナスタチンの肝臓における意義について十分な検討がされていない。そこで、われわれはウリナスタチンのプロテアーゼ阻害作用、特に、代表的プロテアーゼであるプラスミンに対する阻害作用に着目した。ウリナスタチンはライソゾーム膜を安定化させることでプラスミンなど各種蛋白分解酵素の遊離を抑制させる。そのプラスミンがtransforming growth factor-β (TGF-β) の活性化を介した肝繊維化に大きく関わっていることは既に知られている①。つまり、肝繊維化の中心的サイトカインであるTGF-βは主に肝星細胞、クッパー細胞、血小板から潜在型TGF-βの形で分泌される。この潜在型TGF-βは細胞外で主にプラスミンにより活性型ペプチドが切り離され、標的細胞表面のTGF-βレセプターと結合し、細胞内ドメインにあるセリン/スレオニンキナーゼが活性化されて、細胞内伝達蛋白(Smad2/3)をリン酸化して核へと情報が伝達されていく。その結果オートクライン的機能調節機構により星細胞が活性化し、TGF-βの自己産生の亢進や、細胞外マトリックス合成能の亢進を起し、肝繊維化が進行する②。したがってプラスミン抑制効果を持つウリナスタチンが肝繊維化を抑制する可能性があるという着想に至った。そこで、肝繊維化におけるウリナスタチンの意義を検証するためにウリナスタチンノックアウトマウスを使用し、チオアセタマイド(TAA)肝硬変モデルを作製し、線維化の程度を比較、さらにウリナスタチ</p>			

ン持続投与による線維化への影響を検討した。

材 料 ・ 方 法

今回使用したウリナスタチンノックアウトマウスは持田製薬研究所から供与されたもので、ウリナスタチンのexon8、9部分をネオマイシン耐性遺伝子に置換し、ウリナスタチン遺伝子欠損マウスが作成された③。使用したマウスはC57BLである。方法としては、薬剤耐性遺伝子に置き換えたtargeting constructを129/Ola系マウス胚盤胞由来のマウス胚性幹細胞であるES細胞に導入する。薬剤耐性でスクリーニングを行い、この細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞にinjectionして、これを偽妊娠のICRマウスに移植すると、黒斑をもったキメラマウスが産まれる。これを更にC57BL/6とかけ合わせると、もとのESマウスと同じ白色のヘテロマウスが得られる。このヘテロマウス同士でかけ合わせを行い、最終的にノックアウトマウスを得るというものである。ノックアウトマウスであるということの確認はサザンブロッティングで行った。

動物モデル実験群

ウリナスタチンノックアウトマウス10週齢をホモ群、ヘテロ群およびコントロールのワイルド群のそれぞれ3群に分け、TAA投与群と非投与群を作成し、20週目(30週齢)に犠牲死させ採血、血清分離し、凍結保存した。さらに肝臓を摘出し、凍結保存と4%パラホルムアルデヒド固定保存を施行。なおTAAは飲水に混入(300 mg/L)し摂取させた。また、ノックアウトマウスのホモ群に対して15週齢から5週間ウリナスタチンを持続投与する目的でアルザ浸透圧ポンプを埋め込んだ群を作成し、ウリナスタチン持続投与群と非投与群を作成し、20週齢で犠牲死させ、肝繊維化の程度を比較検討した。

肝繊維化の評価

肝繊維化のマーカーとして血清中のヒアルロン酸、肝臓組織中のTGF- β 発現をRT-PCR法で測定、肝組織の組織染色を0.1% Sirius Red染色(0.1% Fast Green対比染色)、活性化星細胞を染色するため抗 α -smooth muscle actin(α -SMA)抗体による免疫染色を行い、NIH画像解析ソフトによる定量比較をおこなった。

統計処理

データの多重比較検定はANOVA法でDuncan's post hoc testで行った。独立した2群比較はMann-Whitney U testを用いた。解析結果は $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

1. ウリナスタチンノックアウトマウスのTAA非投与群(30週齢)における肝繊維化の検討 ホモ群、ヘテロ群およびワイルド群の3群の比較で血清ヒアルロン酸はワイルド群、ヘテロ群に比較してホモ群が有意に高く、組織学的な検討でもホモ群では明らかな肝繊維化が認められた。活性化星細胞の発現、肝内

TGF- β 発現もホモ群では有意に高かった。

2. ウリナスタチンノックアウトマウスのTAA投与群における肝繊維化の検討
ホモ群、ヘテロ群、ワイルド群全ての群においてTAA投与によって肝硬化化していた。ホモ群はワイルド群、ヘテロ群に比較してTAA投与によって有意に高度な肝繊維化が発生した。活性化星細胞の発現、肝内TGF- β 発現もホモ群では有意に高かった。
3. ウリナスタチンノックアウトマウスのホモ群におけるウリナスタチン持続投与による肝繊維化抑制効果の検討
ウリナスタチンノックアウトマウスのホモ群は30週齢において有意な肝繊維化が発症するが、ウリナスタチン持続投与群では有意に線維化を抑制し、ウリナスタチン持続投与開始時の線維化のレベルと投与終了時における線維化のレベルは有意差が認められなかった。活性化星細胞の発現、肝内TGF- β 発現もウリナスタチン持続投与群は非投与群に比べて有意に低値であった。

考 案

肝繊維化発現プロセスは肝細胞に対する様々な外的、内的傷害がイニシエーションとなることが報告されている。つまり、様々な要因(アルコール、ウイルス、薬剤、寄生虫、手術侵襲、自己免疫などの刺激)により肝細胞が障害を受けると、星細胞は筋繊維芽細胞へ形質転換し、脂肪滴を失うと共に増殖能・蛋白合成能(特にI型コラーゲンなどの細胞外マトリックス産生能)を亢進させる②。これら一連の変化を星細胞の活性化といい、これには種々のサイトカイン、特にTGF- β が最も大きく関わっている。TGF- β は潜在型として星細胞、クッパー細胞、血小板から産生され、細胞外でプロテアーゼにより活性型となる。潜在型TGF- β の活性化に関与するプロテアーゼにはプラスミン、血漿カリクレイン、カテプシンD,Bなどがあり、この中でも特にプラスミンがTGF- β の活性化を介した肝繊維化に大きく関わっている①。今回、われわれはウリナスタチンノックアウトマウスを長期間観察した結果、ホモ群において自然発症的に肝繊維化が観察された。正常時においても、微量な菌体毒素などが門脈を介して腸管より肝臓に流入していることが報告されていることより、正常時においても絶えず肝臓は外的、内的傷害が発生する可能性があり、肝臓が自ら産生するプロテアーゼインヒビターであるウリナスタチンによって、肝繊維化が容易に発生しないように、自己防御システムを確立している可能性が推察された。また、このシステムが機能しないノックアウトマウスに、外的な障害因子であるTAAを投与した結果、肝繊維化が正常マウスに比べて有意に線維化が高度になった。さらに、ノックアウトマウスにウリナスタチンを持続投与することで、肝繊維化の進展を抑制できたことから、われわれの推察したシステムが肝繊維化発現プロセスに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

結 論

- ・ ウリナスタチンノックアウトマウスは、肝繊維化を自然発症した。
- ・ ウリナスタチンノックアウトマウスは、チオアセタマイド誘発肝硬変が対照群に比べて有意に高度に発現した。
- ・ ウリナスタチンノックアウトマウスにウリナスタチン持続投与することで、自然発症する肝繊維化を抑制した。

引 用 文 献

- ① Okuno M., Moriwaki H., Imai S., et al., Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF- β in liver stellate cells. *Hepatology*. 1997;26:913-921.
- ② Flaumenhaft R., Kojima S., Abe M., et al., Activation of latent transforming growth factor beta. In : August JT, Anders MW, Murad F eds : *Adv Pharmacol*. 1993;24:51-76.
- ③ Sato H., Kajikawa S., Kuroda S., et al., Impaired Fertility in Female Mice Lacking Urinary Trypsin Inhibitor, *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1154-1160.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	柏 手 由 里 乃
審査委員長 高 後 裕 ㊞			
審査委員 小 川 勝 洋 ㊞			
審査委員 葛 西 眞 一 ㊞			
学 位 論 文 題 目			
肝線維化におけるウリナスタチンの意義 —ウリナスタチンノックアウトマウスを用いた検討—			
<p>ウリナスタチン(以下UTI)は肝臓でのみ産生され、尿中に排泄される。生体が強い侵襲を受けた時にその排泄量が増加することから、内因性防御因子としての機能を持つと考えられている。UTIの作用としては抗サイトカイン作用(ショックや膵炎の治療に臨床応用)や蛋白分解酵素阻害作用が知られているが、その唯一の産生臓器である肝臓での作用については検討されていない。本論文では肝線維化プロセスに重要な、TGF-βの活性化に関与している蛋白分解酵素に対する、内因性UTIの蛋白分解酵素阻害作用に着目した。肝線維化のプロセスはウイルス等による慢性的肝障害により肝星細胞が刺激され、潜在型 TGF-βを分泌し、それが活性化するのに蛋白分解酵素(プラスミンなど)が必要である。活性化 TGF-βは星細胞を活性化し、TGF-β自己産生を亢進し、さらに肝実質細胞増殖・再生の抑制、肝線維化を促進する。</p>			

本論文では内因性UTIがTGF- β 活性化を抑制し、肝線維化を抑制しているという仮説を立て、UTI ノックアウトマウスを用いて検証している。なお線維化の評価は血清ヒアルロン酸値、TGF- β mRNA、H-E 染色、 α -SMA 免疫染色、Sirius Red 染色にて行った。1、UTI ノックアウトマウスの肝線維化への影響をホモ・ヘテロ・ワイルド群で比較した結果、ホモ群で線維化を強く認めた。2、UTI ノックアウトマウスに外来性にUTI 持続投与群と蒸留水投与群を作成し比較した結果、UTI 投与群で線維化抑制を認めた。3、肝線維化誘発薬剤(チオアセタマイド以下TA)をUTI ノックアウトマウスのホモ・ヘテロ・ワイルド群で比較した結果、ヘテロ・ワイルド群でも軽度の線維化を認めたが、ホモ群でより著明であった。以上のことより肝線維化プロセスにおいて、蛋白分解酵素阻害作用を持つ内因性UTIが、TGF- β を活性化するのに必要なプラスミンなどの蛋白分解酵素を阻害することで、肝線維化の発現及び増悪を抑制している可能性が強く示唆された。

論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ理論的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。